Développement de la synthèse micro-ondes de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques pour des applications biomédicales

Thomas Girardet

▶ **To cite this version:**

Thomas Girardet. Développement de la synthèse micro-ondes de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques pour des applications biomédicales. Matériaux. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0187 . tel-04105472

HAL Id: tel-04105472
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04105472

Submitted on 24 May 2023

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

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

Université de Lorraine, Collegium Sciences et Technologies, Institut Jean Lamour

Ecole Doctorale C2MP « Chimie – Mécanique – Matériaux – Physique »

THÈSE

Pour l'obtention du titre de :

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : chimie des matériaux

Présentée par :

Thomas GIRARDET

Développement de la synthèse micro-ondes de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques pour des applications biomédicales

---

Thèse soutenue publiquement le 01 Décembre 2022 à Nancy devant le jury composé de :

Mme Corinne Chanéac	Professeur des Universités	Rapportrice	Sorbonne Université – Paris
M. Fabien Grasset	Directeur de recherche	Rapporteur	ISCR – Rennes
M. Jean-Jacques Gaumet	Professeur des Universités	Examinateur Président du jury	LCP-A2MC – Metz
M. Sylvain Miraux	Directeur de recherche	Examinateur	CRMSB – Bordeaux
M. Cédric Carteret	Professeur des Universités	Invité	LCPME – Nancy
Mme Astrid Pinzano	Directrice de recherche	Invitée	IMoPA – Nancy
M. Franck Cleymand	Maître de conférences, HDR	Directeur de thèse	IJL – Nancy
Mme Solenne Fleutot	Maître de conférences	Codirectrice de thèse	IJL – Nancy

Remerciements

Je tiens tous d'abord à remercier l'ensemble de mes membres du jury et particulièrement les rapporteurs qui ont lu ce « petit » manuscrit. Merci à Fabien Grasset pour l'attention (depuis le Japon) qu'il a apporté à mes travaux de recherches et les conseils pertinents ainsi que les remarques à apporter au manuscrit de thèse et à la compréhension de la DLS. Merci également à Corinne Chanéac dont les commentaires et remarques m'ont permis de comprendre encore mieux la formation de mes « bébés » nanoparticules et merci pour les moments passés ensemble à l'école résidentielle et au congrès à Toulouse.

Je remercie également le président du jury Jean-Jacques Gaumet ainsi que Sylvain Miraux pour avoir examiné ma thèse et pour les discussions qui en ont suivies. Je tiens à remercier aussi Cédric Carteret qui a participé à mon jury de thèse et qui m'a suivie depuis le début de ma scolarité à la FST (et le premier à me pousser à travailler). Je remercie enfin Astrid Pinzano qui a aussi participé à mon jury de thèse et qui m'a beaucoup appris sur l'aspect biologique et IRM de mes nanoparticules.

Merci aussi à mon directeur de thèse Franck Cleymand qui m'a accompagné et aidé dans les moments clés pour cette thèse.

Je suis très reconnaissant auprès de mon autre directeur de thèse en la personne de Solenne Fleutot. C'est grâce à elle que j'ai pu vivre cette expérience de thèse où je me suis amusé tout le long (tout cela est parti d'une rencontre fortuite dans le tram en plein été !!!). Elle m'a accompagné tout le long de cette thèse (des manips jusqu'à la pause-café) et elle m'a fait aimé le domaine des nanos.

Je voudrais remercier aussi toutes les personnes qui m'ont formé sur les différentes techniques de caractérisation ou qui m'ont aidé. Merci à Sylvie Migot pour sa formation à la microscopie électronique et pour son aide lors des nombreuses pannes du microscope. Merci également à Lionel Aranda pour les mesures d'analyses thermiques, à Sébastien Diliberto pour les mesures en spectroscopie Mössbauer, à Sébastien Hupont pour les mesures de spectroscopie vibrationnelle, à Mélanie Emo pour la microscopie à haute résolution. Enfin, merci à Stéphane Suire et Tom Ferté pour leur aide sur le magnétisme.

Je voudrais également remercier Christel Henrionnet du laboratoire IMoPA qui a réalisé les tests biologiques sur mes nanoparticules et avec qui j'adore discuter.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe RMN du laboratoire CRM² pour leur accueil et notamment Sabine Bonnet qui a accepté ma « folle » idée d'utiliser la relaxométrie sur mes nanoparticules et merci pour tout l'aide sur cette technique (que ce soit dans les manips comme dans la rédaction). Merci aussi à Sébastien Leclerc qui a réalisé les premières images IRM des nanos (et en plus qui sont magnifiques !!).

Je voudrais remercier aussi les personnes sans qui je ne serais pas là actuellement. Tout d'abord, un grand merci à Christophe Rapin et à Sébastien Cahen qui m'ont montré les côtés amusants (et explosifs) de la chimie et qui m'ont permis de rester dans ce domaine. Merci également à Claire Hérold qui me suis depuis mon stage de L3. Dommage que je n'ai appris que bien tard que tu es une aussi grande fan de rugby que moi…

Un grand merci à Sébastien Fontana qui m'a poussé fortement à travailler, notamment en M2 pour que je puisse avoir ma thèse et avec qui j'adore discuter.

Enfin, je voudrais remercier Anne Vernière et Emmanuel Lamouroux pour leur aide et conseils qu'ils m'ont donné lors des comité de suivie pour améliorer ma thèse.

Après les remerciements des personnes qui ont contribué scientifiquement à ces travaux de thèses, il faut remercier les personnes avec qui j'ai passé mon temps social au labo (et notamment à la pause-café).

Tout d'abord, je voudrais remercier le premier avec qui j'ai passé mes pauses : Lilian Moumaneix. En effet, il m'a initié à la notion de « 10 minutes maximum », chose que j'ai toujours respecté par la suite. Ces moments étaient ponctués par la présence de Pauline Haraux qui permettait de rallonger légèrement ces 10 minutes.

Je voudrais remercier Aurelia Poerio, elle m'a le plus supporté durant ces trois années et a essayé de m'apprendre quelques mots italiens (à part ciao, c'est la seule chose que j'ai retenue).

Même si nous nous sommes pas croisés souvent dans le bureau, je remercie Amélia Aubry et Bertrand Guibert qui ont du partager la place avec tous les stagiaires (c'était dur à des moments de s'assoir à nos places !!!) et voir tous les gens venir dans le bureau pour discuter.

Je remercie énormément Killian (alias Kévin) Henry, Abdoul (ou Abdul pour les intimes) Azise Bande, amis de la faculté et qui sont venus me retrouver à l'IJL pour faire aussi une thèse. Et comble de chance, leurs bureaux se sont trouvés juste à côté du mien (je plains encore les gens qui devaient passer par là, ils étaient sur de ne plus travailler de la demi-journée). Nos conversations à travers les couloirs et les fenêtres étaient mythiques, notamment quand on possédait des thunes et qu'on était à l'aise financièrement. Cela va permettre à (maître) Arthur Tausch et à Mauricio Pavia de pouvoir travailler correctement (merci à vous deux pour votre présence, votre bonne humeur et pour tous les délires partagés !!). Merci également à Loris Rapado-kun pour toutes ces parties de jeux de sociétés (Mini-Rogue !!!!).

Un grand merci à Nicolas Martin avec qui j'ai réalisé la quasi-totalité de mes enseignements de TP. Nous nous sommes bien amusés ensemble et tu as toujours été de bons conseils. J'espère arriver au même stade que toi dans ma carrière.

Merci aussi à tous les membres de Pause IJL : Adèle Léon (grâce à toi, je faisais mon sport en t'écoutant raconté ton crosfit), Nathan Boulangeot (Nathounet, le roi de TM), Clovis Lapointe (Caporal Stagiaire et nos chants mythiques de cet été 2022), Baptiste Luzu (au moins, tu as pu détrôner plusieurs fois le roi TM), Marine Baquet (je me souviendrai à vie de cette belle triche sur TM !!), Maryam Martirosyan (je t'ai peut être convertie à la chimie après ma soutenance), Maxence Antoine (maintenant, je peux faire les jeudis Smash), Antoine Marsigny (le nouveau challenger sur TM, t'inquiète je crois à ton règne sans partage dans ce jeu), Corentin Pfaff (on va pouvoir jouer à Wingspan, notamment la version Asie). Je remercie également les doctorants du 3ème étage (l'ombre de l'IJL, il ne faut jamais aller là-bas !!), notamment Cécile Rampelberg, Hélène Quehen, Widad Ayadh, Lucie Gutman et Juan Macchi. Un grand merci à Sébastien Geiskopf, un pilier plus ancien que moi au sein de l'IJL (et en plus, tu augmentes ton nombre d'année au sein du labo, tu vas bien finir directeur !) qui m'a beaucoup aidé pour mettre en place la soutenance à distance. Enfin, merci à tous les doctorants que je n'ai pas cité mais que j'ai côtoyé tout au long de ma vie à l'IJL (Catalina, Dominique, Thiago, Alix, Victor, Arnaud, Kathleen, Romain, Gaël, Joseph…).

Tout ce travail n'a pas pu être réalisé sans l'aide de stagiaires. Tout d'abord, je voudrais remercier énormément Amel Cherraj qui est venue au sein de l'équipe en stage pour, je cite, « m'amuser à jouer avec des nanos ». Maintenant, nos bébés nanos sont devenus grandes et tu vas pouvoir les faire développer comme tu veux (mais sans polymère). Merci aussi à Pauline Felici qui, en plus de son stage sur toutes les dilutions pour la DLS, a du supporter Amel et moi (et je pense que ce n'était pas facile).

Ensuite, je voudrais remercier Morgane Kessler. En effet, elle a eu la folie d'accepter mon sujet de stage, de venir tous les jours de Metz et cela après la pandémie. Au moins, on a travaillé tranquillement car on était les seuls à l'IJL : tu as fait un travail excellent et le fait d'avoir eu un premier stagiaire aussi travailleur et impliqué que toi m'a confirmé l'envie de continuer dans la recherche pour continuer l'encadrement de stagiaires et de thésards.

Je remercie Claire Porzyc, étudiante en BTS à l'époque, pour m'avoir aidé sur tous les tests de lavage des nanoparticules (je ne sais pas combien de colonnes de $KMnO_4$ tu as préparé mais, cela se rapproche de la cinquantaine au bas mot).

Mes remerciements vont ensuite à mes deux stagiaires de M1 chimistes : Mohamed El Botakmanti et Saloum Sakho. J'ai passé un super moment avec vous deux, notamment nos longues discussions en microscopie. Vous avez apporté une bonne humeur et un travail excellent, c'était un plaisir de travailler avec vous deux.

Je remercie également ma dernière stagiaire, Emilie Bianchi, qui au début était timide mais qui a vite montré sa vraie nature. D'un stage sur des molécules organiques, nous sommes passés à un stage sur de la relaxométrie et de l'IRM (tout ça car j'ai eu une idée folle juste avant d'écrire ta convention).

Sans vous sept, mes travaux n'auraient pas été les mêmes, je vous remercie fortement.

Un grand merci aussi à tous les stagiaires que j'ai côtoyé durant ma thèse au sein de l'équipe et qui ont participé de proche ou de loin à mes travaux et à la vie de mon bureau (Justine, Julie, Corentin, Stéphanie). Enfin, merci à Lyns Verel Che Dji que j'ai vu passé de stagiaire pour développer les profils NMRD à thésard au sein de notre équipe : profite de ces trois années, elles vont passées très vite mais tu vas adorer.

Je voudrais remercier mes amis qui m'ont accompagné tout au long de ma thèse et même avant. Tout d'abord, mon binôme de TP de chimie et partenaire de jeux, bêtises et autre Ridvan Ince. Tu m'as vu dans tous mes états avant, pendant et maintenant après la thèse. Je ne me serais jamais autant amusé en cours, en TP et en thèse sans ta présence. Dans quelques années, on se retrouvera dans le même laboratoire. Merci aussi à Pierre Charles Fribol, même si tu es un grand fan d'un autre joueur de tennis que Djoko (je n'arrive pas à citer son nom, c'est dur), nos sorties au K restent un super moment !!

Je voudrais aussi remercier Ophélie Devignon et Youri Duchêne. Vous êtes tellement géniaux tous les deux, chaque soirée avec vous permet de se revigorer. Un grand merci à ma cheffe adorée, Delphine Rieuf, qui est toujours présente avec le sourire !

Merci à ma Dream Team (Emilien, Hugo, Tommy, Pauline, Killian et Azise) qui ont toujours été présents, notamment pour des bons restos !!!!

Merci à tous les Srabs (Adrien, Nathan, Stanislas, William, Elodie, Rémi, Olympe), vous m'avez entendu (du faible au fort selon le moment de la soirée et du jeux ^^) et particulièrement Adrien qui a fait toutes ces photos magnifiques lors de ma soutenance et du pot de thèse.

Un grand merci à mes amis de très longue date (ça fait un peu vieux) Marc, Pierre et Solène qui sont là depuis le lycée (ça remonte vraiment maintenant). Un merci aussi à Bradley, Gauthier, Loïc, ma famille de substitution meusienne !

Mes derniers remerciements iront à ma famille, notamment mes parents et mon frère qui m'ont toujours soutenue (désolé, je n'ai pas mis de molécules de petit chien dans ma thèse frérot). Merci aussi à mes cousines et à mon oncle qui sont descendues de leurs montagnes savoyardes pour venir me voir ainsi que toute ma famille qui m'a écouté (ou non) pendant ma soutenance.

Enfin, je remercie la personne qui a été la plus proche de moi pendant ces trois années de thèse et même un peu avant, cette personne est ma copine, fiancée, confidente, compagne de jeux. Tu as toujours été là pour moi. Je t'aime Clara Fontaine.

Il me reste plus qu'à conclure sur une citation d'un grand personnage :

Je s'appelle Groot !

Groot

Table des matières générale

Introduction générale 1

Chapitre 1 7

Etat de l'Art 7

1. Les oxydes de fer naturels 13

1.1. Structure cristalline de la magnétite et de la maghémite 14

1.1.1. Magnétite 14

1.1.2. Maghémite 15

1.2. Techniques différenciant la magnétite de la maghémite 16

1.2.1. Diffraction des Rayons X 16

1.2.2. Spectroscopie infrarouge 17

1.2.3. Spectroscopie Mössbauer 17

1.2.4. Spectroscopie Raman 18

2. Propriétés magnétiques 19

2.1. Généralités sur le magnétisme 19

2.2. Magnétisme d'une nanoparticule 24

2.2.1. Sources d'anisotropie 24

2.2.2. Le superparamagnétisme 27

3. Les voies de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer 33

3.1. Les mécanismes de synthèse de nanoparticules 33

3.1.1. La théorie de LaMer : première théorie à décrire ces mécanismes 33

3.1.2. Amélioration de la théorie de LaMer sur les mécanismes de synthèse de nanoparticules 34

3.2. Les principales méthodes de synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer 35

3.2.1. La coprécipitation 37

3.2.2. La décomposition thermique 39

3.2.3. Synthèse hydrothermale 41

3.2.4. Voie sol-gel 41

3.2.5. Méthodes polyols 42

3.2.6. Synthèse en microémulsion 42

3.2.7. Synthèse par flux d'injection 43

3.2.8. Voie électrochimique 43

3.2.9. Sonochimie 43

3.2.10. Aérosol 44

3.3. Conclusion 44

4. Apport des micro-ondes dans les sciences 44

4.1. Introduction à la synthèse micro-ondes 44

4.2. Principes du chauffage micro-ondes 45

4.2.1. Mécanisme de chauffage 45

4.2.2. Propriétés diélectriques 47

4.3. Avantages du chauffage micro-ondes 49

4.4. Les réacteurs micro-ondes : multimodes vs monomodes 51

5. Méthodes de lavage 52

5.1. Centrifugation 53

5.2. Procédé de sélection de taille par précipitation 54

5.3. Dialyse 54

5.4. Ultrafiltration 55

5.5. Séparation magnétique 56

5.6. Les autres techniques de purification 56

5.7. Conclusion 57

6. La stabilisation des nanoparticules d'oxyde de fer en solution 57

6.1. Comportement des nanoparticules d'oxyde de fer dans une solution 57

6.2. Mécanismes de stabilisation des nanoparticules d'oxyde de fer 58

6.2.1. La stabilisation électrostatique 58

6.2.2. La stabilisation stérique 61

6.3. Les différentes méthodes de stabilisation des nanoparticules 61

6.4. Principales molécules utilisées pour le domaine biomédical 63

6.5. Conclusion 64

7. L'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dans les applications biomédicales. 65

7.1. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer 65

7.2. L'hyperthermie 67

7.3. Vectorisation des médicaments 69

7.4. L'imagerie médicale 70

7.5. Conclusion 72

8. L'IRM : son principe, son fonctionnement et son utilisation avec des agents de contraste 73

8.1. Historique de l'IRM 73

8.2. Le principe de l'IRM 74

8.2.1. La Résonance Magnétique Nucléaire 74

8.2.2. L'IRM 78

8.3. Les agents de contrastes 81

8.3.1. Utilisation des agents de contrastes en IRM 81

8.3.2. La relaxivité 82

8.3.3. Les différents types d'agents de contraste 84

8.4. Conclusion 89

9. Conclusion générale du chapitre 1 90

10. Bibliographie Chapitre 1 91

Chapitre 2 107

Comparaison de deux méthodes de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques : coprécipitation vs micro-ondes 107

1. L'ajout de ligands : un moyen d'augmenter la monodispersité 111

1.1. Les nanoparticules d'oxyde de fer nues 111

1.1.1. La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer nues 111

1.1.2. Taille et morphologie des nanoparticules d'oxyde de fer 112

1.2. Le choix du ligand 113

1.3. L'acide citrique : un ligand permettant d'augmenter la monodispersité 114

2. Passage à la synthèse micro-ondes 115

3. Conclusion générale du chapitre 2 116

4. Bibliographie Chapitre 2 117

Chapitre 3 133

Optimisation du procédé micro-ondes 133

par un plan d'expériences 133

1. La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par micro-ondes 137

2. Description et construction du plan d'expériences 138

2.1. Définitions 138

2.2. Choix des facteurs et des niveaux 138

2.3. Choix de la table 139

2.4. Déroulement des essais : reproductibilité et répétabilité 141

2.5. Choix des réponses 141

3. Caractérisation d'un essai issu du plan d'expériences pour déterminer les réponses 142

3.1. Microscopie électronique en transmission 143

3.2. Diffusion dynamique de la lumière 144

3.3. Diffraction des Rayons X 144

3.4. Spectroscopie infra-rouge 145

3.5. Analyses thermiques 146

3.6. Caractérisations magnétiques 147

4. Déroulement et statistiques permettant de déterminer les paramètres optimums du micro-ondes 149

5. Amélioration d'un dernier paramètre de synthèse : le lavage des nanoparticules 149

5.1. Préparation du plan d'expériences : choix des facteurs, des niveaux et des réponses 149

5.2. Exploitation du plan d'expériences 152

6. Conclusion générale du chapitre 3 _____ 154

7. Bibliographie Chapitre 3 _____ 156

Chapitre 4 _____ 189

Relation nanostructure/composition/propriétés magnétiques dans les nanoparticules d'oxyde de fer _____ 189

1. Une première approche pour distinguer la magnétite et la maghémite _____ 193

1.1. La diffraction des Rayons X _____ 195

1.2. La spectroscopie infra-rouge _____ 196

2. Utilisation de techniques plus performantes pour déterminer la quantité de magnétite et de maghémite _____ 197

2.1. La microscopie électronique en transmission à haute résolution _____ 197

2.2. La spectroscopie Mössbauer _____ 200

2.3. La spectroscopie Raman _____ 201

3. Détermination d'un système homogène ou cœur@coquille par des mesures magnétiques _____ 203

4. Conclusion générale du Chapitre 4 _____ 205

5. Bibliographie Chapitre 4 _____ 206

Chapitre 5 _____ 221

Etude de la stabilité des nanoparticules après stérilisation et en milieu physiologique _ 221

1. La stérilisation des nanoparticules _____ 225

1.1. Le choix de la méthode de stérilisation _____ 225

1.2. Caractérisation des nanoparticules avant et après la stérilisation _____ 226

1.3. Conclusion _____ 226

2. Comportement des nanoparticules dans un sérum physiologique _____ 226

2.1. Etude des liquides biologiques _____ 226

2.2. Comportement des nanoparticules dans du sérum physiologique _____ 227

2.3. Conclusion _____ 227

3. Conclusion générale du chapitre 5 _____ 228

4. Bibliographie Chapitre 5 _____ 229

Chapitre 6 _____ 257

Applications en IRM : cytotoxicité et mesure de relaxivité _____ 257

1. Etude biologique des nanoparticules d'oxyde de fer _____ 261

1.1. Etude de l'internalisation cellulaire _____ 261

1.1.1. Préparation des cellules _____ 261

1.1.2. Ensemencement des cellules 262
1.1.3. Coloration de Perls 262
1.1.4. Etude microscopique de l'internalisation cellulaire des nanoparticules 263
1.2. Etude de l'activité mitochondriale 263
1.2.1. Tests MTT 264
1.2.2. Tests LDH 265
2. Etude IRM des nanoparticules d'oxyde de fer 267
2.1. Etude de la relaxivité et images IRM 267
2.2. Etude des profils NMRD 269
3. Conclusion générale du Chapitre 6 271
4. Bibliographie Chapitre 6 272
Conclusion générale 297

Introduction générale

Les nanomatériaux sont de plus en plus utilisés au quotidien et cela, dans divers domaines de recherche en expansion tels que le stockage d'énergie avec les batteries, l'environnement avec la dépollution des eaux et des sols, le stockage d'informations avec la spintronique. Il y a donc de plus en plus d'intérêts scientifiques à développer ces nanomatériaux parmi lesquels les nanomatériaux magnétiques sont particulièrement étudiés. En effet, ces matériaux sont utilisés pour des applications à visées importantes comme la spintronique pour les ordinateurs quantiques ou l'utilisation dans la médecine pour traiter le cancer par exemple.

Parmi, les nanomatériaux magnétiques, les nanoparticules d'oxydes de fer pourront être utiles dans différentes applications biomédicales comme l'hyperthermie, la vectorisation de médicament, les agents de contraste en Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) du fait de leurs propriétés magnétiques.

L'échelle nanométrique permet la modulation des propriétés magnétiques et d'atteindre, pour les nanoparticules d'oxydes de fer, le caractère superparamagnétique. Cet état magnétique implique de ne pas avoir d'aimantation à température ambiante et sans application d'un champ magnétique extérieur. Cette absence de forces magnétiques attractives entre les nanoparticules permet d'éviter en solution une agrégation des nanoparticules, agrégation nuisible aux applications biomédicales. Pour obtenir ce caractère superparamagnétique, les nanoparticules d'oxyde de fer doivent posséder un diamètre inférieur à 20 nm : au-dessus de cette taille, elles auront un comportement magnétique de type ferrimagnétique et une agrégation possible des nanoparticules est à envisager. Plusieurs méthodes de synthèses existent pour obtenir des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétique (ou SPIONs pour Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) comme la coprécipitation, la décomposition thermique, le procédé sol-gel, … Chacune de ces techniques de synthèse possède des avantages comme des inconvénients à appréhender en fonction de l'application visée. Par exemple, l'utilisation des nanoparticules pour des applications en médecine nécessite des propriétés contrôlées et leur stabilité dans un milieu aqueux.

Actuellement, les méthodes de synthèse de nanoparticules en solvant aqueux, comme la coprécipitation par exemple, conduisent généralement à l'obtention de nanoparticules polydisperses en taille et parfois en forme et par conséquent à des propriétés physico-chimiques et magnétiques mal contrôlées. Si une méthode comme la voie hydrothermale a pu améliorer la monodispersité, un nouveau procédé basé sur l'utilisation des micro-ondes semble prometteur pour conduire à la formation de nanoparticules de taille, forme et composition contrôlée. Grâce aux micro-ondes entraînant une vibration moléculaire commune, un échauffement identique du solvant utilisé est atteint évitant un gradient de température au cœur du réacteur de synthèse, ce gradient de température étant corrélable à la distribution de taille des nanoparticules d'oxyde de fer.

Pour améliorer la stabilité colloïdale des nanoparticules, notamment en limitant leur agrégation, plusieurs solutions existent comme la formation de systèmes hybrides dits cœur-coquille, inorganique-organique ou encore nanoparticules fonctionnalisées. Une des solutions les plus simples et les plus faciles à mettre en œuvre est l'ajout d'une molécule greffée en surface du cœur inorganique d'oxyde de fer: cette molécule est nommée ligand. Cette fonctionnalisation de surface, avec des molécules de tailles variées, contribue à stabiliser les nanoparticules d'oxyde de fer dans un milieu aqueux sans phénomène d'agrégation.

En couplant la fonctionnalisation des nanoparticules par des ligands à une synthèse par un procédé micro-ondes, un contrôle précis sur la taille, la forme et les propriétés physico-chimiques et magnétiques est envisageable.

Du fait de leur caractère superparamagnétique, les nanoparticules d'oxydes de fer d'une taille inférieure à 20 nm peuvent être utilisées en hyperthermie ou en tant qu'agent de contraste pour l'IRM ou les deux : elles ont donc un rôle pour la thérapie, le diagnostic ou la théranostique. L'IRM est une technique d'imagerie non invasive qui est devenue courante lors d'examens médicaux. Grâce à la présence plus ou moins abondante des molécules d'eau au sein de notre organisme, des images des organismes peuvent être obtenues en utilisant la relaxation magnétique des spins nucléaires des protons de l'eau. Or, selon leur environnement physiologique (et donc chimique), cette relaxation n'est pas identique d'un tissu à l'autre et des contrastes vont alors apparaître. Afin d'accentuer les contrastes, les nanoparticules magnétiques (soit paramagnétiques avec des complexes de gadolinium, soit superparamagnétiques avec des nanoparticules d'oxyde de fer) sont utilisées pour permettre de réduire les temps d'analyse et surtout pour mettre en évidence des pathologies comme la présence de cellules tumorales. L'utilisation de ces nanoparticules peut ainsi permettre d'avoir un meilleur contrôle des détections des cancers qui, rappelons-le, sont une des causes majeures de décès dans le monde avec 18 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2018, d'après le chiffre donné par le Centre International de Recherche sur le Cancer au 07 mars 2022. Il y a donc un intérêt de plus en plus important à détecter au plus tôt et au plus rapidement ces maladies.

C'est dans ce contexte que nos travaux se sont concentrés sur l'élaboration contrôlée des nanoparticules d'oxyde magnétiques et notamment d'oxyde de fer superparamagnétiques. L'objectif est d'obtenir des nanoparticules de taille contrôlée, stables dans un milieu aqueux et avec de bonnes propriétés physico-chimiques et magnétiques. Ce travail se situe dans la continuité d'un travail de thèse antérieur au sein de notre équipe de recherche sur la synthèse par coprécipitation avec l'ajout d'un ligand *in-situ* pour stabiliser les nanoparticules. Le choix du ligand s'est porté sur l'acide citrique qui est une molécule abondante, peu onéreuse et présentant une bonne affinité avec le cœur d'oxyde de fer. Afin d'augmenter la monodispersité de ces nanoparticules, une méthode de synthèse a été développée via un plan d'expériences : la voie micro-ondes. Le but de ce plan d'expériences est de déterminer les paramètres optimums du micro-ondes pour obtenir les meilleures nanoparticules pour des utilisations dans des domaines biomédicaux. Pour cela, plusieurs techniques de caractérisation disponibles au sein du parc instrumental de notre laboratoire de recherche ont été utilisées pour mieux appréhender la relation entre la nanostructure et les propriétés physico-chimiques et magnétiques de nos nanoparticules. Des études d'interactions entre les nanoparticules et des cellules ont été réalisées pour déterminer leur potentielle cytotoxicité grâce à l'activité des mitochondries (organites présents au sein de toutes les cellules et permettant, entre autres, la formation d'énergie sous forme d'ATP et la mort cellulaire programmée ou apoptose). Ces études ont été menées en collaboration avec le laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Physiopathologie Articulaire (IMoPA, UMR 7365 CNRS, Université de Lorraine). Enfin, une étude de la relaxométrie des nanoparticules a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique, Modélisation (CRM^2, UMR 7073 CNRS, Université de Lorraine).

Ce manuscrit de thèse est composé de six chapitres.

Un premier chapitre est consacré à la bibliographie du sujet. Une présentation des propriétés structurales et magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer est réalisée, suivie d'une description des différentes techniques de synthèses ainsi que du principe de fonctionnement des micro-ondes. Les différentes méthodes de lavages des nanoparticules sont présentées avant d'aborder les différents moyens de les stabiliser. Enfin, une dernière partie est consacrée à l'utilisation des nanoparticules d'oxydes de fer dans le domaine biomédical (hyperthermie, vectorisation, imagerie médicale) et plus particulièrement en tant qu'agent de contraste en IRM.

Le deuxième chapitre présente la synthèse conventionnelle de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques par coprécipitation, puis l'apport de l'ajout d'un ligand dans cette synthèse, ainsi que la synthèse micro-ondes de nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées. Une comparaison des deux méthodes est réalisée afin de déterminer la méthode de synthèse la plus adaptée à l'objectif fixé.

Le troisième chapitre vise à déterminer les paramètres optimums du procédé de synthèse par micro-ondes pour synthétiser les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. Pour cela, un plan d'expériences a été mis en œuvre. Une description de ce plan d'expériences puis une étude de ce plan sont développées. Enfin, un dernier plan d'expériences sur un paramètre clé de la synthèse a été construit : le lavage des nanoparticules.

Le quatrième chapitre porte sur la relation fine entre la nanostructure, la composition et les propriétés magnétiques au sein des nanoparticules d'oxyde de fer. Différentes techniques de caractérisation avancées ont ainsi permis de déterminer la composition quasi exacte de nos nanoparticules et la relation avec les propriétés magnétiques de nos matériaux.

Le cinquième chapitre décrit les étapes préliminaires à des tests possibles en biologie avec l'objectif d'évaluer l'influence de la stérilisation et de l'utilisation de sérum physiologique sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules synthétisées. En effet, différents traitements sont appliqués avant d'étudier la cytotoxicité des nanoparticules. Or, ces traitements pourraient modifier les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'oxyde de fer.

Enfin, dans le sixième chapitre, une étude de l'internalisation cellulaire ainsi que de l'activité mitochondriale est réalisée pour déterminer la toxicité éventuelle des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées synthétisées. Puis, une étude de la relaxométrie en fonction la concentration en nanoparticules est présentée visant à évaluer leur efficacité en tant qu'agent de contraste en IRM. Ce travail est complété par une étude de la relaxométrie en fonction du champ magnétique appliqué (profils NMRD).

Chapitre 1

Etat de l'Art

Table des matières Chapitre 1

1. Les oxydes de fer naturels 13

1.1. Structure cristalline de la magnétite et de la maghémite 14
1.1.1. Magnétite 14
1.1.2. Maghémite 15

1.2. Techniques différenciant la magnétite de la maghémite 16
1.2.1. Diffraction des Rayons X 16
1.2.2. Spectroscopie infrarouge 17
1.2.3. Spectroscopie Mössbauer 17
1.2.4. Spectroscopie Raman 18

2. Propriétés magnétiques 19

2.1. Généralités sur le magnétisme 19

2.2. Magnétisme d'une nanoparticule 24
2.2.1. Sources d'anisotropie 24
2.2.1.1. Anisotropie magnétocristalline 24
2.2.1.2. Anisotropie de surface 25
2.2.1.3. Anisotropie effective 26
2.2.1.4. Anisotropie de forme 26
2.2.2. Le superparamagnétisme 27

3. Les voies de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer 33

3.1. Les mécanismes de synthèse de nanoparticules 33
3.1.1. La théorie de LaMer : première théorie à décrire ces mécanismes 33
3.1.2. Amélioration de la théorie de LaMer sur les mécanismes de synthèse de nanoparticules 34

3.2. Les principales méthodes de synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer 35
3.2.1. La coprécipitation 37
3.2.2. La décomposition thermique 39
3.2.3. Synthèse hydrothermale 41
3.2.4. Voie sol-gel 41
3.2.5. Méthodes polyols 42
3.2.6. Synthèse en microémulsion 42
3.2.7. Synthèse par flux d'injection 43
3.2.8. Voie électrochimique 43
3.2.9. Sonochimie 43
3.2.10. Aérosol 44

3.3. Conclusion 44

4. Apport des micro-ondes dans les sciences 44

4.1. Introduction à la synthèse micro-ondes 44

4.2. Principes du chauffage micro-ondes 45
4.2.1. Mécanisme de chauffage 45
4.2.2. Propriétés diélectriques 47

4.3. Avantages du chauffage micro-ondes 49

4.4. Les réacteurs micro-ondes : multimodes vs monomodes 51

5. Méthodes de lavage 52

5.1. Centrifugation 53

5.2. Procédé de sélection de taille par précipitation 54

5.3. Dialyse 54

5.4. Ultrafiltration 55

5.5. Séparation magnétique 56

5.6. Les autres techniques de purification 56

5.7. Conclusion 57

6. La stabilisation des nanoparticules d'oxyde de fer en solution 57

6.1. Comportement des nanoparticules d'oxyde de fer dans une solution 57

6.2. Mécanismes de stabilisation des nanoparticules d'oxyde de fer 58

6.2.1. La stabilisation électrostatique 58

6.2.2. La stabilisation stérique 61

6.3. Les différentes méthodes de stabilisation des nanoparticules 61

6.4. Principales molécules utilisées pour le domaine biomédical 63

6.5. Conclusion 64

7. L'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dans les applications biomédicales. 65

7.1. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer 65

7.2. L'hyperthermie 67

7.3. Vectorisation des médicaments 69

7.4. L'imagerie médicale 70

7.5. Conclusion 72

8. L'IRM : son principe, son fonctionnement et son utilisation avec des agents de contraste 73

8.1. Historique de l'IRM 73

8.2. Le principe de l'IRM 74

8.2.1. La Résonance Magnétique Nucléaire 74

8.2.1.1. Le signal RMN 74

8.2.1.2. La relaxation 77

8.2.2. L'IRM 78

8.2.2.1. Marquage spatial et obtention d'images 78

8.2.2.2. Les contrastes 80

8.3. Les agents de contrastes 81

8.3.1. Utilisation des agents de contrastes en IRM 81

8.3.2. La relaxivité 82

8.3.2.1. Définition 82

8.3.2.2. Mesure de la relaxivité 83

8.3.3. Les différents types d'agents de contraste 84

8.3.3.1. Les agents de contrastes paramagnétiques 84
8.3.3.2. Les agents de contraste superparamagnétiques 86

8.4. Conclusion 89

9. Conclusion générale du chapitre 1 90

10. Bibliographie Chapitre 1 91

Dans ce premier chapitre, les principaux oxydes de fer seront présentés et leurs structures cristallographiques seront décrites avant d'aborder les techniques de caractérisation de ces oxydes. Après un rappel général sur le magnétisme, les propriétés magnétiques spécifiques des oxydes de fer à l'échelle nanométrique seront détaillées. Les mécanismes et principales méthodes de synthèse, de lavage et de fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer seront décrits. La description de la synthèse micro-ondes, ses principes et avantages seront détaillés. Enfin, une description des applications des nanoparticules d'oxydes de fer dans la biologie et notamment en Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) sera réalisée.

1. Les oxydes de fer naturels

Le fer est un élément chimique connu de tout le monde, essentiel à la Vie notamment dans le transport des molécules de O_2 dans le sang et facile d'accès. En effet, il existe essentiellement sous forme d'oxyde et est très abondant sur les planètes telluriques de notre Système Solaire, notamment sur la Terre, dans la croûte terrestre (4ème élément le plus abondant) [1]. Ces oxydes se trouvent principalement sous la forme de minerais et possèdent des degrés d'oxydation différents. Il existe principalement quatre structures d'oxydes de fer à l'état naturel :

- La wüstite ou $Fe_{1-x}O$. Ce composé est très rare et ne se trouve que dans certains composés réducteurs. Le degré d'oxydation du fer est +II pour cet oxyde qui cristallise dans une structure cubique de type F_{m3m} (Figure 1. 1.a)
- L'hématite ou α-Fe_2O_3 est l'oxyde de fer le plus abondant. Le degré d'oxydation du fer est +III et cet oxyde cristallise dans une structure trigonale de type R_{3ch} (Figure 1. 1.b)
- La magnétite ou Fe_3O_4 dont le nom provient de la région de Magnésia en Thessalie (Grèce) y est présent naturellement en quantité abondante. Le degré d'oxydation du fer est +II et +III et cet oxyde cristallise dans une structure spinelle de type $F_{d\bar{3}m}$ (Figure 1. 1.c)
- La maghémite ou γ-Fe_2O_3, dont le nom est une contraction de la magnétite et de l'hématite, cristallise dans la même structure que la magnétite (structure spinelle de type $F_{d\bar{3}m}$) et possède le même degré d'oxydation +III que l'hématite pour le fer (Figure 1. 1.d).

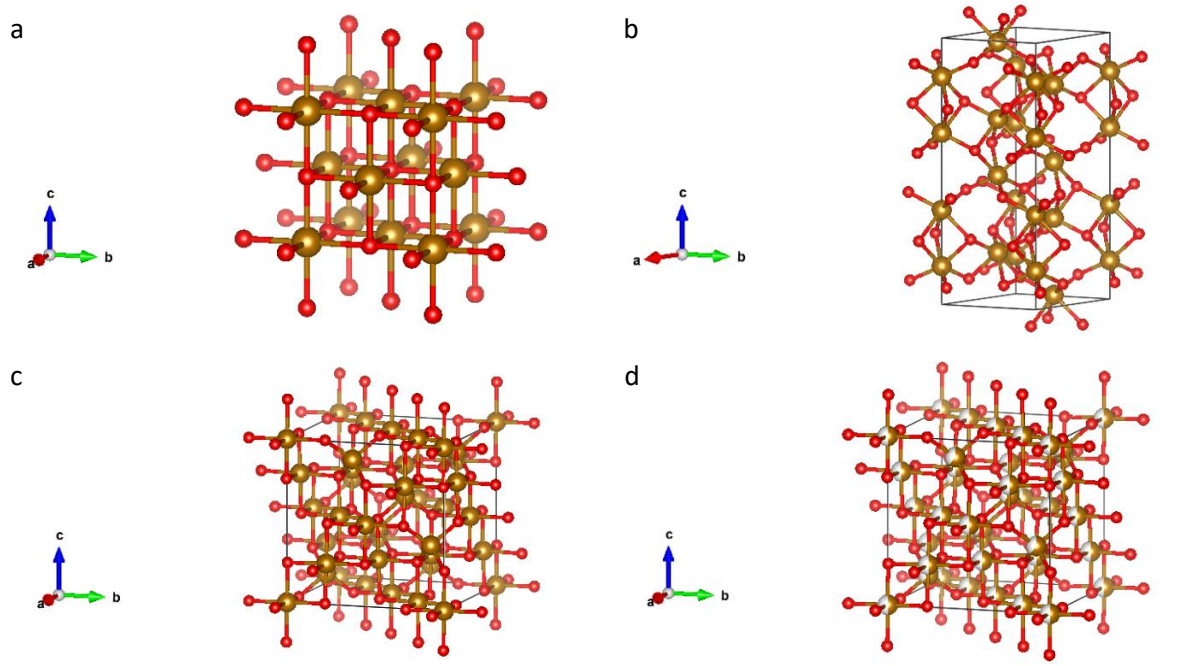


Figure 1. 1: Structure cristallographique des principaux oxydes de fer wüstite (a), hématite (b), magnétite (c) et maghémite (d).

Pour des applications dans le domaine du biomédical, et notamment l'IRM, les nanoparticules d'oxyde de fer possédant un caractère magnétique sont très utilisées : dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons principalement à la magnétite et à la maghémite.

1.1. Structure cristalline de la magnétite et de la maghémite

1.1.1. Magnétite

La magnétite cristallise dans une structure cubique de type spinelle. La structure spinelle a été décrite pour la première fois par W.H. Bragg et S. Nishikawa en 1915 [2,3]. Ils ont décrit une structure du minéral $MgAl_2O_4$ où le magnésium présente un degré d'oxydation de +II et l'aluminium de +III. La formule générale d'une structure spinelle est AB_2X_4 où A est un cation divalent et B un cation trivalent. Par la suite, plusieurs structures spinelles ont été décrites dont notamment celle de la magnétite (A = Fe^{2+}, B = Fe^{3+}, X = O^{2-})[4].

Dans la structure spinelle, la maille élémentaire est composée de 32 anions d'oxygènes O^{2-} formant un réseau cubique à faces centrées. Cette structure comporte 64 sites tétraédriques notées A et 32 sites octaédriques notées B. Les cations, quelque soit leur charge, vont occuper ces sites octaédriques et tétraédriques. Cette distribution des cations est définie selon le taux d'inversion noté λ et décrit selon la formule suivante $\lambda = \Sigma_A - 2$ avec Σ_A est la valence moyenne des cations en site A ramené à quatre atomes d'oxygène. La structure peut donc s'écrire $(A^{2+}_{1-2\lambda}B^{3+}_{2\lambda}[A^{2+}_{2\lambda}B^{3+}_{2-2\lambda}]O_4^{2-})$. Grâce à ce taux d'inversion, différentes structures spinelles peuvent être définies : le spinelle normal (λ = 0), le spinelle statiquement désordonné (λ = 0,33) et le spinelle inverse (λ = 0,5). La Figure 1. 2 montre un exemple

d'un spinelle direct de type $FeAl_2O_4$ (Figure 1. 2.a) et un exemple d'un spinelle inverse de type $FeFe_2O_4$ (Figure 1. 2.b).

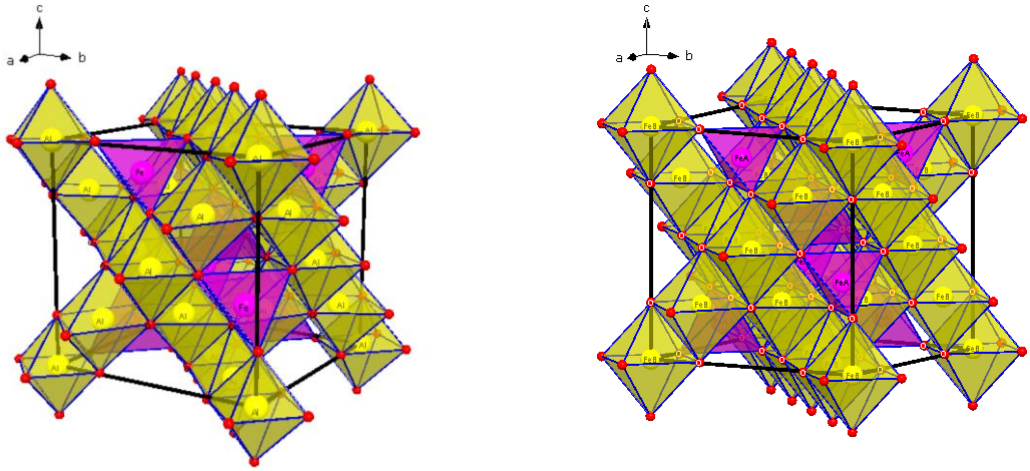


Figure 1. 2 : Structure cristallographique d'un spinelle direct $FeAl_2O_4$ avec les ions Al^{3+} dans les sites octaédriques et les ions Fe^{2+} dans les sites tétraédriques (a) et d'un spinelle inverse $FeFe_2O_4$ (b) avec les ions Fe^{3+} dans les sites tétraédriques et les ions Fe^{2+}dans les sites octaédriques.

La structure cristalline de la magnétite est celle d'un spinelle inverse. Son groupe d'espace est $F_{d\bar{3}m}$ (numéro 227) et son paramètre de maille est de 0,8395 nm. La maille élémentaire est une structure cubique à face centrée de 32 anions d'O^{2-}. La magnétite possède dans sa maille élémentaire 32 sites octaédriques et 64 sites tétraédriques. Seul un huitième des sites tétraédriques sont occupés par des ions Fe^{3+} (notés sites A) et la moitié des sites octaédriques sont occupés par des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} (notés sites B). Cette structure de spinelle inverse est favorisée par la meilleure stabilité des ions Fe^{2+} dans les sites octaédriques plutôt que dans les sites tétraédriques [4]. La formule générale de la structure de la magnétite est ainsi définie par $(Fe^{3+})_{tétra}[Fe^{2+}Fe^{3+}]_{octa}(O^{2-})_4$, la maille élémentaire étant composée de 56 atomes (soit Z = 8), avec a = b = c = 0,8395 nm et α = β = γ = 90° à température ambiante (fiche JCPDS 04-015-8200). Dans le cas d'une oxydation partielle des ions Fe^{2+} en Fe^{3+}, la formule de la magnétite devient $Fe_{3-\delta}O_4$ où δ correspond à l'écart à la stœchiométrie. Cette magnétite légèrement oxydée se nomme magnétite sous-stœchiométrique. La valeur de δ peut être comprise entre 0 (aucune oxydation des ions Fe^{2+} soit magnétite) et 0,33 (oxydation totale des ions Fe^{2+} en ions Fe^{3+} conduisant à la formation de γ-Fe_2O_3, la maghémite).

1.1.2. Maghémite

La maghémite γ-Fe_2O_3 est obtenue par oxydation totale des ions Fe^{2+} en Fe^{3+} de la magnétite. Afin d'assurer une neutralité électronique de la maille, des lacunes cationiques □ apparaissent. Cette présence de lacunes va ainsi générer différentes structures cristallographiques de la maghémite selon leur réarrangement [5] :

- Pour une répartition aléatoire de ces lacunes cationiques dans les sites octaédriques sans déformation de la maille, la maghémite conserve une structure cubique de type $F_{d\bar{3}m}$. Son paramètre de maille diminue par rapport au paramètre de maille de la magnétite et a pour

valeur 0,8354 nm à température ambiante (fiche JCPDS 04-013-7114). La formule de la maghémite est dans ce cas $(Fe^{3+})_{tétra}(Fe^{3+}_{5/3}\square_{1/3})_{octa}(O^{2-})_4$ [6–8]

- Pour une répartition légèrement organisée des lacunes dans les sites octaédriques sans déformation de la maille, un abaissement de la symétrie survient et la maghémite présente une structure cubique de type P_{4_132}. Le paramètre de maille est de 0,8346 nm (fiche JCPDS 04-016-4344). La formule est dans ce cas $(Fe^{3+}_8)_{tétra}(Fe^{3+}_{4/3}\square_{8/3}Fe^{3+}_{12})_{octa}(O^{2-})_{32}$ [6–8]
- Pour une répartition totalement organisée des lacunes dans les sites octaédriques, un abaissement de la symétrie survient et la maghémite passe d'une structure cubique à une structure tétragonale de type $P_{4_12_12}$. Les lacunes se mettent en ordre dans une superstructure composée de 3 mailles successives. Les paramètres de maille ont pour valeurs a = b = 0,83396 nm et c = 0,83221 nm à température ambiante (fiche JCPDS 04-007-2135). La formule est dans ce cas $(Fe^{3+}_{24})_{tétra}(Fe^{3+}_{40}\square_8)_{octa}(O^{2-})_{96}$ [6–8]

Comme cela vient d'être présenté, d'un point de vue cristallographique, les différences entre la magnétite et la maghémite dépendent de la répartition des lacunes cationiques. Différentes techniques de caractérisation permettent de différencier ces oxydes et leurs structures.

1.2. Techniques différenciant la magnétite de la maghémite

1.2.1. Diffraction des Rayons X

La première technique permettant de différencier deux structures cristallines est la diffraction des Rayons X (DRX). En effet, cette technique permet de déterminer la structure cristalline et les paramètres de maille, soit de distinguer la magnétite, la maghémite ou la magnétite sous-stœchiométrique. Par exemple, du fait de la contraction de la maille par la présence des lacunes cationiques dans la maghémite, son paramètre de maille est inférieur à celui de la magnétite, se traduisant par un décalage de ses raies de diffraction vers les hauts angles dans un diffractogramme (Figure 1. 3).

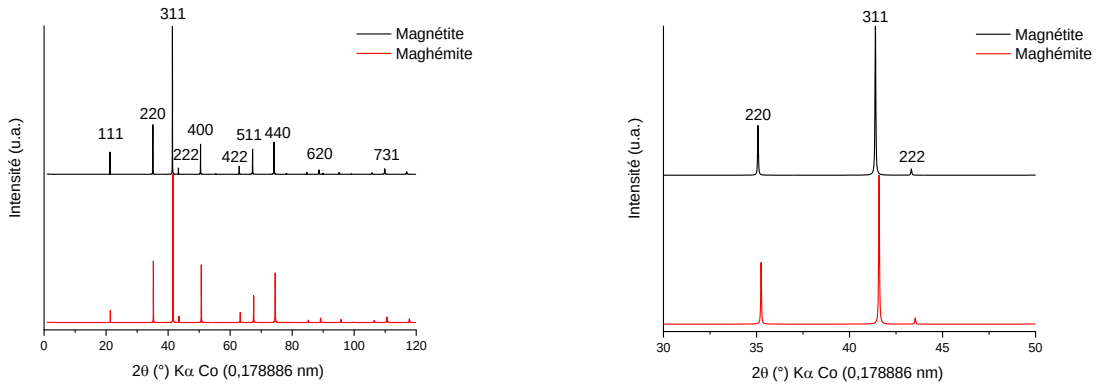


Figure 1. 3: Diffractogrammes théoriques de la magnétite massive Fe_3O_4 (en noir) et de la maghémite massive γ-Fe_2O_3 (en rouge) de 0 à 120° (à gauche) et avec un agrandissement sur la raie principale (311) pour montrer le décalage vers les hauts angles des raies pour la maghémite (à droite).

1.2.2. Spectroscopie infrarouge

La deuxième technique de caractérisation permettant de différencier un échantillon de magnétite d'un échantillon de maghémite est la spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF). Une poudre de magnétite ne va présenter qu'une seule bande de vibration entre 580 et 590 cm^{-1} alors qu'une poudre de maghémite va présenter une succession de bandes entre 500 et 800 cm^{-1} : cette succession de bandes est dépendante de l'organisation des lacunes cationiques dans la maghémite (Figure 1. 4) [9].

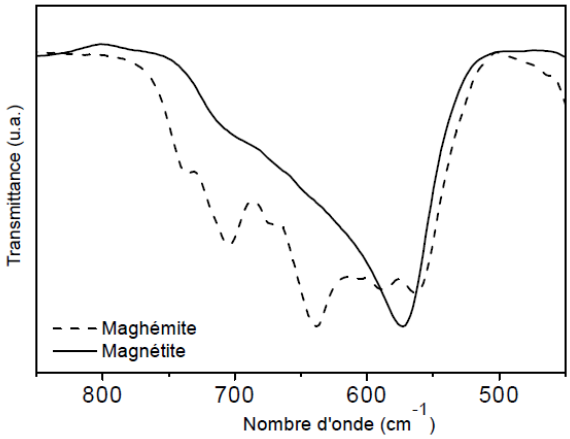


Figure 1. 4: Spectres infrarouge théoriques de la magnétite et de la maghémite [9].

Ces deux techniques permettent ainsi de déterminer de façon qualitative le type d'oxyde de fer synthétisé. Cependant, elles ne permettent pas de déterminer la part exacte d'oxydation au sein de l'échantillon, c'est-à-dire la valeur de l'écart à la stœchiométrie δ. Une troisième technique permet de déterminer avec précision cette déviation : la spectroscopie Mössbauer.

1.2.3. Spectroscopie Mössbauer

Pour déterminer avec précision la structure ainsi que la composition des oxydes et la présence des ions ferriques et ferreux, la spectroscopie Mössbauer est à envisager. Grâce à des rayons γ et à leur absorption, cette technique est très sensible au degré d'oxydation des atomes de fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}), à leur localisation, à la structure cristallographique et à l'état magnétique [10]. A température ambiante, la magnétite et la maghémite massive possèdent un sextuplet. La différence notable entre les deux oxydes de fer est la présence d'un doublet sur les quatre premiers pics Mössbauer de la magnétite ; ces doublets montrent la présence des ions Fe^{2+} dans la structure de la magnétite (Figure 1. 5).

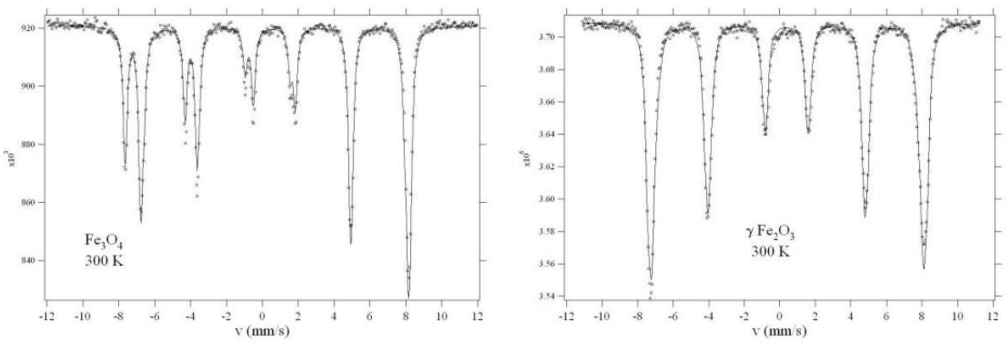


Figure 1. 5: Spectres Mössbauer de la magnétite Fe_3O_4 massive (gauche) et de la maghémite γ-Fe_2O_3 massive (droite) à température ambiante [10].

1.2.4. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une dernière technique permettant de distinguer la magnétite de la maghémite. Des photons Raman sont émis lors de l'illumination de l'échantillon par un faisceau laser, engendrant un phénomène de diffusion inélastique de la lumière. Cela génère un déplacement en fréquence (déplacement Raman) dû à la différence d'énergie entre les photons incidents et les photons Raman : ces déplacements Raman sont donc propres à un matériau. La présence des mêmes bandes Raman peut être observée pour la magnétite et la maghémite avec un décalage des bandes dû à l'environnement chimique différent lié à la présence des lacunes cationiques dans la structure de la maghémite. Une autre différence est observable sur la bande A_{1g}. Le spectre de la maghémite présente une bande large constituée de deux bandes, une à 680 cm^{-1} et une seconde à 720 cm^{-1}, quand le spectre de la magnétite ne présente qu'une bande à 680 cm^{-1} (Figure 1. 6) [11].

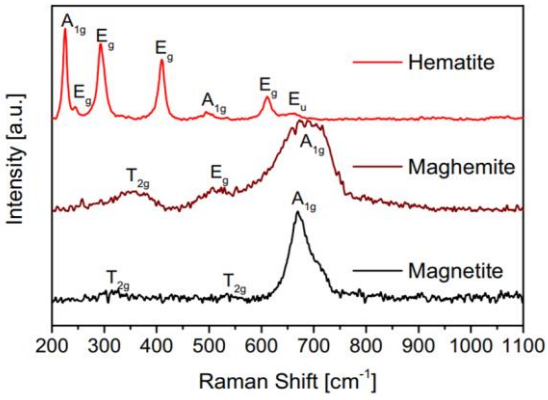


Figure 1. 6 : Spectres Raman des différents oxydes de fer [11].

2. Propriétés magnétiques

2.1. Généralités sur le magnétisme

Il existe des matériaux qui possèdent un magnétisme inné dû à la présence d'éléments chimiques naturellement magnétiques comme le fer (Fe), le cobalt (Co), le nickel (Ni), le gadolinium (Gd) (Figure 1. 7). Un moment magnétique, noté m_i, sera alors associé à chaque atome. Ce moment magnétique est dû à la contribution des orbitales électroniques ou des spins des électrons qui vont générer des champs magnétiques. Sous l'effet d'un champ magnétique extérieur imposé, noté $\vec{H}$, ces moments magnétiques auront tendance à s'aligner, plus ou moins rigoureusement, dans la direction de ce champ imposé : il y aura ainsi une aimantation au sein du matériau, noté $\vec{M}$.

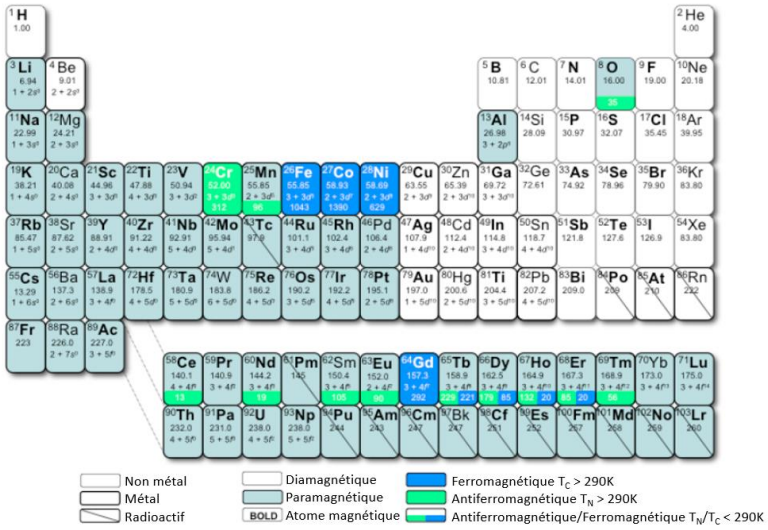


Figure 1. 7 : Tableau périodique des éléments magnétiques. Les différents types de magnétisme sont décrits pour chaque atome (diamagnétique en blanc, paramagnétique en gris, ferromagnétique en bleu, antiferromagnétique en vert).

Une troisième grandeur magnétique va alors être définie à partir du champ magnétique appliqué et de l'aimantation : c'est la susceptibilité magnétique noté χ. La susceptibilité magnétique représente la tendance d'aimantation d'un matériau sous un champ magnétique et est définie par la relation (Eq.1) :

$$\chi = \frac{\vec{M}}{\vec{H}} \qquad \text{Eq.1}$$

Il existe deux grandes familles de matériaux magnétiques : les matériaux magnétiques non ordonnés ou non-coopératifs et les matériaux magnétiques ordonnés ou matériaux coopératifs.

Pour le magnétisme non coopératif, les interactions entre les atomes étant faibles, il n'y a pas d'arrangement spontané des moments magnétiques, ce qui entraîne un désordre magnétique. Il n'y a

pas d'ordre magnétique à longue distance et l'aimantation du matériau n'est donc pas spontanée. Deux types de magnétisme non-coopératifs existent (Figure 1. 8) :

- le diamagnétisme est une propriété intrinsèque du matériau ($\chi < 0$). Les moments magnétiques vont s'aligner à l'opposé du champ magnétique appliqué.
- le paramagnétisme est une propriété des électrons libres des métaux ou des électrons non appariés des ions ($\chi > 0$). Les moments magnétiques vont s'aligner dans la même direction que le champ magnétique appliqué.

Pour le magnétisme coopératif, des interactions électrostatiques appelées interactions d'échange s'établissent entre les moments magnétiques. Il y a arrangement spontané des moments magnétiques, même en absence d'un champ magnétique $\vec{H}$ extérieur. Il existe trois types d'arrangement spontané (Figure 1. 8) :

- le ferromagnétisme où les moments magnétiques vont être parallèles entre eux. Une aimantation globale peut être mesurée en absence d'un champ magnétique extérieur.
- l'antiferromagnétisme où les moments magnétiques vont être antiparallèles mais avec une compensation. Le moment magnétique du matériau ne sera donc pas mesurable en l'absence de champ magnétique extérieur.
- le ferrimagnétisme où les moments magnétiques sont antiparallèles mais sans compensation des moments magnétiques. Une aimantation globale peut être mesurée en absence d'un champ magnétique extérieur.

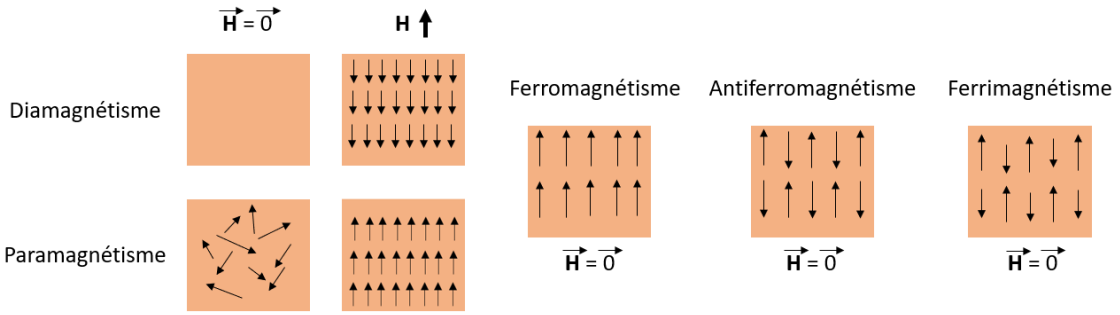


Figure 1. 8: Les différents types de comportement magnétique qui peuvent être présents au sein d'un matériau. Les moments magnétiques sont représentés par des flèches. Le comportement avec ou sans présence de champ magnétique extérieur ($\vec{H} = \vec{0}$) est précisé.

Pour le magnétisme coopératif, c'est-à-dire pour un matériau qui est ferromagnétique, antiferromagnétique ou ferrimagnétique, la valeur de la susceptibilité magnétique est toujours positive et supérieure (en valeur absolue) à la susceptibilité d'un matériau paramagnétique.

Ce magnétisme coopératif n'est présent que sur une certaine gamme de température. En effet, au-dessus d'une température critique nommée température de Curie (T_C), les composés ferrimagnétiques

et ferromagnétiques deviennent des composés paramagnétiques. Il en va de même pour un composé antiferromagnétique au-dessus de sa température critique nommée température de Néel (T_N).

La magnétite massive et la maghémite massive présentent un comportement ferrimagnétique à température ambiante. En effet, leur température de Curie est respectivement de l'ordre de 480°C et 645°C [12].

Ces états d'organisation magnétiques sont caractérisés par une énergie totale qui est la somme de plusieurs contributions (Eq.2) :

$$E = E_{éch} + E_a + E_D + E_Z \qquad \text{Eq.2}$$

L'énergie d'échange ($E_{éch}$) est une énergie à courte portée et intense qui est due à une interaction entre les spins : elle permet ainsi d'aligner les moments magnétiques voisins. Cette énergie concerne surtout les matériaux ferromagnétiques. L'énergie d'anisotropie (E_a), qui provient de l'interaction entre l'aimantation et le réseau cristallin, tend à aligner les moments dans une direction particulière du matériau appelée axe de facile aimantation. L'énergie de champ démagnétisant ou énergie dipolaire (E_D) résulte de l'interaction dipolaire. Elle permet de refermer le flux magnétique au sein du matériau afin d'éviter la formation de pôles magnétiques. L'énergie Zeeman (E_Z) est l'énergie d'interaction entre les moments magnétiques et le champ magnétique extérieur.

Pour minimiser l'énergie magnétostatique totale et notamment l'énergie dipolaire et l'énergie d'anisotropie, le matériau va créer des domaines magnétiques appelés domaine de Weiss. Cette création de domaines va permettre aux moments magnétiques de s'aligner facilement le long des axes de facile aimantation. Ces domaines de Weiss vont être séparés les uns des autres par des parois, appelées parois de Bloch, dont l'épaisseur est liée à cette compétition entre l'énergie dipolaire et l'énergie d'anisotropie [13]. Du fait de la variation de l'aimantation au sein des différents domaines de Weiss, un matériau ne va pas présenter d'aimantation macroscopique sans champ magnétique extérieur. Cependant, en présence d'un tel champ, les parois de Bloch vont alors se déplacer afin d'augmenter les domaines de Weiss où les moments magnétiques sont colinéaires avec le champ. Ainsi, plus le champ magnétique extérieur augmente, plus les domaines de Weiss diminuent pour ne former qu'un seul domaine où le spin magnétique est orienté dans le sens de ce champ. Ce phénomène de contraction et de dilatation des domaines de Weiss selon le champ magnétique appliqué peut être mesurer via l'aimantation $\vec{M}$ en fonction du champ extérieur appliqué $\vec{H}$: pour un matériau massif, cela va générer des cycles d'aimantation avec une hystérèse (Figure 1. 9). Cette hystérèse est due aux différents défauts dans le matériau massif (dislocations, joints de grain, …), demandant alors beaucoup d'énergie afin de permettre aux moments magnétiques de s'aligner avec le champ appliqué et engendrant un retard de l'aimantation. Une hystérèse est alors définie par son aimantation rémanente M_R, par son aimantation à saturation M_S et par son champ coercitif H_c (Figure 1. 9).

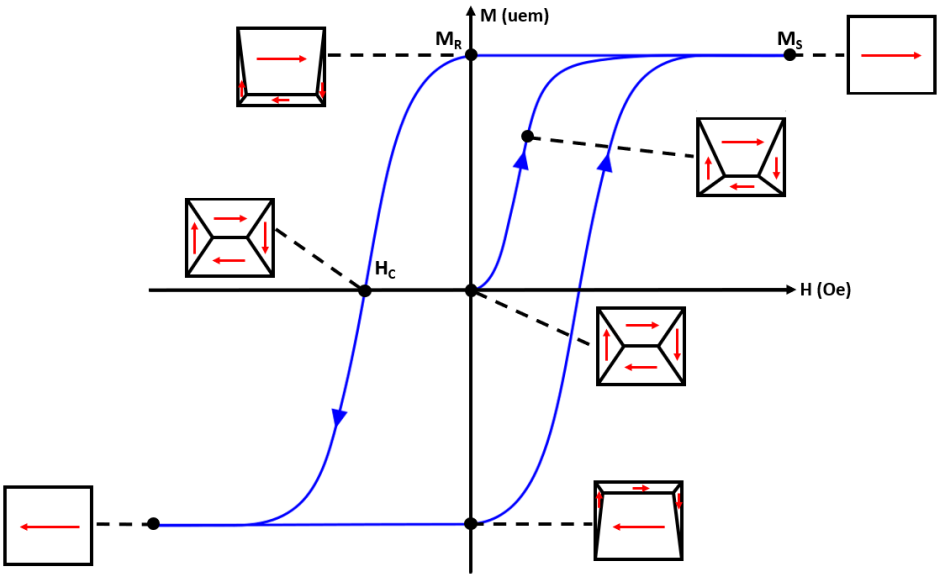


Figure 1. 9: Evolution des domaines magnétiques au cours de l'aimantation formant un cycle d'hystérèse : aimantation M en uem (unité électro-magnétique) en fonction du champ magnétique extérieur appliqué H en Oe (Oersted, 10 000 Oe = 1 Tesla). M_S correspond à l'aimantation à saturation, M_R correspond à l'aimantation rémanente et H_c correspond au champ coercitif.

Cette formation de parois de Bloch a un coût énergétique. Or, si la taille du matériau diminue en-dessous d'une valeur critique nommée diamètre critique D_C, cette énergie de formation va être supérieure à l'énergie dipolaire : les parois de Bloch vont alors disparaître afin de minimiser l'énergie magnétostatique totale créant ainsi un matériau avec un seul domaine (mono-domaine). Le moment magnétique au sein de ce domaine unique est alors orienté suivant une direction particulière (Figure 1. 10).

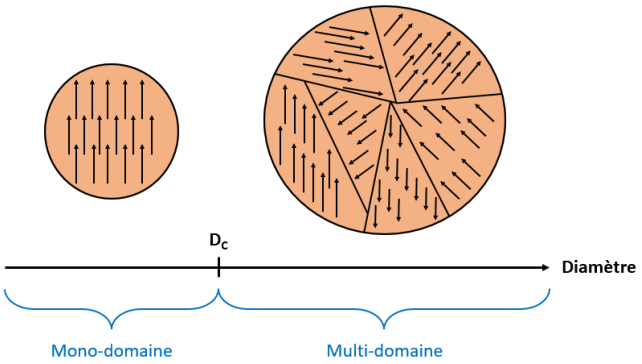


Figure 1. 10: Evolution de l'organisation des moments magnétiques en fonction du diamètre du matériau.

Ce diamètre critique peut alors s'exprimer sous la forme suivante pour tout matériau de forme ellipsoïde (Eq.3) [14] :

$$D_C = \frac{3\gamma}{(1-\alpha)N_{||}\mu_0 M_S^2} \qquad \text{Eq.3}$$

Avec γ l'énergie de parois de Bloch, α un facteur multiplicateur (α < 1) déterminant la géométrie de l'ellipsoïde, $N_{||}$ le facteur démagnétisant le long de l'axe principal de l'ellipsoïde, μ_0 la perméabilité du vide ($\mu_0 = 4\pi.10^{-7}$ kg.m.A^{-2}.s^{-2}) et M_S l'aimantation à saturation.

Sachant que l'énergie des parois de Bloch γ est proportionnelle à la racine carrée du produit de la constante d'échange A et de la constante d'anisotropie K ($\gamma = 4\sqrt{AK}$), que le matériau est sphérique (α = 0,5) et que le facteur démagnétisant d'une sphère vaut 1/3, la formule du diamètre critique (Eq.3) pour une particule mono-domaine devient (Eq.4) :

$$D_C = \frac{72\sqrt{AK}}{\mu_0 M_S^2} \qquad \text{Eq.4}$$

Ainsi, pour des particules sphériques de magnétite Fe_3O_4 massive ou de maghémite γ-Fe_2O_3 massive, les diamètres critiques reportés dans la littérature vont de 10 à 30 nm de diamètre [15–19]. Cependant, ces valeurs sont très dépendantes d'un dernier paramètre qui est l'état magnétique. En effet, en dessous d'un diamètre limite D_0, l'état magnétique d'une particule mono-domaine passe d'un état ferrimagnétique à un état superparamagnétique : la particule « ne possède donc plus d'aimantation » à température ambiante. Le diamètre D_0 sera expliqué plus tard dans le manuscrit. Dans cet état magnétique, le cycle d'hystérèse est fermé, il n'y a donc pas de coercivité ni de rémanence dans le matériau (Figure 1. 11). Enfin, il existe un état intermédiaire « vortex » lorsque le diamètre D_1 est situé entre D_0 et D_C [20,21].

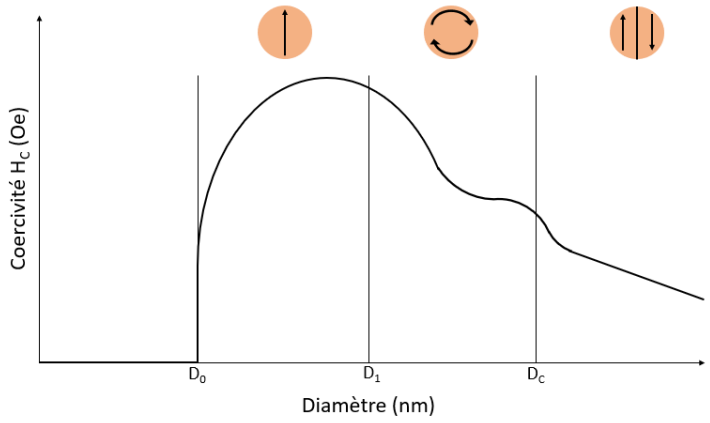


Figure 1. 11 : Variation de la coercivité H_C en fonction du diamètre du matériau. Lorsque $D < D_0$, le matériau est superparamagnétique, $D_0 < D < D_1$, le matériau est dans un état ferrimagnétique et mono-domaine, $D_1 < D < D_C$ dans un état vortex mono-domaine et $D > D_C$ dans un état multi-domaine [22,23].

2.2. Magnétisme d'une nanoparticule

2.2.1. Sources d'anisotropie

Une anisotropie magnétique est présente lorsque les propriétés magnétiques sont orientées selon des axes privilégiés nommés axes de facile aimantation. Il existe différentes formes d'anisotropie selon la nature, la forme, la surface, … du matériau. Nous allons aborder dans cette partie ces différents types d'anisotropie.

2.2.1.1. Anisotropie magnétocristalline

Dans un matériau, à cause de sa structure cristallographique, le vecteur d'aimantation n'est pas isotrope : ce vecteur est déterminé par l'énergie d'anisotropie magnétocristalline E_{an}^{mag}. Cette énergie permet de déterminer l'existence des directions cristallographiques les plus favorables énergétiquement. L'énergie nécessaire pour dévier d'un angle θ (Figure 1. 12.a) le vecteur du moment d'aimantation par rapport à l'axe de facile aimantation est définie par (Eq.5):

$$E_{an}^{mag} = K_1 V \sin^2\theta + K_2 V \sin^4\theta + \cdots \qquad \text{Eq.5}$$

avec K_1 et K_2 les constantes d'anisotropie d'ordre 1 et d'ordre 2, V le volume de la particule et θ l'angle entre le moment magnétique et l'axe de facile aimantation.

Les directions de facile aimantation sont donc définies par le signe de la constante K_1 et par le rapport $K_2/|K_1|$.

Pour la magnétite, à température ambiante, cette anisotropie est de type uniaxiale car elle présente un axe de facile aimantation selon la direction [111]. La valeur de sa constante K_1 vaut $-1{,}35.10^4$ J.m^{-3} et la constante K_2 est égale à $-0{,}28.10^4$ J.m^{-3} [24].

Pour la maghémite, l'axe de facile aimantation est la direction [110]. La constante K_1 vaut $-2{,}5.10^4$ J.m^{-3} et la constante K_2 est négligeable [25].

Pour une particule mono-domaine et sphérique, le terme prédominant est le terme d'ordre 2 (les termes d'ordre supérieur sont négligeables). L'équation Eq.5 devient alors (Eq.6) :

$$E_{an}^{mag} = KV \sin^2\theta \qquad \text{Eq.6}$$

Cette équation permet ainsi de définir deux minima pour l'énergie d'anisotropie magnétocristalline quand θ = 0 et θ = π, séparés par une barrière d'énergie ΔE à θ = π/2 qui vaut KV (Figure 1. 12.b). Ainsi, le moment d'aimantation est perpendiculaire à l'axe de facile aimantation à θ = π/2 et parallèle quand θ = 0 et θ = π.

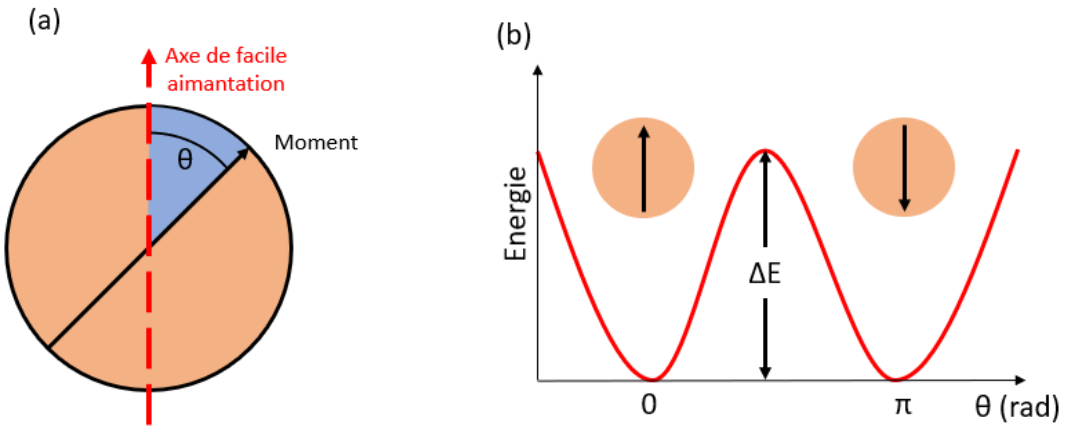


Figure 1. 12 : Représentation schématique du vecteur d'aimantation dans une particule mono-domaine dévié d'un angle θ par rapport à l'axe de facile aimantation (a). Description de l'énergie d'anisotropie magnétocristalline d'une particule mono-domaine en fonction de l'angle θ entre le moment d'aimantation et l'axe de facile aimantation (b).

2.2.1.2. *Anisotropie de surface*

L'anisotropie de surface est due à la rupture de la symétrie dans le réseau cristallin à la surface de la particule. Une baisse du nombre des voisins proches des atomes et une formation de défauts dans la structure cristalline interviennent. Cette rupture va induire une baisse de l'aimantation à saturation M_S au sein du matériau car les spins magnétiques à la surface vont se réorienter perpendiculairement à cette dernière : ce phénomène se nomme le « spin canting » [26–28]. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Néel en 1954 pour des grains très fins [29].

Cette source d'anisotropie est d'autant plus importante pour des matériaux de petite taille car le rapport surface/volume augmente. L'énergie d'anisotropie de surface s'écrit (Eq.7) :

$$E_{an}^{sur} = K_s V \sin^2\alpha \qquad \text{Eq.7}$$

avec K_S l'anisotropie de surface et α l'angle entre le moment magnétique et la normale de la surface.

La présence d'une couche organique à la surface des particules peut également engendrer un phénomène de spin canting, baissant ainsi l'aimantation à saturation du matériau [9]. L'influence de cette couche organique sur les propriétés physico-chimiques sera détaillée plus tard dans le manuscrit (paragraphe 6.3 du chapitre 1).

Un phénomène dit « spin-glass » peut également être à l'origine d'une anisotropie de surface. Ce phénomène est dû à un désordre magnétique 3D où les spins ne sont pas alignés selon un motif régulier [30] (Figure 1. 13). Il peut être initié par une rupture de symétrie de translation de la maille [31].

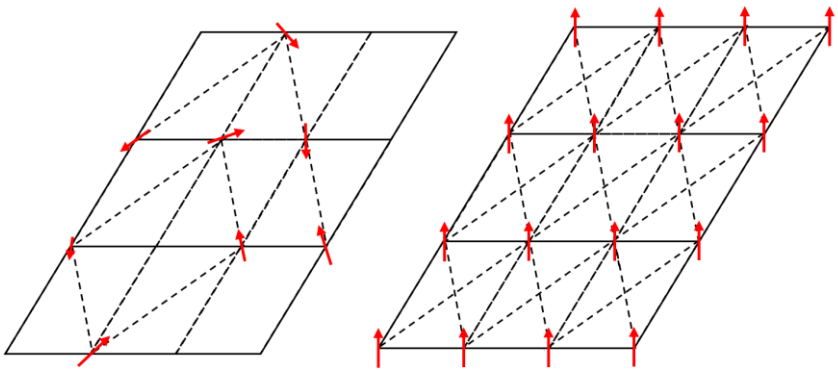


Figure 1. 13 : Représentation schématique d'une structure « spin-glass » (à gauche) avec des moments aléatoires et d'une structure ferromagnétique (à droite) avec des moments ordonnés.

2.2.1.3. Anisotropie effective

L'anisotropie effective est une anisotropie qui permet de regrouper les anisotropies de surface et de volume. En effet, il est difficile de distinguer les différentes formes d'anisotropie. Ainsi, une constante d'anisotropie effective, notée K_{eff}, est définie à partir des constantes d'anisotropie de volume K_V et de surface K_S telle que (Eq.8) :

$$K_{eff} = K_V + \frac{S}{V}K_S = K_V + \frac{3}{r}K_S \qquad \text{Eq.8}$$

pour une particule sphérique de rayon r, de volume V et de surface S. Quand le rayon de la particule augmente, la valeur de cette constante d'anisotropie effective K_{eff} diminue, comme l'ont démontré Park et Demortière [32,33].

2.2.1.4. Anisotropie de forme

L'anisotropie de forme provient de l'interaction entre le champ démagnétisant H_D propre au matériau et la distribution des moments magnétiques au sein de ce matériau. Ainsi, le champ démagnétisant se traduit par (Eq.9) :

$$H_D = -N.M \qquad \text{Eq.9}$$

avec M l'aimantation du système et N le facteur démagnétisant. Ce champ démagnétisant est fortement dépendant de l'orientation de l'aimantation au sein du matériau et de la forme de celui-ci. L'énergie de l'anisotropie de forme générée s'écrit donc (Eq.10) :

$$E_{an}^{for} = \frac{1}{2}\mu_0 V(N_x M_x^2 + N_y M_y^2 + N_z M_z^2) \quad \text{Eq.10}$$

avec $N_{i\,(i = x, y, z)}$ les composantes du facteur démagnétisant dans les trois directions de l'espace, $M_{i\,(i = x, y, z)}$ les moments magnétiques, μ_0 la perméabilité du vide et V le volume du matériau.

Pour un système quelconque avec une aimantation non nulle, cette aimantation s'orientera selon l'axe de plus grande dimension du matériau. Pour des particules sphériques, les composantes du facteur démagnétisant vont alors être de même valeur ($N_x = N_y = N_z = 1/3$) du fait de l'uniformité tridimensionnelle du matériau : l'énergie d'anisotropie de forme résultante sera négligeable.

Ces différentes énergies d'anisotropie vont permettre de décrire au mieux une particule magnétique en variant en fonction de différents paramètres comme la température, le champ appliqué, la taille, la forme du matériau. Cependant, pour une nanoparticule magnétique comme la magnétite ou la maghémite, une notion importante, liée à la dynamique de retournement de l'aimantation, est à considérer : le superparamagnétisme.

2.2.2. Le superparamagnétisme

Le superparamagnétisme a été décrit pour la première fois par Louis Néel en 1949 [34,35]. Il a décrit dans son article que des particules mono-domaines à une certaine échelle (de l'ordre du nanomètre) présentaient des variations du moment magnétique en fonction de la température et du temps. Le moment magnétique au sein d'une nanoparticule est assimilé à un macro-spin qui est la somme de l'ensemble des moments magnétiques. Due à l'anisotropie magnétocristalline et en absence d'un champ magnétique extérieur, ce macro-spin va posséder deux orientations stables : soit parallèle à l'axe de facile aimantation, soit antiparallèle à cet axe (Figure 1. 12.b). Ces deux orientations sont, comme expliqué précédemment, séparées par une barrière d'énergie ΔE équivalente à KV. Néel et Brown ont ainsi montré que pour des particules mono-domaines suffisamment petites, cette barrière d'énergie devient inférieure à l'énergie thermique permettant ainsi à l'aimantation de pouvoir se retourner facilement de 180° sans champ magnétique extérieur.

Ce retournement de l'aimantation se fait avec un temps de relaxation, dit temps de relaxation de Néel τ et est décrit par la relation d'Arrhenius suivante (Eq.11) :

$$\tau = \tau_0 \, e^{\left(\frac{KV}{k_B T}\right)} \quad \text{Eq.11}$$

avec τ_0 le temps d'essai compris entre 10^{-9} et 10^{-10} secondes, K la constante d'anisotropie, V le volume de la particule, k_B la constante de Boltzmann ($k_B = 1{,}38.10^{-23}$ J.K^{-1}) et T la température du système.

Le temps d'observation de ce phénomène de retournement de l'aimantation va être dépendant du temps de mesure de l'appareil τ_m. Si ce temps de mesure est inférieur au temps de relaxation,

l'aimantation sera dans un état bloqué selon l'axe de facile aimantation et la particule ferrimagnétique. A l'inverse, si le temps de relaxation est supérieur au temps de mesure, l'aimantation totale sera alors nulle et la nanoparticule présentera un état de superparamagnétisme.

Ce régime de superparamagnétisme est donc compris entre une température de blocage notée T_B et la température de Curie T_C. La température de blocage constitue la température de transition d'un état bloqué à un état superparamagnétique (Figure 1. 14).

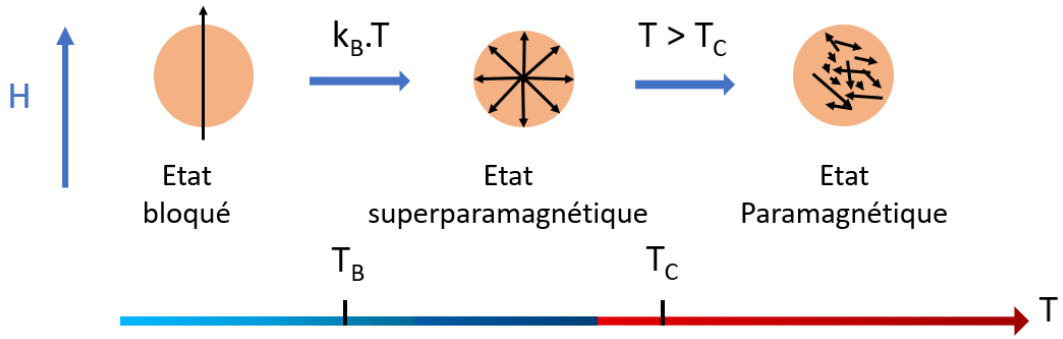


Figure 1. 14 : Evolution de l'état magnétique des nanoparticules en fonction de la température avec T_B la température de blocage et T_C la température de Curie.

La température de blocage est alors définie lorsque le temps de mesure est égal au temps de relaxation de Néel ($\tau_m = \tau$). Ainsi, grâce à l'équation 11, la température de blocage vaut (Eq.12) :

$$T_B = \frac{KV}{k_B \ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)} \qquad \text{Eq.12}$$

La température de blocage est donc dépendante de la taille de la particule, de son anisotropie, des interactions entre les particules et du temps de mesure. Pour déterminer cette température, il faut prendre en compte toutes les anisotropies mentionnées précédemment car elles participent toutes à la dynamique de retournement de l'aimantation. L'anisotropie effective K_{eff} qui comprend l'anisotropie de surface (cf Eq.8) est à considérer pour ce calcul. Enfin, pour le temps de mesure, la valeur est dépendante de l'appareil utilisée. En effet, avec une spectroscopie Mössbauer, le temps de mesure est de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-7} secondes. Pour une mesure magnétique classique, ce temps de mesure est de l'ordre de 10^{-5} à plusieurs secondes. Typiquement, pour déterminer une température de blocage, le temps de mesure utilisée est de 100s et $\tau_0 = 10^{-9}$s. Ainsi, l'équation 12 devient (Eq.13) :

$$KV = 25\, k_B\, T_B \qquad \text{Eq.13}$$

L'équation 13 peut être réécrite sous la forme de l'équation14 :

$$V_0 = \frac{25\, k_B\, T}{K} \qquad \text{Eq.14}$$

Comme mentionné ci-dessus, la température de blocage est la température de transition d'un état superparamagnétique à un état bloqué. Un diamètre limite, noté D_0, pour obtenir une nanoparticule superparamagnétique peut être déterminé à partir de l'équation 14 en considérant une particule sphérique à température ambiante (Eq.15)

$$D_0 = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi} V_0} \qquad \text{Eq.15}$$

Ce diamètre est la valeur maximale en-dessous de laquelle, à une température donnée, un appareil détecte si un échantillon est dans un état de superparamagnétisme (Figure 1. 15). Ainsi, pour une particule de magnétite Fe_3O_4, le superparamagnétisme est détecté pour des tailles inférieures à 17 nm avec des mesures de susceptibilité magnétique et est détecté pour des tailles inférieures à 9 nm avec des mesures par spectroscopie Mössbauer [36].

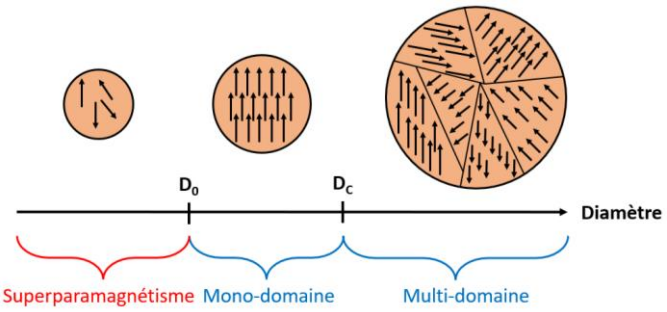


Figure 1. 15 : Evolution de l'organisation des moments magnétiques en fonction du diamètre du matériau.

La température de blocage est une donnée importante afin de savoir si une particule est dans un état superparamagnétique ou non. Cependant, d'après l'équation 13, nous pouvons constater que cette température est dépendante du volume de la particule et donc de la taille de particule. Ainsi, pour une distribution de tailles large de particules dans un échantillon, une distribution de températures de blocage large sera observée [37,38] et si la taille des particules augmente, la température de blocage augmentera [39]. Un état d'agglomération des particules engendrera une variation de la température de blocage comme démontré par Dormann et al [36]. La valeur et la distribution de la température de blocage est par conséquent caractéristique de la monodispersité de l'échantillon.

Enfin, le modèle proposé par Néel et Brown (Eq.11) n'est valable que dans le cas de particules monodisperses et sans interaction dipolaire. Ces interactions dipolaires sont néanmoins présentes au sein des échantillons et peuvent être responsables d'un décalage de la température de blocage vers des hautes températures [40,41]. Ces interactions dipolaires peuvent être décrites par l'équation suivante (Eq.16) :

$$E_d = \frac{\mu_0}{4\pi r^3}\left(\overrightarrow{m_1}.\overrightarrow{m_2} - \left(\frac{3}{r^2}\right)(\overrightarrow{m_1}\vec{r})(\overrightarrow{m_2}\vec{r})\right) \qquad \text{Eq.16}$$

avec $\overrightarrow{m_1}$ et $\overrightarrow{m_2}$ les moments magnétiques portés par deux nanoparticules, r la distance entre ces deux nanoparticules et μ_0 la perméabilité du vide.

Pour déterminer si une particule est dans un état de superparamagnétisme, il existe différentes méthodes de caractérisation. La première, et la plus rapide, est une mesure de l'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué. Comme expliqué précédemment, pour une nanoparticule superparamagnétique, il existe deux orientations possibles du macro-spin : soit parallèle avec l'axe de facile aimantation, soit antiparallèle avec cet axe (Figure 1. 12.b). Si la température de la mesure est au-dessus de la température de blocage ($T > T_B$), le champ appliqué force le macro-spin à s'orienter dans sa propre direction. Quand le champ extérieur appliqué augmente, une augmentation de l'orientation des différents macro-spin intervient jusqu'à une saturation. Lorsque le champ redevient nul, les moments magnétiques de chaque nanoparticule se réorientent selon leur propre axe de facile aimantation et fluctuent entre leurs deux orientations possibles (parallèle et antiparallèle) : le moment magnétique moyen est alors nul. La courbe d'aimantation ne possède pas d'hystérèse (Figure 1. 16.a).

Si la température de mesure est inférieure à la température de blocage ($T < T_B$), les macro-spins sont bloqués dans la direction de facile aimantation et ne fluctuent plus. Cependant, en présence d'un champ magnétique fort, les macro-spins s'orientent selon ce champ. En effet, le champ magnétique apporte assez d'énergie au système pour passer la barrière d'anisotropie et aligner les spins jusqu'à une saturation. Lorsque le champ redevient nul, l'énergie est insuffisante pour que tous les macro-spins reviennent à leur état initial : l'apparition d'une aimantation rémanente M_R et la formation d'une hystérèse sont observées (Figure 1. 16.b).

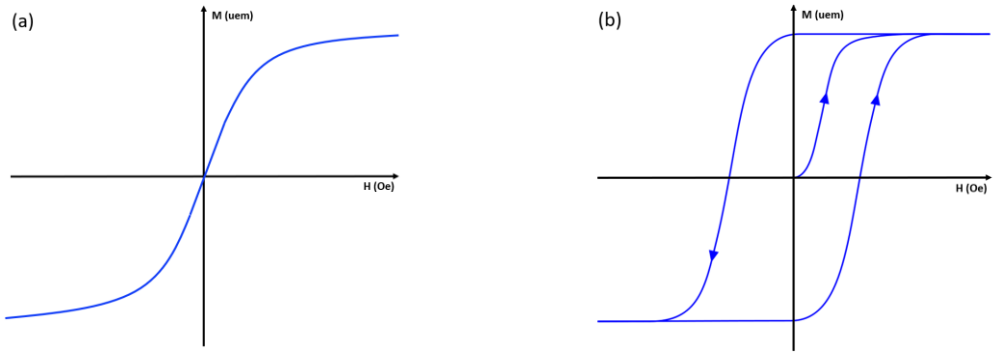


Figure 1. 16 : Courbes d'aimantation pour des nanoparticules identiques, mono-domaine et sans interaction à l'état superparamagnétique ($T > T_B$) (a), soit à l'état bloqué ($T < T_B$) (b).

Pour déterminer la température de blocage T_B expérimentale, des courbes d'aimantation M(H) peuvent être réalisées à différentes températures afin de définir à quelle température intervient une formation d'une hystérèse. Cependant, cette manière de déterminer la température de blocage est longue et hasardeuse. Pour obtenir une valeur plus précise de cette température, des mesures d'aimantation en fonction de la température (M(T)) peuvent être réalisées. En effet, l'échantillon est

refroidi à 5K puis un léger champ magnétique est appliqué (quelques œrsteds) avant montée de la température à 300K. L'aimantation est mesurée en continu : cette mesure se nomme ZFC (Zero Field Cooled). Enfin, toujours en présence de ce champ magnétique, l'échantillon est de nouveau refroidi à 5K tout en mesurant l'aimantation : cette mesure se nomme FC (Field Cooled). Une représentation d'une courbe ZFC/FC est décrite en Figure 1. 17.

Figure 1. 17 : Courbe ZFC (en bleu) et FC (en rouge) de nanoparticules superparamagnétiques.

De façon générale, la température de blocage est assimilée à la température correspondant au maximum de la courbe ZFC (aimantation maximum de la courbe bleue sur la Figure 1. 17). Cependant, cette valeur constitue une approximation. En effet, en prenant le maximum de la courbe ZFC, nous induisons comme hypothèse que toutes les nanoparticules possèdent le même diamètre et donc la même température de blocage (équation 13). Or, un échantillon correspond à une distribution de taille de nanoparticules et, par conséquent, à une distribution de température de blocage. En toute rigueur, il conviendrait donc de prendre en considération une région de blocage afin de déterminer une température de blocage moyenne pour décrire l'ensemble des nanoparticules dans l'échantillon [42] (Figure 1. 18). Cependant, cette méthode demande une simulation de type Monte-Carlo avec un mode de Stoner-Wolfarth. De fait, pour ces raisons de simplicité, la température de blocage est communément admise comme étant le maximum de la courbe ZFC.

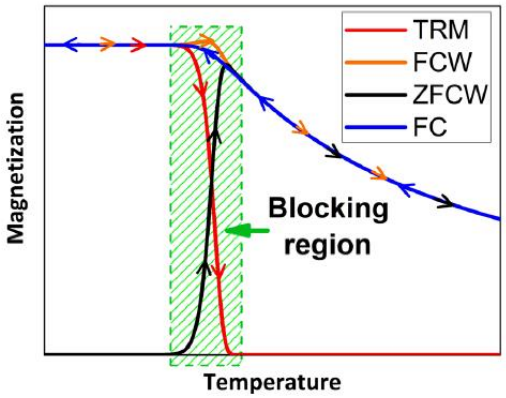


Figure 1. 18 : Courbes ZFC/FC montrant la région bloquée où se situe la température de blocage de l'ensemble des nanoparticules d'un échantillon, d'après [42].

Enfin, pour caractériser l'état de superparamagnétisme, l'utilisation de la spectroscopie Mössbauer peut être envisagée. En effet, grâce aux interactions hyperfines des noyaux de fer, l'ordre magnétique local provenant des électrons peut être analysé. Ainsi, à une température donnée, le magnétisme des nanoparticules peut être décrit. A température ambiante, en fonction de l'agitation possible des moments magnétiques, le spectre Mössbauer de nanoparticules superparamagnétiques présente soit un singulet, soit un doublet quadripolaire (Figure 1. 19) [43,44]. Si la nanoparticule est de la magnétite pure, une seule raie sera présente (Figure 1. 19.a). Pour une légère oxydation de la magnétite en maghémite, le spectre Mössbauer présente un doublet quadripolaire (Figure 1. 19.b). Lorsque la température diminue, pour des moments magnétiques dans un état bloqué, un éclatement en sextuplés provenant des différents atomes de fer est observable. La température de passage d'un singulet ou d'un doublet à un sextuplé est la température de blocage T_B.

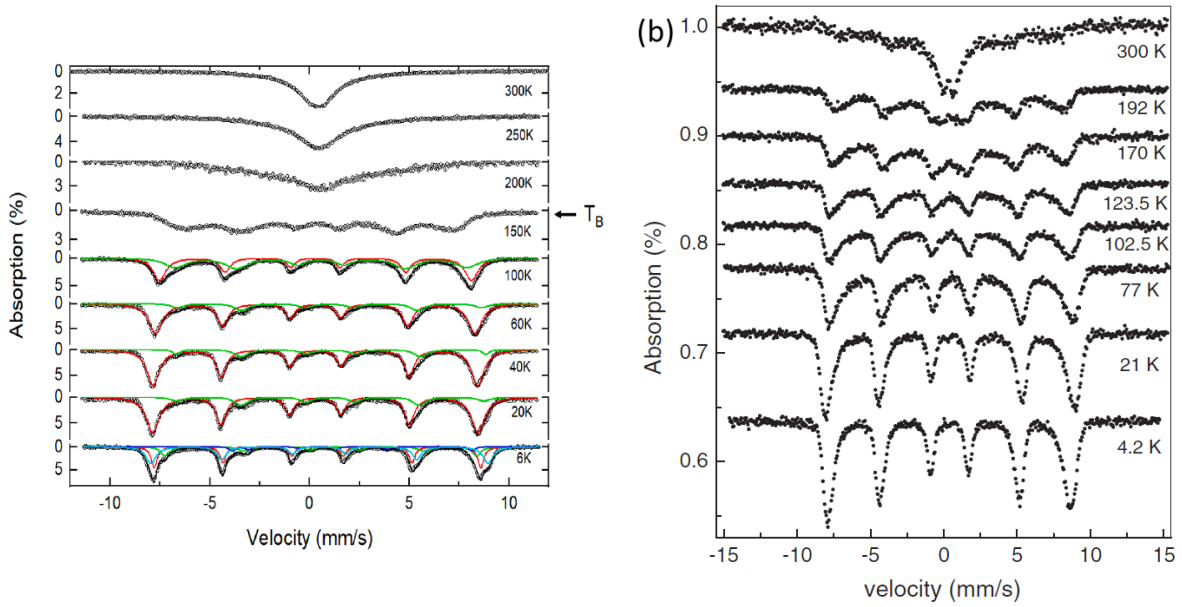


Figure 1. 19 : Spectres Mössbauer en fonction de la température de magnétite [44] (a) et de la magnétite oxydée [43] (b) présentant le passage d'un état superparamagnétique à un état bloqué.

3. Les voies de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer

Dans cette partie, après une brève explication sur le mécanisme de synthèse des nanoparticules, nous présenterons les principales méthodes de synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients.

3.1. Les mécanismes de synthèse de nanoparticules

3.1.1. La théorie de LaMer : première théorie à décrire ces mécanismes

En 1950, deux chimistes américains, Victor K. LaMer et Robert H. Dinegar, décrivent pour la première fois le mécanisme de synthèse de nanoparticules de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) en différentes étapes (Figure 1. 20) [45]. D'après leur théorie, la taille des nanoparticules est liée à leur concentration dans le milieu via la vitesse de formation des particules. En effet, dans une première étape (I sur la Figure 1. 20), la concentration en soufre augmente rapidement avec la décomposition du précurseur initial. Cette augmentation de la concentration se poursuit jusqu'à une sursaturation en soufre dans le système : la deuxième étape appelée nucléation commence alors (étape II). A partir de ce moment-là, la concentration en soufre diminue pour repasser sous le seuil de la saturation. Lorsque ce seuil est atteint, la troisième étape (III), la croissance, débute alors. La croissance des particules se fait ainsi par diffusion et est dépendante de la quantité initiale de précurseur.

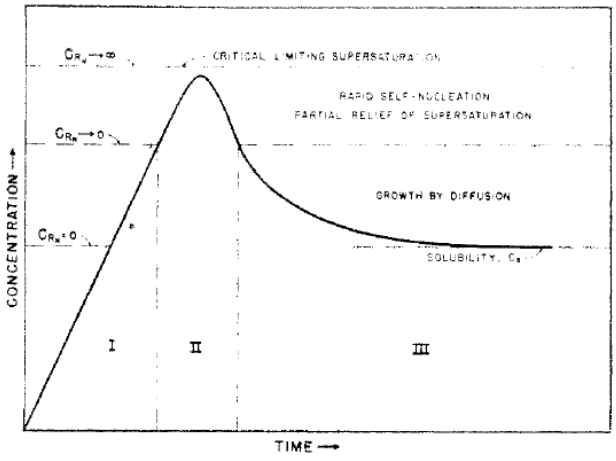


Figure 1. 20 : Représentation schématique de l'évolution de la concentration en fonction du temps de particules de soufre proposée par LaMer et Dinegar en 1950 [45].

Cependant, cette théorie de LaMer ne prend en compte que la formation des nanoparticules en lien avec l'évolution de la concentration du précurseur. Il existe d'autres phénomènes que nous allons détailler.

3.1.2. Amélioration de la théorie de LaMer sur les mécanismes de synthèse de nanoparticules

Depuis que LaMer et Dinegar ont décrit le mécanisme de synthèse de nanoparticules, de nombreux chercheurs ont, par la suite, voulu améliorer et affiner ces mécanismes. Pour les nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées dans l'eau, le mécanisme de synthèse est assez similaire à celui décrit dans les années 50 par LaMer. En effet, la concentration de monomères augmente dans la solution (phase I) : des complexes aqua-hydroxo se forment par différents mécanismes de polycondensations. Ces complexes ont pour formules $[Fe_2(OH)_4(H_2O)_8]$ et $[Fe_2(OH)_6(H_2O)_6]$. A partir d'une certaine concentration, notée $C_{nucléation}$ sur la Figure 1. 21, l'étape de nucléation commence (phase II) en raison d'une saturation de monomères dans la solution. De petits germes apparaissent dans la solution qui auront tendance à se redissoudre. Ce processus de formation et de redissolution des germes continue jusqu'à l'apparition de germes stables, c'est-à-dire à la sursaturation de la solution (C_{max}). A ce stade, la concentration diminue brusquement. Lorsqu'elle atteint de nouveau $C_{nucléation}$, les germes commencent à croître. Cette croissance s'effectue par addition de précurseurs à la surface des germes via des mécanismes d'olation/oxolation. Cette croissance continue tant que la concentration en précurseurs est supérieure à la solubilité des particules dans la solution (C_{finale}). Les germes ont alors une taille proche du nanomètre. Ces germes vont alors coalescer entre eux pour former des particules plus grosses : cette étape est le vieillissement d'Ostwald. Ce phénomère fut décrit pour la première fois en 1900 par Wilhelm Ostwald, chimiste germano-livonien et prix Nobel de chimie en 1909 [46]. Selon lui, la croissance des germes est gouvernée par la différence de solubilité des nanoparticules en fonction de leur taille. En effet, les petites nanoparticules présentent une grande solubilité et une grande énergie de surface, elles ont donc tendance à se solubiliser plus facilement au profit des grosses nanoparticules présentes. De plus, ce vieillissement peut aussi entraîner un changement dans la morphologie des nanoparticules du fait de la tension de surface que possèdent les faces cristallines dans le milieu réactionnel. Enfin, une cristallisation des phases amorphes ou un changement des structures cristallines sont des phénomènes courants dans ce mûrissement.

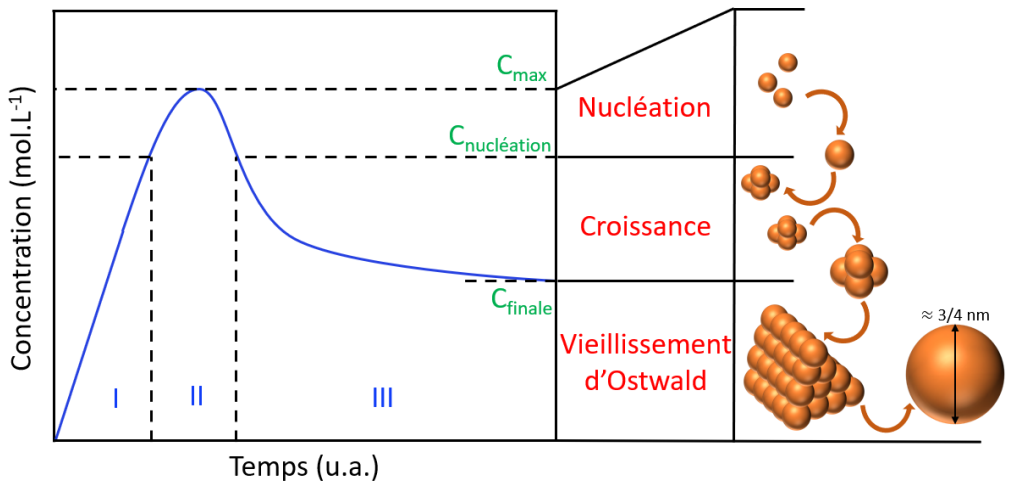


Figure 1. 21 : Mécanisme de synthèse des nanoparticules selon leur concentration en fonction du temps.

3.2. Les principales méthodes de synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer

Il existe plusieurs méthodes de synthèses de nanoparticules d'oxydes de fer avec chacune leurs avantages comme leurs inconvénients. Le but de ces méthodes de synthèse est de contrôler la taille [47,48], la forme [49–51], le rendement [52,53].

La première méthode de synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer est la méthode dite de coprécipitation. Elle a été réalisée pour la première fois en 1981 par René Massart [54]. Cette synthèse permet d'obtenir des nanoparticules directement dans l'eau. Cependant, les nanoparticules obtenues sont souvent agrégées et de tailles inhomogènes (Figure 1. 22.a). A partir des années 2000, de nouvelles synthèses ont été développées à partir de complexes organométalliques : c'est le début des synthèses par décomposition thermique (Figure 1. 22.b). Ces synthèses permettent d'obtenir des nanoparticules monodisperses avec une distribution de taille homogène. Les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique sont stables dans un solvant organique (de type toluène, cyclohexane, chloroforme, …). Par la suite, de nouvelles méthodes telles que les synthèses hydrothermales, les synthèses par voie sol-gel, par sonolyse ont été développées. Les méthodes de synthèses pour obtenir des nanoparticules d'oxydes de fer sont donc nombreuses [55–57]. Les avantages et inconvénients de chaque méthode de synthèse décrite dans la suite de ce manuscrit sont résumés dans le Tableau 1. 1. Nous détaillerons plus particulièrement les méthodes de coprécipitation et de décomposition thermique. Des images de microscopie électronique en transmission de nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées à partir des différentes techniques sont représentées en Figure 1. 22.

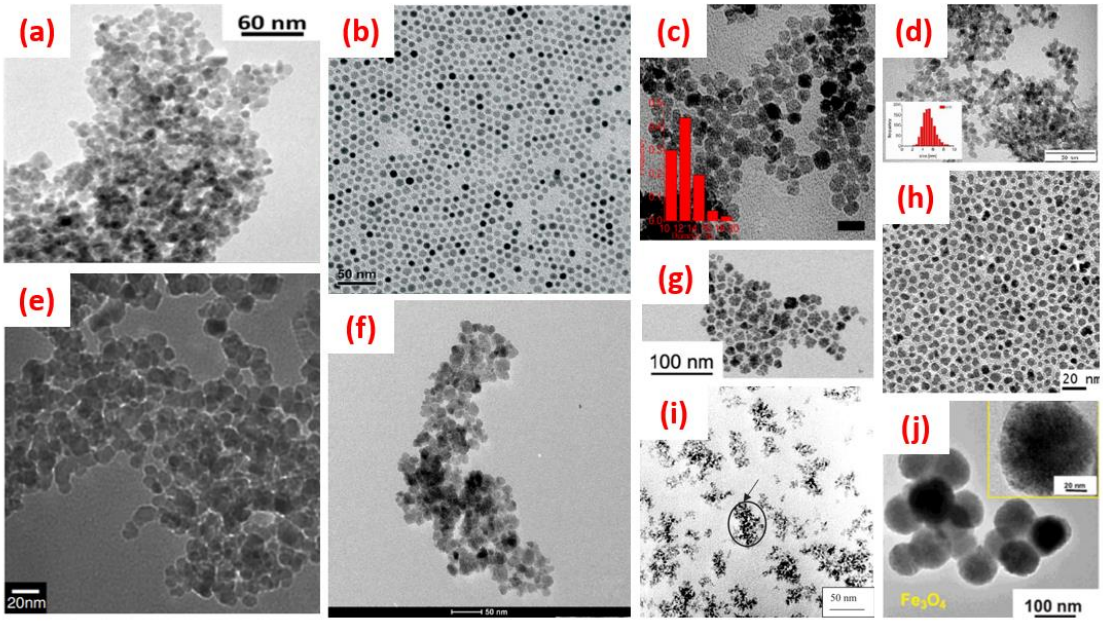


Figure 1. 22 : Micrographies MET de nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4) élaborées à partir de différentes méthodes de synthèses : par coprécipitation [58] (a), par décomposition thermique [59] (b), par microémulsion [60] (c), par électrochimie [61] (d), par flux d'injection [62] (e), par voie hydrothermale [63] (f), par voie polyol [64] (g), par voie sol-gel [65] (h), par aérosol [66] (i) et par sonochimie [67] (j).

Tableau 1. 1 : Tableau récapitulatif des synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer avec les avantages et inconvénients de chaque synthèse.

Méthode de synthèse	Conditions de synthèse	T (°C)	Durée	Solvant	Taille (nm)	Distribution de taille	Avantages	Inconvénients	Réf
Coprécipitation	Très simples	20-90	Minutes à quelques heures	Eau	< 20	Large à correcte	Simple, rapide, rendement élevé	Pas de contrôle sur l'oxydation, sur la forme, formation d'agrégats,	[58,68–71]
Décomposition thermique	Compliquées	200 – 400	Heures	Solvant organique	< 20	Etroite	Contrôle de la taille, de la forme	Synthèse en milieu organique, haute température	[59,72–75]
Hydrothermale	Simples	> 200	Heures	Eau	< 1000	Etroite	Contrôle facile de la taille et de la forme	Synthèse à haute pression et température	[63,76]
Voie sol-gel	Compliquées	20 -100	Heures	Eau	6 – 15	Correcte	Contrôle de la taille, de la forme	Faible résistance à l'usure	[65,77]
Milieu polyol	Simples	> 180	Dizaines de minutes	Solvant organique	< 10	Etroite	Synthèse rapide, simple avec un contrôle de la taille et de la forme	Synthèse à haute température, rendement dépendant du potentiel de réduction des polyols	[64,78]
Microémulsion	Compliquées	20 – 50	Dizaines de minutes	Eau - solvant organique	< 50	Etroite	Contrôle de la taille, de la forme	Difficulté à éliminer les surfactants	[60,79]
Electrochimique	Compliquées	$T_{ambiante}$	Quelques minutes	Eau + sels	3 – 8	Correcte	Contrôle de la taille	Peu reproductible	[61,80]
Flux d'injection	Compliquées	80-100	Quelques minutes	Eau	2 – 7	Etroite	Très reproductible	Mélange en continu des réactifs	[62,81]
Sonochimie	Simple	30-50	Quelques minutes à heures	Eau	< 100	Etroite	Contrôle de la taille	Mécanisme complet encore inconnu	[67,82]
Aérosol/vapeur	Compliquées	T_{eb} des solvants	Quelques minutes à heures	Solvant organique	5 – 60	Correcte	Synthèse pour différentes applications	Synthèse à haute température	[66,83]

3.2.1. La coprécipitation

La synthèse par coprécipitation est la première synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer dans l'eau. Cette méthode de synthèse est une des méthodes les plus utilisées actuellement, comme le montre le nombre de publications référencées chaque année (plus de 15 000 publications sur l'année 2021 par exemple) [58,68–71].

Cette synthèse repose sur le principe de la précipitation des ions présents en solution en milieu basique. Pour la synthèse de nanoparticules de magnétite Fe_3O_4, la précipitation conjointe en milieu basique des ions ferreux Fe^{2+} et des ions ferriques Fe^{3+} est réalisée directement dans l'eau. Cette synthèse est facile à mettre en œuvre, rapide et permet d'obtenir un grand nombre de nanoparticules. Cependant, les nanoparticules synthétisées s'agrègent rapidement et sont polydisperses en taille.

Les cations ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+} sont très stables en milieu acide et précipitent quand la concentration en base augmente pour former l'oxyde de fer sous forme de magnétite Fe_3O_4 (à partir de pH de 9,5) selon l'équation 17 (Eq.17) :

$$Fe^{2+}_{(aq)} + 2\,Fe^{3+}_{(aq)} + 8\,OH^{-}_{(aq)} \rightarrow Fe_3O_{4\,(s)} + 4\,H_2O_{(l)} \qquad \text{Eq.17}$$

Cependant, à cause de la taille des nanoparticules de magnétite, la réactivité de surface est très importante : une oxydation de surface peut alors avoir lieu pour former de la maghémite γ-Fe_2O_3 en présence de dioxygène (Eq.18) :

$$4\,Fe_3O_{4\,(s)} + O_{2\,(g)} \rightarrow 6\,Fe_2O_{3\,(s)} \qquad \text{Eq.18}$$

Durant la synthèse par coprécipitation, plusieurs composés sont formés avant d'obtenir de la magnétite (Fe_3O_4) ou de la maghémite (γ-Fe_2O_3) selon le mécanisme décrit par LaMer et par Dinegar en 1950 [45]**.** En effet, des complexes aqua-hydroxo se forment suite à des réactions de polycondensations inorganiques à partir des ligands aqua de fer (quelque soit la charge z du cation de fer, z = 2 ou z = 3) (Eq.19) [84] :

$$[Fe(H_2O)_6]^{z+} \leftrightarrow [Fe(OH)_h(H_2O)_{6-h}]^{(z-h)+} + hH^{+} \qquad \text{Eq.19}$$

La formation de ces précurseurs aqua-hydroxo est nécessaire pour que la synthèse ait lieu. Leur concentration augmente par l'ajout d'une base. Les bases les plus couramment utilisées sont la soude NaOH [69,70,85] et l'hydroxyde d'ammonium NH_4OH [86,87]. Une fois la concentration $C_{nucléation}$ atteinte (Figure 1. 21), des germes se forment accélérant ainsi la réaction de condensation par des

phénomènes d'olation et d'oxalation. Le phénomène d'olation conduit à l'élimination d'une molécule d'eau pour former des ponts hydroxo (Eq.20). Le phénomène d'oxolation, quant à lui, conduit à la création des ponts oxo (Eq.21).

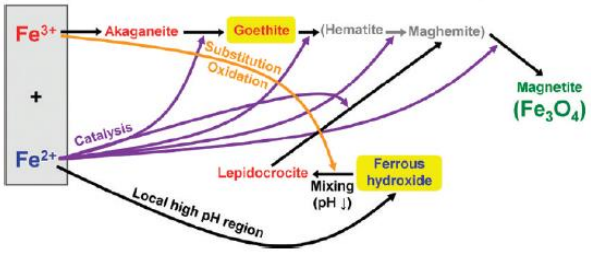
$$H_2O - Fe - OH + Fe - H_2O \rightarrow Fe - OH - Fe + 2\,H_2O \qquad \text{Eq.20}$$

$$Fe - OH + Fe - OH \rightarrow Fe - OH - Fe - OH \rightarrow Fe - O - Fe + H_2O \qquad \text{Eq.21}$$

Ces réactions d'olation et d'oxalation donnent ainsi des composés d'oxo-hydroxydes de fer (de type FeOOH) conduisant aux oxydes de fer via des traitements thermiques (Figure 1. 23.a et .b) [12,88].

Ces deux réactions (Eq.20 et Eq.21) constituent l'étape de nucléation. Les espèces polynucléaires formées lors de cette étape se redissolvent rapidement : la concentration en précurseur diminue alors jusqu'à revenir à la valeur de $C_{nucléation}$. Dès que la concentration du milieu est inférieure à $C_{nucléation}$, la nucléation est bloquée. La croissance des germes continue par incorporation des précurseurs via des réactions d'olation et d'oxalation et s'arrête quand la concentration en espèces de charge nulle est inférieure à la solubilité du précipité. Le mûrissement d'Ostwald débute afin de d'obtenir des nanoparticules.

(a)



(b)

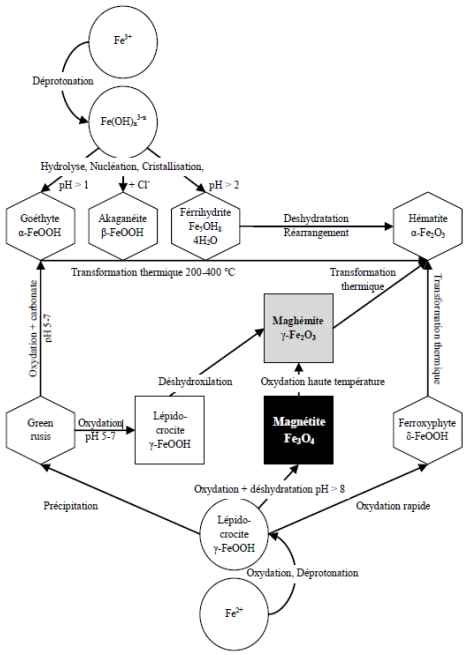


Figure 1. 23 : Phases obtenues à partir des cations ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+} en solution pour obtenir des oxydes de fer, d'après Ahn et al (a) [88] et d'après Schwertmann (b) [12].

Afin de contrôler au mieux la taille des nanoparticules, une délimitation marquée entre l'étape de nucléation et l'étape de croissance est un facteur essentiel. Une étape de nucléation relativement courte est également essentielle afin que tous les germes soient générés en même temps avec une taille similaire et avant une croissance homogène. Cependant, la synthèse par coprécipitation peut utiliser un chauffage dit conventionnel générant un gradient de température dans le système. Ce gradient de température entraîne une inhomogénéité de croissance dans le système soit des tailles différentes de nanoparticules.

De plus, Massart et Lefeburt ont montré dans leurs travaux que la nature de la base utilisée (par exemple NaOH, NH_4OH, KOH, CH_3NH_2) a une influence sur la polydispersité en taille des nanoparticules d'oxydes de fer [89,90]. Ces travaux montrent que l'ajout de cations dans le milieu réactionnel (NH_4^+, K^+, Li^+, Na^+, $N(CH_3)_4^+$), le pH de précipitation et le ratio Fe^{2+}/Fe^{3+} influencent également la taille des nanoparticules. Le contrôle de ces paramètres permet l'obtention de nanoparticules entre 4,2 et 16,6 nm.

Pour conclure, la synthèse par coprécipitation est une méthode simple à réaliser et permet d'obtenir rapidement des nanoparticules d'oxydes de fer en solution aqueuse. Malgré le contrôle des paramètres de synthèses pour obtenir des nanoparticules de taille contrôlée, les nanoparticules issues de cette synthèse ont tendance à s'agréger, générant ainsi une distribution de taille pouvant être large. Des traitements durant la synthèse ou après la synthèse peuvent être envisagés afin de limiter cette agrégation. Malgré le contrôle des paramètres de synthèse pour contrôler la taille des nanoparticules, la monodispersité obtenue reste inférieure à celle des échantillons synthétisés par d'autres méthodes comme la décomposition thermique.

3.2.2. La décomposition thermique

La décomposition thermique est une méthode de synthèse inspirée de la méthode d'élaboration de nanoparticules semi-conductrices de haute qualité en milieu non aqueux [91–93]. Cette méthode a été développée au début des années 1990 et a été utilisée pour synthétiser des nanoparticules métalliques et d'oxydes métalliques [32,94]. Le principe de la décomposition thermique repose, comme son nom l'indique, sur la décomposition d'un précurseur organométallique dans des solvants organiques à haut point d'ébullition. Cette technique de synthèse permet d'obtenir des nanoparticules d'oxydes de fer très bien cristallisées et qui sont fonctionnalisées directement dans le réacteur par un tensio-actif permettant d'assurer la stabilité colloïdale des nanoparticules [95,96].

Les précurseurs organométalliques les plus utilisées pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer sont l'acétylacétonate de fer (Figure 1. 24.a) [59,72,97], l'oléate de fer (Figure 1. 24.b) [98,99], le stéarate de fer (Figure 1. 24.c) [100,101] ou le carbonyle de fer (Figure 1. 24.d) [102,103]. Le précurseur est dissous à température ambiante (« heating up ») puis la solution est chauffée jusqu'au point d'ébullition du solvant libérant ainsi le métal du précurseur : la solution est alors sursaturée [104]. Une autre méthode consiste à injecter le précurseur organométallique directement dans la solution chauffée (« hot injection ») provoquant ainsi sa décomposition brutale et rapide dans la solution [105].

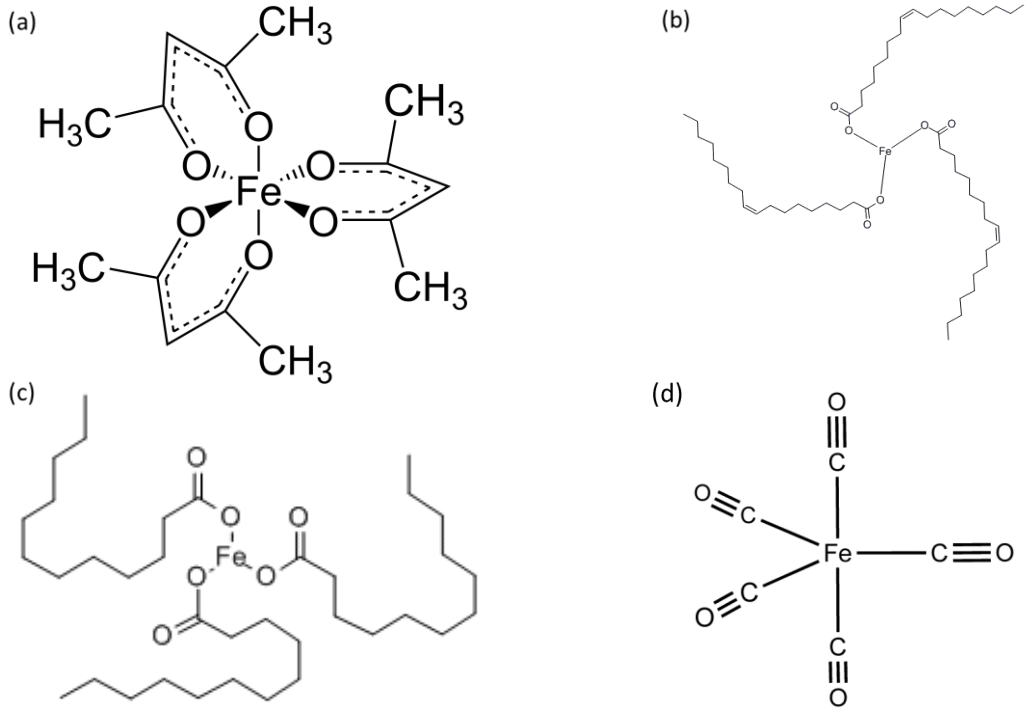


Figure 1. 24 : Représentation des formules chimiques des précurseurs organométalliques utilisées lors des synthèses de décomposition thermique pour former des nanoparticules d'oxyde de fer : acétylacétonate de fer III (a), oléate de fer III (b), stéarate de fer III (c) et carbonyle de fer III (d).

Le principal avantage de cette méthode de synthèse est un contrôle étroit de la monodispersité des nanoparticules. Leur taille peut être modulée entre 3 et 500 nm. L'ajout d'un tensio-actif appelé ligand ou surfactant, en fonctionnalisant les nanoparticules, permet de les stabiliser dans la solution et d'éviter des phénomènes d'agrégation. Les ligands les plus couramment utilisés sont des acides gras tels que l'acide oléique [106,107], ou des composés aminés parmi lesquels l'hexadécylamine [108,109] ou l'octylamine [110]. La longue chaîne carbonée et donc apolaire de ces ligands et leur conformation entraînent des encombrements stériques ainsi qu'électrostatiques limitant l'agrégation des nanoparticules. Le contrôle de la composition chimique de l'oxyde de fer (magnétite ou maghémite) est possible par ajout dans le milieu réactionnel d'un agent réducteur tel que l'oleylamine [111,112] permettant une réduction de cations Fe^{3+} en Fe^{2+}. La forme des nanoparticules d'oxyde de fer peut également être contrôlée [113]. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté la synthèse de nanoparticules de formes sphérique [72], cubiques [114], bipyramides [50], tétrapodes [115].

En conclusion, la synthèse par décomposition thermique permet d'obtenir de façon efficace des nanoparticules d'oxyde de fer avec une distribution de taille étroite, stable en solution sans phénomène d'agrégation et de forme contrôlée. Le contrôle des paramètres de synthèse permet ainsi la maîtrise de ces caractéristiques physicochimiques et la modulation des propriétés magnétiques [109,116].

Les nanoparticules issues de cette synthèse sont stables dans un solvant apolaire en raison de la présence des ligands hydrophobes fonctionnalisant leur surface. Cela peut présenter un inconvénient pour des applications biomédicales, les nanoparticules n'étant pas stables dans une solution aqueuse ou physiologique. Une étape supplémentaire est alors obligatoire après synthèse, soit en échangeant le ligand [117,118], soit en modifiant le ligand [118,119]. Le rendement diminue fortement et la stabilité en milieu aqueux peux s'avérer moindre comparativement à une synthèse effectuée directement dans l'eau [120].

3.2.3. Synthèse hydrothermale

La synthèse hydrothermale reprend le principe de la synthèse par coprécipitation : une solution aqueuse contenant des ions ferreux Fe^{2+} et des ions ferriques Fe^{3+} précipitent en présence d'une base [63,76]. Cependant, la solution est transférée et scellée dans une bombe hydrothermale et placée dans une étuve pour une durée allant de plusieurs heures à plusieurs jours. La synthèse se déroule ainsi à haute température, aux alentours de 180/200°C. Grâce à la bombe hydrothermale sous pression, le solvant ne s'évapore pas. Ce produit de synthèse conduit à la formation de nanoparticules d'une taille moyenne comprise entre 15 et 1000 nm [63,76] et présentant une très bonne cristallinité. Un inconvénient de cette méthode est la difficulté d'obtention d'un échantillon de nanoparticules monodisperses en taille.

3.2.4. Voie sol-gel

La voie sol-gel, pour solution-gélification ou *solution-gelling* en anglais, est une méthode de synthèse développée dans les années 1920 et démocratisée dans les années 80 et ce jusqu'au début des années 2010 [121]. Le principe de cette synthèse repose sur l'hydrolyse et la condensation de précurseurs métalliques. Cette méthode de synthèse, du fait de ces conditions opératoires de chimie douce, est très utilisée pour obtenir des nanoparticules [65,77]. La première étape, appelée hydrolyse, permet d'obtenir à partir d'alcoxydes métalliques $M(OR)_n$ (où M est un métal de degré d'oxydation n et OR un groupement alcoxyde correspondant à un alcool déprotoné) une solution colloïdale appelée « sol ». Durant cette étape, des fonctions -OH se forment à la surface du métal M. Suit une étape de condensation convertissant les fonctions hydroxyles en ponts oxo entre deux métaux (M-O-M) via un départ d'eau ou d'alcool : ces réactions de polycondensation sont des réactions d'oxolation. La solution colloïdale devient alors un gel humide. C'est en appliquant un traitement thermique et en broyant la poudre obtenue que les nanoparticules sont obtenues (Figure 1. 25). Cependant, même après traitement thermique, des traces de la matrice organique peuvent subsister dans le produit final.

Les nanoparticules d'oxyde de fer obtenues à partir de ce procédé ont une taille comprise entre 4 et 200 nm, avec une distribution de taille assez étroite et une très bonne cristallinité [65,77]. Une limite à cette méthode de synthèse est la stabilité des alcoxydes de fer.

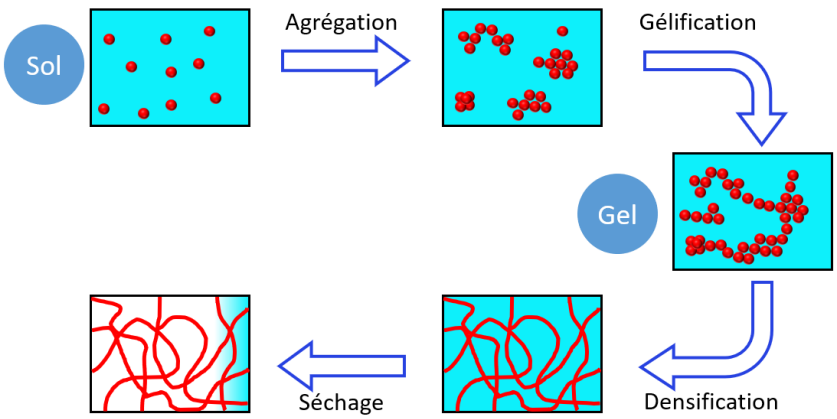


Figure 1. 25 : Schéma des étapes de synthèse de la méthode sol-gel.

3.2.5. Méthodes polyols

La méthode polyol est une méthode de synthèse réalisée dans un milieu polyol, comme par exemple l'éthylène glycol, le diéthylène glycol, … Le principe de cette synthèse est similaire à celui de la décomposition thermique. En effet, un précurseur organométallique, comme l'acétylacétonate de fer (Figure 1. 24.a) [78], est dissous dans le milieu polyol et est décomposé par élévation de la température jusqu'à ébullition du solvant. Ces polyols ont plusieurs rôles lors de cette synthèse : ils servent de solvant, d'agent réducteur réduisant une partie des ions Fe^{3+} en Fe^{2+} et de surfactant permettant de stabiliser les nanoparticules. Les nanoparticules obtenues lors de cette synthèse ne sont pas agrégées, ont une bonne cristallinité, sont sphériques et ont une taille comprise entre 6 et 100 nm [64,78]. Cependant, le solvant utilisé n'est pas totalement compatible avec le vivant pour des applications biomédicales. De plus, les molécules ancrées à la surface des nanoparticules synthétisées sont parfois toxiques et un traitement post-synthèse est obligatoire pour des applications dans le domaine biomédical. Des méthodes polyols ont été réalisées dans des bombes hydrothermales afin de pallier à cet inconvénient (méthodes dites polyol solvothermale [122,123]).

3.2.6. Synthèse en microémulsion

Le principe de la méthode de synthèse par microémulsion est d'élaborer des nanoparticules dans des microgouttes de phase aqueuse. Une monocouche de tensio-actif va les entourer afin de les disperser dans une phase organique, par exemple un solvant apolaire comme le cyclohexane [124]. Pour synthétiser des nanoparticules d'oxyde de fer par cette méthode, des microgouttes contenant les ions ferreux Fe^{2+} et les ions ferriques Fe^{3+} sont formées et entourées par une couche organique, formant ainsi un système biphasé. Ces microgouttes sont mélangées avec des microgouttes contenant une base. La mise en contact des deux types de microgouttes conduit à la formation des nanoparticules par une réaction de précipitation similaire à celle de la synthèse par coprécipitation. Du fait de la taille des microgouttes, les nanoparticules sont formées dans un milieu confiné et leur taille est alors bien contrôlée. Grâce à cette méthode de synthèse, les nanoparticules peuvent présenter un diamètre

compris entre 2 et 80 nm [60,79]. La morphologie peut être variée (sphérique, cubique, …). Cependant, les nanoparticules sont stables dans un milieu organique et n'ont pas une bonne cristallinité.

3.2.7. Synthèse par flux d'injection

Le principe de la synthèse par flux d'injection est similaire à celui de la synthèse par microémulsion : ces deux synthèses se déroulent dans un milieu confiné. Là où le milieu confiné est la microgoutte pour la synthèse par microémulsion, le milieu confiné pour la synthèse par flux d'injection est un capillaire. En effet, la synthèse se réalise grâce à un flux laminaire dans un réacteur en capillaire. Ce flux est soit continu, soit saccadé et il contient les réactifs afin d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer. Alvarez et al ont développé cette méthode de synthèse à partir de chlorure de fer II et de fer III pour obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer en présence d'une base (NaOH) [62]. Les nanoparticules sont directement stables dans une solution aqueuse et ont un diamètre compris entre 2 et 7 nm [62,81]. La synthèse est très reproductible avec un flux continu. Cependant, du fait que la synthèse se déroule dans un milieu aqueux, les nanoparticules ont tendance à s'agréger en étant dépourvues de fonctionnalisation de surface.

3.2.8. Voie électrochimique

La synthèse de nanoparticules par voie électrochimique permet d'obtenir des nanoparticules stables dans une solution aqueuse. Pour cela, une électrode sacrificielle (en fer généralement) est utilisée à l'anode et une électrode en fer, qui va générer les ions Fe^{3+} et Fe^{2+}, est utilisée comme cathode. L'électrolyte est un solvant comme le DMF (diméthylformamide) [125] ou Me_4NCl [126] et les nanoparticules sont formées dans la solution. Certaines synthèses par voie électrochimique utilisent plutôt une cathode en acier, une anode en graphite et une solution contenant les ions ferreux et ferriques comme électrolyte : les nanoparticules se forment alors à la surface des électrodes [127]. Les nanoparticules obtenues présentent un diamètre compris entre 3 et 30 nm [61,80]. Les nanoparticules sont très difficiles à laver quand elles sont déposées sur les électrodes : il est donc dure de les isoler des électrodes afin d'éliminer un maximum de molécules parasites.

3.2.9. Sonochimie

Comme son nom l'indique, cette synthèse permet d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer grâce à des ultrasons. Pour cela, les conditions de départ sont les mêmes que celles de la coprécipitation ou que celles de la décomposition thermique. Cependant, au lieu d'utiliser un chauffage pour la synthèse, des ultrasons sont appliqués au réacteur, vibrant à une certaine fréquence (entre 2 et 20 kHz en général) et permettant ainsi de décomposer le précurseur de départ. Ali Dheyab a montré que ces ultrasons génèrent des réactions radicalaires [67]. Ces réactions radicalaires et les ultrasons induisent une augmentation de la température et la formation des nanoparticules de diamètre compris entre 9 et 100 nm et stables soit en solution aqueuse soit en milieu organique en fonction des conditions de

départ [128,129]. Si la synthèse est rapide, la distribution de taille des nanoparticules obtenue est très large.

3.2.10. Aérosol

Les synthèses par aérosol, comme par exemple par spray ou par pyrolyse laser, sont très attractives car le rendement est très élevé [66,83]. Pour les réactions en spray, des solutions organiques contenant des ions ferriques Fe^{3+} et des agents réducteurs sont utilisées et pulvérisées sur un substrat : les nanoparticules sont obtenues après évaporation du solvant. La taille des nanoparticules varie entre 5 et 60 nm [130].

La synthèse par pyrolyse laser permet, quant à elle, de réduire le volume du réacteur. En effet, le laser chauffe le réacteur et décompose le précurseur de fer. La distribution de température dans le réacteur est minimisée entraînant l'obtention d'une distribution de taille des nanoparticules très étroite. Le diamètre varie entre 2 et 10 nm selon les conditions du laser [83].

3.3. Conclusion

Il existe plusieurs méthodes de synthèses de nanoparticules d'oxydes de fer (Fe_3O_4 ou γ-Fe_2O_3), permettant de les obtenir dans différents milieux (organiques ou aqueux) et sous différentes morphologies (sphériques, cubiques, …). Pour des applications dans le domaine biomédical, les nanoparticules d'oxyde de fer doivent être stables dans une solution aqueuse, avoir une distribution de taille étroite, éviter tout phénomène d'agrégation et posséder des propriétés superparamagnétiques. Pour respecter ce « cahier des charges », il nous faudrait combiner les avantages de la synthèse par coprécipitation (nanoparticules stables en milieu aqueux) et de la synthèse par décomposition thermique (distribution de taille étroite, nanoparticules monodisperses) tout en évitant les inconvénients de ces synthèses (phénomènes d'agrégation et distribution de taille large avec la coprécipitation, synthèse en milieu organique pour la décomposition thermique). Pour ce faire, il est envisageable 1) de modifier la synthèse de coprécipitation par ajout d'un ligand au milieu réactionnel afin d'éviter tout phénomène d'agrégation et 2) d'améliorer la monodispersité de l'échantillon par utilisation d'une méthode de chauffage non conventionnelle : le chauffage par micro-ondes.

4. Apport des micro-ondes dans les sciences

4.1. Introduction à la synthèse micro-ondes

Les premières synthèses micro-ondes reportées dans la littérature datent de 1986, sont des synthèses de molécules organiques et ont été réalisées par Gedye et Giguere avec des appareils micro-ondes de cuisine [131,132]. En effet, l'utilisation du micro-ondes s'était démocratisée dans le quotidien des foyers dans les années 1970 et ces auteurs ont choisi d'appliquer cette méthode pour chauffer leur

synthèse organique. Grâce à cela, les auteurs ont indiqué que la durée des synthèses était drastiquement réduite, jusqu'à 240 fois plus courte. Depuis, de plus en plus de chercheurs ont travaillé avec un micro-ondes pour réaliser leur synthèse, essentiellement en chimie organique [133,134] puis en chimie inorganique à partir des années 2000 [135]. Depuis le début des années 2000, de plus en plus de publications portent sur la synthèse grâce aux micro-ondes chaque année (plus de 50 000 sur l'année 2021) : la synthèse micro-ondes est devenue une méthode de synthèse à part entière dont les principes mécanistiques sont détaillés ci-après.

4.2. Principes du chauffage micro-ondes

4.2.1. Mécanisme de chauffage

Les ondes micro-ondes sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence est comprise entre 3 et 300 GHz, correspondant à des longueurs d'ondes de 1 mm à 0,1 m (Figure 1. 26). Les appareils micro-ondes commercialisés pour les ménages et pour les laboratoires opèrent à une fréquence de 2,45 GHz afin d'éviter toutes interférences avec les fréquences de télécommunications, de réseaux sans fil et les téléphones satellites militaires.

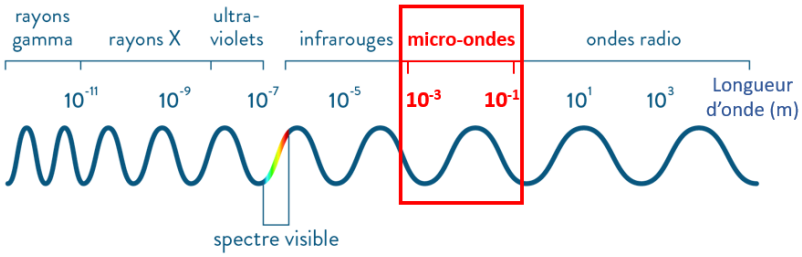


Figure 1. 26 : Les différents domaines du spectre électromagnétique.

La synthèse micro-ondes est basée sur le chauffage des matériaux par effet diélectrique. Ce chauffage est dépendant de la capacité d'un matériau (solvant ou réactif) à absorber l'énergie micro-ondes et à la convertir en chaleur. En effet, les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques avec une composante électrique $\vec{E}$ et une composante magnétique $\vec{B}$ (Figure 1. 27).

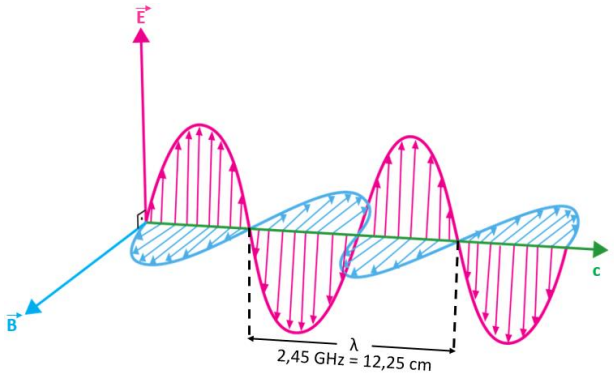


Figure 1. 27 : Représentation d'une onde micro-ondes composée d'un champ électrique (en rose) et d'un champ magnétique (en bleu). c représente la vitesse de la lumière (en vert).

La composante électrique d'un champ électromagnétique engendre le chauffage grâce à deux mécanismes : la polarisation des dipôles et la conduction ionique (Figure 1. 28). En effet, les molécules présentes vont se comporter comme des dipôles avec une partie positive et une partie négative. Sous l'effet du champ oscillant, ces dipôles oscillent et tentent de s'aligner selon le champ provoquant des mouvements de friction ainsi que des pertes diélectriques conduisant à une élévation de la température. Les particules étant chargées, elles se déplacent sous l'influence de ce champ, leurs collisions entre elles provoquant un échauffement. Pour un chauffage efficace, et notamment grâce à la polarisation des dipôles, la fréquence des ondes micro-ondes de 2,45 GHz est la meilleure. En effet, pour une fréquence trop rapide, les dipôles n'ont pas le temps de se réaligner et ne permettent pas les mouvements de frictions et le chauffage tandis que pour une fréquence trop lente, les dipôles sont en phase avec le champ et le chauffage est faible. La fréquence de 2,45 GHz constitue un bon compromis entre une fréquence rapide et une fréquence lente [136,137] : les dipôles s'alignent avec le champ électrique oscillant, l'orientation du champ est différente et un déphasage est induit entre l'orientation du champ et celle des dipôles générant de l'énergie convertie en chaleur [138].

Précisons que les photons émis par les micro-ondes à 2,45 GHz (soit 0,0016 eV) ne présentent pas assez d'énergie pour cliver une liaison chimique (par exemple, l'énergie de liaison C-C est de 3,61 eV). Les micro-ondes ne conduisent donc pas à des réactions chimiques par absorption de leur énergie électromagnétique comme les ultraviolets (4,1 eV) ou la lumière visible (2,5 eV) [134,139]. Les réactions chimiques réalisées grâce aux micro-ondes sont dues aux propriétés diélectriques des matériaux utilisées.

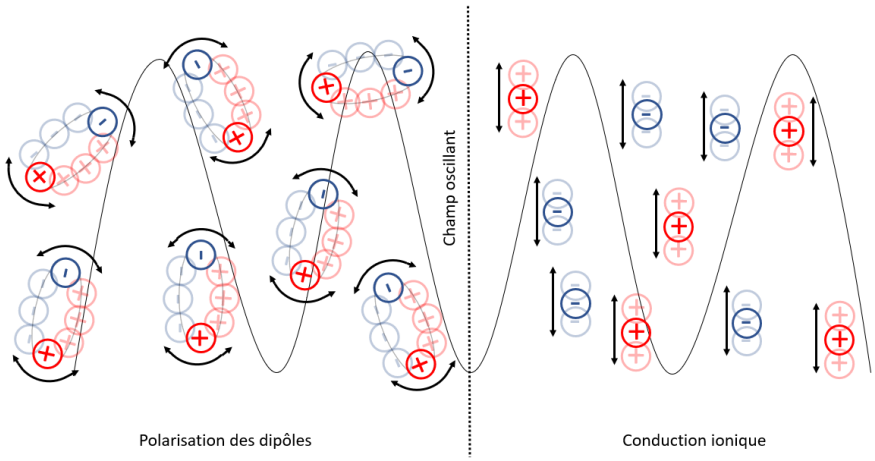


Figure 1. 28 : Schéma des deux composantes du chauffage électrique : la polarisation des dipôles et la conduction ionique.

4.2.2. Propriétés diélectriques

La capacité d'un solvant à générer de la chaleur grâce aux ondes micro-ondes est dépendante des propriétés diélectriques. En effet, la capacité d'un élément à convertir une énergie électromagnétique en chaleur à une fréquence et une température donnée est déterminée par l'équation 22 suivante :

$$\tan\delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \qquad \text{Eq.22}$$

Avec tan δ (nommé « loss tangent » dans la littérature) la tangente de l'angle de perte δ, ε' la constante diélectrique de l'élément et ε'' la perte diélectrique.

La constante diélectrique ε' et la perte diélectrique ε'' sont décrites grâce à la théorie de Maxwell. En effet, l'orientation des dipôles est équivalent au transfert de courant. Pour un diélectrique idéal sous une onde micro-onde, il n'y a pas de retard entre l'orientation des dipôles et le champ oscillant : le courant de déplacement **I** est déphasé de 90° par rapport au champ électrique **E** [140] (Figure 1. 29.a). La densité de charge **P**, résultant de la somme de tous les moments dipolaires, est définie comme :

$$P = (\varepsilon' - 1)\,\varepsilon_0\,E \qquad \text{Eq.23}$$

Avec ε' la constante diélectrique du milieu et ε_0 la constante diélectrique dans le vide.

Or, comme expliqué dans la partie précédente, un alignement partiel des dipôles permet de générer des frictions et de la chaleur : cet alignement partiel présente un retard par rapport au champ électrique appliqué. Ce retard, noté δ (angle de perte), induit donc une composante I*sin(δ) permettant un chauffage par perte diélectrique (Figure 1. 29.b et Figure 1. 30) [140].

A cause du déphasage entre le champ électrique et la polarisation, une constante diélectrique complexe ε* peut être décrite par l'équation suivante [141] :

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - j\varepsilon'' \qquad \text{Eq.24}$$

Le diagramme de phase de la constante diélectrique ε' en fonction de la perte diélectrique ε'' est représenté en Figure 1. 29.c. La tangente de l'angle de perte δ est dépendant de ε' et de ε'' comme exprimé dans l'équation Eq.22.

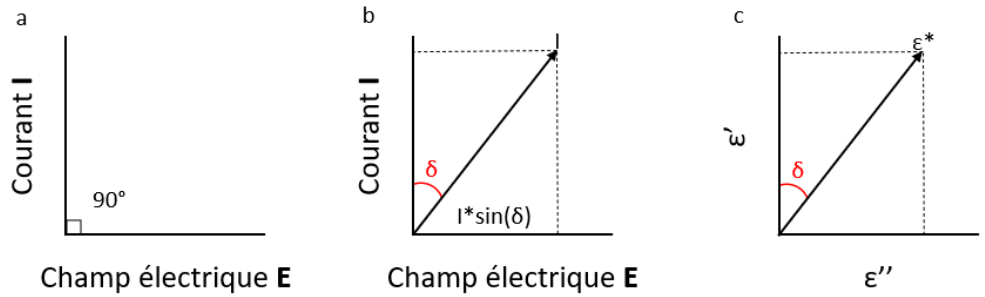


Figure 1. 29 : Diagramme de phase pour un diélectrique idéal (a), pour un diélectrique avec un déphasage de δ (b) et la relation entre l'angle de perte δ, la constante diélectrique ε' et la perte diélectrique ε'' [140].

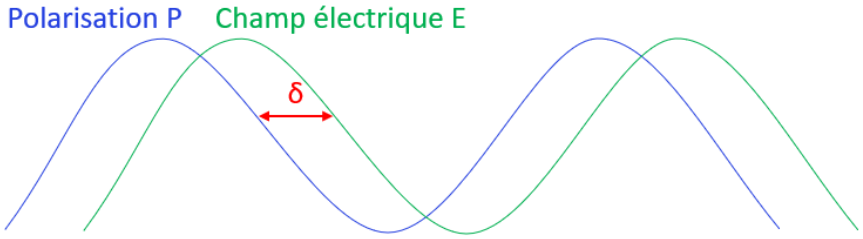


Figure 1. 30 : Schéma montrant le retard de la polarisation P par rapport au champ électrique E de phase δ [142].

Cette valeur de tan(δ) est une valeur beaucoup reportée dans la littérature qui permet d'estimer la vitesse de montée en température d'un solvant sous des micro-ondes [133,140,143]. En effet, plus le rapport entre ε' et ε'' est élevé, plus le chauffage est efficace. Il existe une nomenclature permettant de classifier les solvants :

- élevé quand la valeur de tan(δ) est supérieure à 0,5
- moyenne quand la valeur de tan(δ) est comprise entre 0,1 et 0,5
- faible quand la valeur de tan(δ) est inférieure à 0,1

Certains solvants comme le benzène ou le cyclohexane sont transparents aux micro-ondes car ils n'ont pas de moments dipolaires (Leur valeur de tan(δ) est inférieure à 0,01.).

Un résumé des différentes valeurs de « loss tan » est décrit dans le Tableau 1. 2. Les différents solvants sont classés selon les catégories décrites précédemment [133,138,140,143].

Tableau 1. 2 : Tableau des différents solvants utilisés en chimie en fonction de leur efficacité de chauffage au micro-ondes (tan δ) [133,138,140,143].

Elevé (tan(δ) > 0,5)		Moyenne (0,5 > tan(δ) > 0,1)		Faible (tan(δ) < 0,1)	
Solvant	**tan(δ)**	**Solvant**	**tan(δ)**	**Solvant**	**tan(δ)**
Ethylène glycol	1,350	2-butanol	0,447	Chloroforme	0,091
Ethanol	0,941	Dichlorobenzène	0,280	Acétonitrile	0,062
DMSO	0,825	NMP	0,275	Acétate d'éthyle	0,059
2-propanol	0,799	Acide acétique	0,174	Acétone	0,054
Acide formique	0,722	DMF	0,161	THF	0,047
Méthanol	0,659	Dichloroéthane	0,127	Dichlorométhane	0,042
Nitrobenzène	0,589	Eau	0,123	Toluène	0,040
1-butanol	0,571	Chlorobenzène	0,101	Hexane	0,020

Pour des synthèses de nanoparticules d'oxyde de fer en décomposition thermique, les solvants les plus couramment utilisés sont peu polaires avec un tan δ faible : le chauffage via des micro-ondes sera plus lent qu'avec des solvants plus polaires.

Pour des synthèses de type coprécipation, l'eau présente un tan δ de 0,123 et la qualité de chauffage est correcte avec des micro-ondes.

4.3. Avantages du chauffage micro-ondes

Les synthèses chimiques sont chauffées dans la majorité des cas grâce à la diffusion de la chaleur provenant d'une source de chaleur, comme par exemple un bain d'huile. Ce transfert de chaleur de la source vers le milieu réactionnel se fait en deux étapes : un transfert de chaleur de la source vers les parois contenant le milieu réactionnel a lieu suivi d'un transfert de chaleur des parois vers le milieu réactionnel. Ce transfert de chaleur est lent et hétérogène au sein du milieu réactionnel et s'accompagne d'un gradient de température (Figure 1. 31.a) [144]. Ce gradient de température au sein du milieu réactionnel peut générer localement des surchauffes, des produits de synthèse parasites ou des décompositions non voulues. Pour éviter ce gradient de température, une convection (généralement une agitation du milieu grâce à un barreau aimanté) est réalisée.

Au contraire, avec un chauffage par micro-ondes, le gradient de température est minimisé (Figure 1. 31.b). En effet, les ondes micro-ondes pénètrent facilement le milieu réactionnel produisant un chauffage interne plus efficace grâce aux propriétés diélectriques décrites précédemment : la polarisation des dipôles ainsi que la conduction ionique sont homogènes au sein du milieu réactionnel générant une température quasi homogène.

Pour permettre cette irradiation par des micro-ondes, le réacteur doit être un matériau qui est transparent à ces ondes. Différents types de réacteurs sont utilisés comme des borosilicates (tan $\delta = 10.10^{-4}$), du quartz (tan $\delta = 0{,}6.10^{-4}$), du Téflon (tan $\delta = 1{,}5.10^{-4}$).

De plus, la conversion de l'énergie des ondes micro-ondes en énergie thermique se fait très rapidement, permettant ainsi un chauffage du milieu réactionnel plus rapide qu'avec une méthode conventionnelle.

Avec ces caractéristiques, pour des précurseurs en concentration élevée, la nucléation est extrêmement rapide permettant d'obtenir des particules petites et monodisperses.

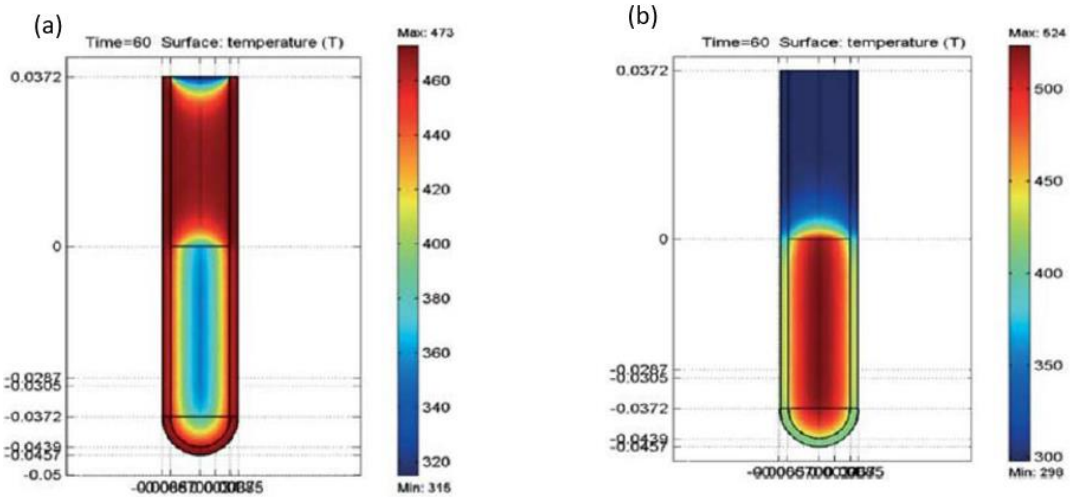


Figure 1. 31 : Profil de température après une minute de chauffage dans un bain d'huile (a) et aux micro-ondes (b) [144].

Les micro-ondes permettant d'appliquer des rampes de températures rapides et une température homogène au sein du réacteur, les temps de synthèses sont diminués. La possibilité de réaliser les synthèses sous pression (pouvant aller jusqu'à 30 bars) avec, pour la plupart des équipements, des chambres réactionnelles d'accueil petites et isolées de l'environnement extérieur contribue à la diminution du temps de synthèse. En effet, notamment avec des réactions organiques, les temps de réactions passent de l'ordre de la journée à l'ordre de la minute voir de la seconde [133,134]. Par exemple, si la réaction entre le o-phénylènediamine avec l'acide acétique pour former le 2-méthylbenzimidazole dure 3 jours à 60°C dans des conditions classiques (Figure 1. 32) [145], cette réaction ne dure que 5 minutes avec des rendements beaucoup plus élevés (environ 97% de rendement avec les micro-ondes contre 93% en chauffage classique) avec un chauffage micro-ondes à 200°C.

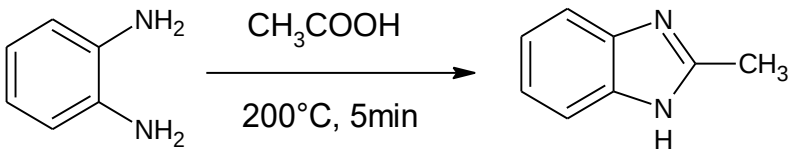


Figure 1. 32 : Schéma de la réaction pour obtenir du 2-méthylbenzimidazole à partir d'orthophénylènediamine et d'acide acétique [145].

Le temps de synthèse est également fortement diminué pour l'élaboration de matériaux inorganiques [143,146]. Par exemple, des nanoparticules de TiO_2 ont été synthétisées avec un chauffage conventionnel (synthèse de type hydrothermale) et avec des micro-ondes [147]. Les nanoparticules de TiO_2 sont obtenues après 48h de synthèse alors que celles obtenues avec les micro-ondes sont

obtenues au bout de 2h. De plus, les nanoparticules obtenues avec les micro-ondes présentent une taille plus petite et une distribution plus étroite : les échantillons sont plus homogènes avec une méthode micro-ondes qu'avec un chauffage dit conventionnel.

4.4. Les réacteurs micro-ondes : multimodes vs monomodes

Un four micro-ondes est composé de deux grandes parties : le magnétron et le four. Les électrons provenant du courant électrique circulent entre l'anode en cuivre et la cathode dans le magnétron (Figure 1. 33) se déplacent en spirale à cause des aimants présents. Ce tourbillon d'électron crée un champ magnétique à une fréquence élevée (due aux cavités résonantes). Une antenne collecte les ondes générées [148] et les envoie vers un guide d'ondes les menant dans le four où sera placé le réacteur de synthèse (Figure 1. 34).

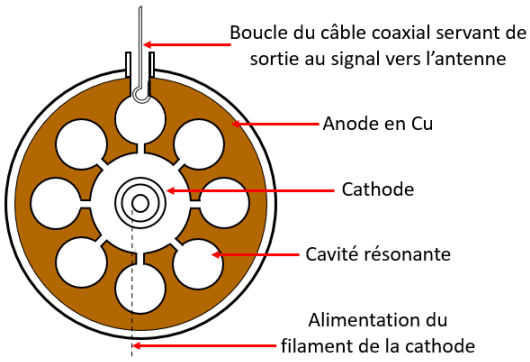


Figure 1. 33 : Schéma d'un magnétron à cavités résonantes.

Les premiers fours micro-ondes utilisés pour les synthèses étaient des fours à usage domestique. De nombreuses explosions ont eu lieu à cause de l'augmentation rapide et incontrôlée de la température au sein des solvants organiques, un contrôle total de la pression et de la température au sein de l'échantillon n'étant pas assuré au sein de ces fours micro-ondes considérés comme des « boîtes noires ». De nouveaux systèmes de micro-ondes spécifiques ont dû être développés afin de mieux contrôler la pression et la température.

Ces nouveaux fours micro-ondes sont dits multimodes : ils possèdent plusieurs modes résonants au sein de la cavité générant un champ électromagnétique non uniforme (Figure 1. 34.a). Ces modes sont dus à la différence de taille entre la cavité et le guide d'onde qui conduira les ondes à se diriger dans tous les directions de l'espace et à se réfléchir sur les parois. Ces réflexions conduisent à la superposition des ondes incidentes et des ondes réfléchies formant des ondes stationnaires à l'origine d'un champ électromagnétique spatial non homogène et d'une température au sein de la cavité non-uniforme [149]. Le volume de la cavité étant important (supérieur à 40 L) pour les fours développés à cette période, la densité du champ définie en Watt par litre est faible et la puissance des micro-ondes

appliquées se révèle trop faible pour chauffer correctement l'échantillon. Une nouvelle génération de fours micro-ondes est développée avec des cavités plus petites (1 L) afin d'augmenter la densité du champ et d'améliorer la vitesse de chauffage (Figure 1. 34.b).

Par la suite, pour améliorer le rendement ainsi que la vitesse de chauffage, des micro-ondes avec une seule onde électromagnétique (dit monomode) sont développés à la fin des années 1990. La présence d'une seule onde, toujours générée par la superposition des ondes incidentes et réfléchies, implique une seule interaction avec le milieu réactionnel et cette onde induisant un meilleur contrôle du chauffage (Figure 1. 34.c). En complément, le volume du réacteur diminue (entre 10 et 30 mL) entraînant une densité du champ beaucoup plus élevée que sur les modèles décrits précédemment : les synthèses avec cet appareil peuvent être menées à des puissances faibles tout en ayant un chauffage efficace [149].

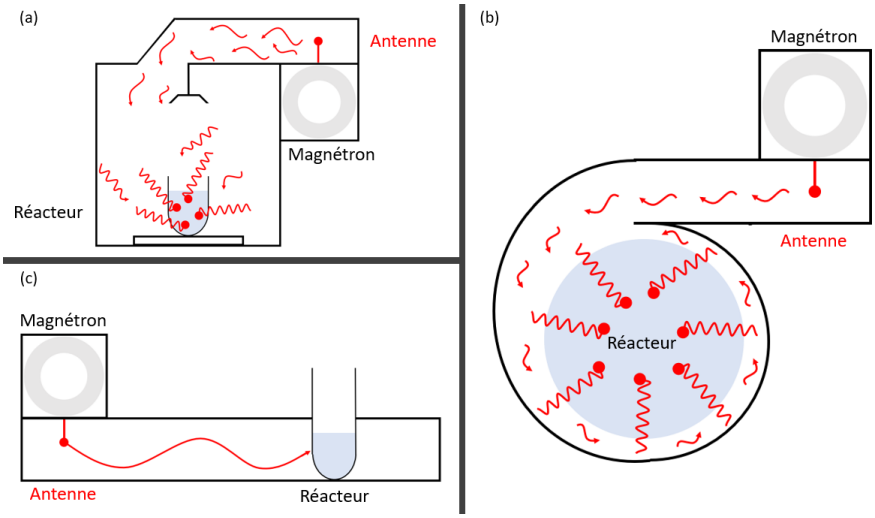


Figure 1. 34 : Schéma de la propagation des ondes micro-ondes dans les fours de types multimodes (a) et (b) et de type monomode (c) d'après [150].

Quelle que soit la méthode d'élaboration mise en œuvre, une étape importante suit la synthèse de nanoparticules : l'étape de lavage.

5. Méthodes de lavage

Afin d'obtenir les nanoparticules les plus « propres » possibles, il existe une grande variété de méthodes de lavage (ou de méthodes de purification). Cette étape de lavage est très importante afin d'éviter toute présence d'impuretés au sein des solutions de nanoparticules, notamment des impuretés toxiques pour le corps humain pour une utilisation dans le domaine biomédical. De plus, cette étape de lavage permet parfois de séparer les agrégats de nanoparticules ainsi que de fractionner les nanoparticules en fonction de leur taille [151]. Une brève description des différentes méthodes de lavage et de tris de nanoparticules est présentée dans la suite du manuscrit.

5.1. Centrifugation

La méthode la plus utilisée pour laver les nanoparticules est la centrifugation [152]. Les échantillons à purifier sont placés dans des tubes de centrifugation et, grâce à la force centrifuge, une séparation entre les objets lourds et légers s'effectue : les objets lourds (dans notre cas, les nanoparticules) sédimentent au fond du culot alors que les objets légers (contre ions, ligands, éléments parasites) se trouvent dans le surnageant. Afin d'améliorer le lavage, plusieurs étapes par centrifugation sont nécessaires avec une remise en solution des nanoparticules entre chaque centrifugation. Pour sélectionner une taille de nanoparticules, un ajustement de la vitesse et de la durée de centrifugation est réalisé. Cependant, si un paramètre tel que la vitesse, la durée ou le nombre de centrifugation est trop important, une agrégation des nanoparticules est possible due au « stress physique » subi lors de cette étape. Enfin, si des agrégats de nanoparticules sont déjà présents dans la solution, l'étape par centrifugation ne permet pas de les éliminer lors du 1er lavage, sauf si la vitesse est faible (Figure 1. 35) [153].

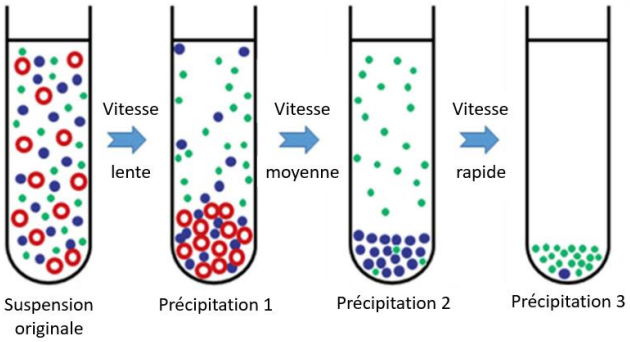


Figure 1. 35 : Schéma illustrant les différentes méthodes de séparation en fonction de la vitesse de centrifugation avec des particules larges en rouge, des particules de taille moyenne en bleu et des petites particules en vert [153].

Pour améliorer ce type de lavage, un gradient de viscosité peut être appliqué permettant un fractionnement de tailles des nanoparticules. Cela est possible dans le cas de tubes de centrifugation contenant des liquides avec des densités et des viscosités différentes : un liquide très visqueux au fond du tube et un liquide dont la viscosité est proche de celle de l'eau en haut du tube. Pour réaliser ces types de centrifugation, un mélange d'une solution tampon, d'une solution de NaCl et d'une solution d'acide polyacrylique (PAA) est utilisé [154] (Figure 1. 36) ou un mélange d'eau et de polyvinylpyrrolidone (PVP) avec un pourcentage massique de PVP décroissant au sein du tube [155]. Enfin, entraîner des gradients de viscosité est également réalisable avec des concentrations différentes (par exemple de sucrose dans du PBS) qui permettent de séparer des nanoparticules sous formes de micelles.

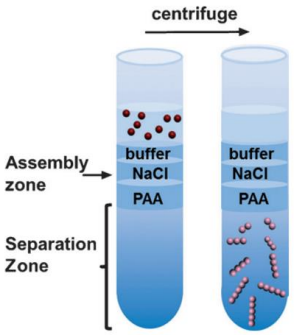


Figure 1. 36 : Schéma d'un gradient de viscosité avec du PAA pour un lavage par centrifugation [154].

5.2. Procédé de sélection de taille par précipitation

La méthode de sélection de taille par précipitation (Size Selective Precipitation, SPP) est une méthode de lavage qui permet, comme son nom l'indique, de sélectionner une taille de nanoparticules en solution en jouant sur différents paramètres (la polarité des solvants [156], l'ajustement du pH [157], la force ionique [158]). La méthode la plus utilisée est liée à la polarité des solvants permettant la déstabilisation et donc la précipitation des nanoparticules. Un mélange de deux solvants avec des polarités très éloignées (acétone et hexane par exemple) permet en effet la précipitation de nanoparticules : les nanoparticules les plus grosses sont déstabilisées en premier à cause de cette différence de polarité et précipitent.

La deuxième méthode basée sur la différence de polarité des solvants pour sélectionner la taille, dite méthode par extraction, est inspirée de la chimie organique. Deux types de solvants sont utilisés dans cette méthode : un solvant dans lequel les nanoparticules se dispersent (« bon solvant ») et un solvant dans lequel les nanoparticules ne se dispersent pas (« mauvais solvant »). Par exemple, pour des nanoparticules issues de la décomposition thermique, le solvant permettant de les stabiliser est en général un solvant apolaire (comme le cyclohexane) car elles possèdent une couche d'acide gras en surface. Pour laver ces nanoparticules, un mélange de solvant apolaire et de solvant polaire est alors utilisé (éthanol/hexane) [59].

Pour des nanoparticules stables dans un milieu aqueux, un mélange d'eau et d'éthanol est envisagé pour sélectionner la taille des nanoparticules [87].

Cette technique de purification permet de sélectionner au mieux la taille des nanoparticules [159]. Son efficacité augmente par combinaison avec d'autres techniques de purification comme la centrifugation.

5.3. Dialyse

La méthode de purification par dialyse est couramment utilisée notamment en biochimie [160,161]. L'échantillon à laver est placé dans un tube de dialyse constitué d'une membrane semi-perméable. Cette membrane ne permet le passage que de molécules dont le poids moléculaire est inférieur au seuil de coupure. Ce tube est ensuite introduit dans une solution d'eau ultra-pure et, grâce au

phénomène d'osmose, les petites molécules (ions parasites, ligands libres, …) migrent dans l'eau ultra-pure et diffusent de manière homogène (Figure 1. 37). Afin d'améliorer le lavage des nanoparticules, plusieurs dialyses successives sont nécessaires impliquant un procédé très long (de l'ordre de plusieurs jours). Cette méthode est souvent décrite comme une méthode douce pour les échantillons car imposant peu de stress physique aux nanoparticules. Cependant, plusieurs auteurs ont montré que la purification de nanoparticules par dialyse, et notamment des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées, provoquait des modifications au niveau de la surface des nanomatériaux : ce changement se traduit par une diminution du taux de ligand en surface et entraîne donc une agrégation des nanoparticules [162,163].

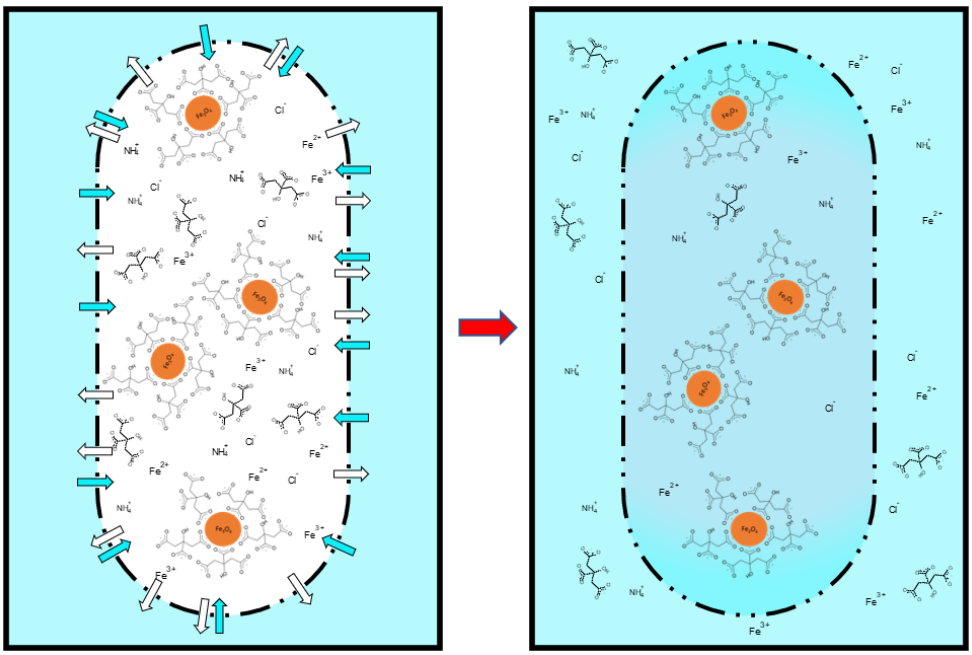


Figure 1. 37 : Schéma du principe de la dialyse. Les petites molécules (ions parasites, ligands libres) traversent la paroi semi-perméable et diffusent dans l'eau ultra-pure afin d'équilibrer les concentrations entre le tube de dialyse et la solution. L'eau diffuse au sein du tube de dialyse.

5.4. Ultrafiltration

Cette méthode de purification est similaire à la méthode de dialyse décrit juste au-dessus : les nanoparticules sont filtrées par une membrane avec une taille de pores définie et contrôlée ne laissant passer que des molécules dont le poids moléculaire est inférieur au seuil de coupure [164]. Pour cette méthode, la force qui permet de séparer les petites molécules des nanoparticules n'est pas la pression osmotique mais la gravité. Cette méthode peut être utilisée avec la centrifugation pour améliorer le lavage des nanoparticules. En effet, à l'aide d'un tube de centrifugation muni d'une membrane poreuse, la séparation entre les petites molécules (ligands libres, ions parasites, …) et les nanoparticules est accentuée.

Cependant, comme pour la dialyse, cette technique dénature l'état de surface des nanoparticules. En effet, comme le prouve Lassenberger dans une étude, le taux de ligands en surface des nanoparticules

diminue avec la succession d'étapes de lavage par ultrafiltration, entraînant une agrégation des nanoparticules dans la solution [162].

5.5. Séparation magnétique

Cette technique de lavage est très utilisée lorsque les matériaux à purifier sont des matériaux magnétiques. Elle consiste à attirer les nanoparticules au sein d'une solution grâce à un champ magnétique émis par un aimant permanent (Fe-Nd-B) [153,162]. Les plus grosses particules sont plus facilement attirées par le champ magnétique que les petites. Des clusters, voire des agrégats, sont de plus attirés très rapidement permettant de réaliser un tri des particules selon leur taille et d'améliorer la monodispersité et la stabilité d'un échantillon.

Des lavages par séparation magnétique sont également possibles sous champ magnétique oscillant (généré par un électro-aimant), la modulation du champ permettant la sélection d'une taille minimale de nanoparticules [165].

Cette méthode de purification permet de séparer facilement et rapidement les nanoparticules des autres éléments de la solution (ions parasites, ligands libres, …) et d'éliminer des sous-produits de synthèse, comme par exemple pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par coprécipitation, des oxohydroxydes ou des hydroxydes de fer non magnétiques. Afin d'optimiser le lavage, cette technique peut être couplée à celles décrites précédemment.

5.6. Les autres techniques de purification

D'autres techniques de purification de nanoparticules existent mais sont soit moins courantes soit plus difficiles à mettre en œuvre. Par exemple, des colonnes échangeuses d'ions sont utilisées pour éliminer les espèces non voulues avec une charge particulière. Cependant, cette technique est longue et un risque de perte de nanoparticules est à envisager [166].

Une autre technique basée sur la charge des molécules présentes en solution est l'électrophorèse. Grâce à un champ électrique appliqué, les molécules migrent selon leur charge permettant un tri efficace des nanoparticules. Néanmoins, cette technique est peu efficace si le greffage des ligands n'est pas optimisé [167].

La chromatographie est un autre moyen de séparer les nanoparticules des autres produits de synthèse [168]. Cette technique peut être rapide si tous les éléments présents dans la solution (ions parasites, ligands libres, …) sont connus. Une séparation des nanoparticules en fonction de leur taille peut s'opérer du fait de la vitesse d'élution différente : une nanoparticule plus grosse mettra plus de temps à ressortir de la colonne qu'une nanoparticule plus petite. Le seul inconvénient à cette technique est la dénaturation de la surface des nanoparticules. L'éluant peut dénaturer les ligands en surface des nanoparticules et entraîner leur agrégation.

5.7. Conclusion

En conclusion, afin d'avoir une purification quasi-totale d'une solution de nanoparticules, plusieurs techniques de lavages existent avec chacune leurs avantages comme leurs inconvénients. Pour optimiser le lavage, la meilleure solution est donc de combiner différentes techniques de lavages. Cependant, les techniques choisies ne doivent pas dénaturer les nanoparticules et notamment leur couche de ligands.

6. La stabilisation des nanoparticules d'oxyde de fer en solution

Afin d'éviter toute agrégation des nanoparticules lors d'une synthèse, une étape de stabilisation est importante. De plus, grâce à cette stabilisation, la taille des nanoparticules peut être contrôlée, permettant d'obtenir des échantillons très monodisperses. Enfin, la stabilisation permet d'apporter de nouvelles fonctions et propriétés physico-chimiques à celles des nanoparticules d'oxyde de fer. Dans cette partie, le comportement des nanoparticules d'oxyde de fer dans une solution sera décrit puis les différents mécanismes et méthodes de stabilisation des nanoparticules seront présentés. Enfin, une présentation de différentes molécules pour des applications dans le domaine biomédical sera réalisée.

6.1. Comportement des nanoparticules d'oxyde de fer dans une solution

Les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées dans une solution aqueuse (via une synthèse par coprécipitation, par voie hydrothermale) ont tendance à s'agréger à pH neutre. En effet, à la surface des nanoparticules se trouvent des charges partielles provenant des atomes de fer. Ces atomes de surface se comportent comme des acides de Lewis et peuvent réagir avec des donneurs d'électrons. La principale molécule réagissant avec ces atomes de surface est la molécule d'eau : les atomes de fer se lient avec elle pour former des groupements hydroxydes [169,170]. La charge à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer peut alors être positive (protonation des hydroxydes en $-OH_2^+$), négative (déprotonation des hydroxydes en $-O^-$) ou neutre (présence des hydroxydes -OH) en fonction du pH considérant que le point isoélectrique (valeur du pH quand la charge à la surface est globalement neutre électriquement) est compris entre 6,8 et 7,4 [89,171,172]. A ces valeurs de pH et à leurs alentours (pH entre 5 et 9), les charges à la surface des nanoparticules ne sont plus assez importantes pour que les répulsions électrostatiques empêchent l'agrégation des nanoparticules sous l'effet des interactions de Van der Waals. Une solution pour éviter cette agrégation des nanoparticules est la protection de la surface par des molécules (souvent organiques) de fonctionnalisation ou la création d'une coquille avec un métal sans charge comme de l'or [173].

Ajoutons que, en solution, les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent générer du stress oxydatif. En effet, plusieurs auteurs ont montré que des nanoparticules d'oxyde de fer « nues » (c'est-à-dire sans

couche protectrice autour d'elles) libèrent des radicaux de type $OH^{\bullet}$. Cette réaction se fait en présence de peroxyde d'hydrogène et a été décrite par Fenton en 1894 [174] :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet} \qquad \text{Eq.25}$$

Ce radical est le deuxième oxydant le plus fort présent dans la nature. Si il est dans le corps humain, $OH^{\bullet}$ est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones des acides gras de la paroi cellulaire réduisant ainsi la fluidité de la membrane : cela entraîne la mort cellulaire [175,176].

Enfin, si les nanoparticules d'oxyde de fer, et notamment des nanoparticules de magnétite Fe_3O_4, sont en milieu aqueux, une oxydation des ions Fe^{2+} en ions Fe^{3+} peut avoir lieu et transforme la magnétite en maghémite γ-Fe_2O_3.

La formation d'une couche protectrice autour des nanoparticules d'oxyde de fer est donc fortement recommandée pour des applications dans le domaine biomédical et nécessite une bonne compréhension des mécanismes de stabilisation.

6.2. Mécanismes de stabilisation des nanoparticules d'oxyde de fer

Afin de stabiliser les nanoparticules d'oxyde de fer dans une solution, il faut trouver un équilibre entre les forces mis en jeux pour permettre une bonne dispersion dans le solvant. Pour cela, deux formes de stabilisation existent : la stabilisation électrostatique et la stabilisation stérique.

6.2.1. La stabilisation électrostatique

En 1941, Dejarguin et Landau développent une théorie sur la stabilité de colloïdes dans une solution. Ils décrivent une instabilité fondamentale générée par des forces de types Van der Waals fortes de courtes portées et contrées par l'influence de répulsions électrostatiques [177]. Quelques années après, Verwey et Overbeek confirment de façon indépendante ces résultats [178]. De nos jours, cette théorie de stabilité des colloïdes entre les particules en fonction de la distance se nomme la théorie DLVO pour Derjarguin-Landau-Verwey-Overbeek. L'énergie totale d'interaction entre deux particules est la somme des forces électrostatiques de Van der Waals et du recouvrement des doubles couches électriques.

Il existe trois types d'interactions de Van der Waals : une interaction dipôle – dipôle (Keesom), dipôle – dipôle induit (Debye) et dipôle induit – dipôle induit (London) [179]. Pour des nanoparticules, les interactions de types London sont prédominantes.

Comme décrit dans le paragraphe précédent sur le comportement des nanoparticules dans l'eau, la surface des nanoparticules est chargée lorsqu'elles sont en contact avec le solvant polaire. Les ions présents dans la solution migrent vers la surface de la nanoparticules formant deux couches (Figure 1. 38). La première couche est dense et est composée d'ions avec une charge opposée à celle de la surface de la nanoparticule : cette couche se nomme la couche de Stern [180]. Les ions sont adsorbés à la surface de la nanoparticule grâce à des forces électrostatiques ou des interactions de Van der Waals. Une deuxième couche plus diffuse composée de contre-ions (ions de charge opposée à la surface de la nanoparticule) et de co-ions (ions de charge identique à la surface des nanoparticules) sépare deux couches de Stern de deux nanoparticules différentes : cette couche diffuse se nomme couche de Gouy-Chapman [181].

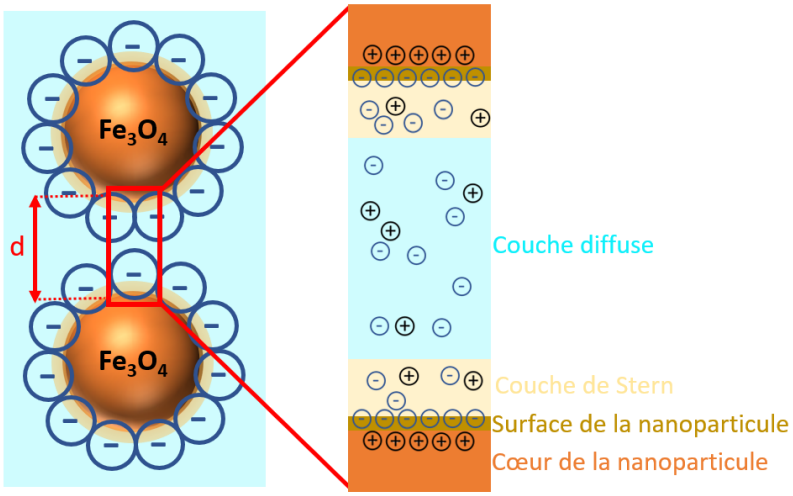


Figure 1. 38 : Schéma de la répulsion électrostatique entre deux nanoparticules d'oxyde de fer selon la théorie de Stern.

L'énergie totale d'interaction E_{tot} entre deux particules qui traduit la stabilisation électrostatique est la somme entre l'énergie issue des interactions de Van der Waals E_{VdW} et celle issue du recouvrement des doubles couches électriques E_{de} telle que :

$$E_{tot} = E_{VdW} + E_{de} \qquad \text{Eq.26}$$

$$E_{VdW} = -\frac{A \times r}{12d^2} \qquad \text{Eq.27}$$

$$E_{de} = 2\pi \times r \times \varepsilon\varepsilon_0 \times \kappa \times P_0^2 \times e^{-\kappa d} \qquad \text{Eq.28}$$

Avec, pour l'Eq.27, A la constante d'Hamaker des particules, r le rayon de la nanoparticule, d la distance entre deux particules (d << r). Pour l'Eq.28, r est le rayon de la nanoparticule, ε la permittivité de la phase de dispersion, ε_0 la permittivité du vide, κ la longueur de Debye (qui correspond à l'épaisseur de la couche de Stern), P_0 le potentiel de surface des nanoparticules et d la distance entre deux

nanoparticules. Cette équation n'est valable que lorsque le recouvrement des doubles couches électriques est faible ($\kappa d << 1$).

Grâce à l'équation 26, cinq domaines peuvent être définis pour décrire le potentiel d'interaction total entre deux particules en fonction de la distance d qui les sépare (Figure 1. 39) [182].

Le premier domaine (A sur la Figure 1. 39) correspond à une très grande distance d (d > 100 nm) entre deux nanoparticules. A cette distance, l'énergie totale d'interaction est nulle.

Le deuxième domaine (B) correspond à une diminution de la distance d entre deux nanoparticules. La courbe de l'énergie totale diminue jusqu'à un minimum secondaire. Les forces de Van der Waals sont légèrement plus fortes que les forces répulsives d'où le minimum. Si ce minimum est inférieur à l'énergie cinétique et thermique des nanoparticules, celles-ci ont tendance à floculer (Ce phénomène est réversible en agitant la solution ou en augmentant légèrement la température.).

Le troisième domaine (C) correspond à une plus grande diminution de la distance entre les deux particules. A cette distance, les énergies de répulsions sont plus fortes que les énergies attractives : un maximum primaire, noté M, apparait. Ce point M correspond à la présence d'une barrière d'énergie qui empêche le rapprochement entre deux nanoparticules. De plus, la valeur du point M peut déterminer la valeur de la concentration critique de coagulation : au-delà de cette valeur, les nanoparticules s'agrégeront rapidement. Cette valeur est dépendante du milieu des nanoparticules (et donc de la charge des ions présents dans la couche de Stern) ainsi que du potentiel de surface des nanoparticules. Pour des nanoparticules d'oxyde de fer dans une solution aqueuse contenant du NaCl, cette valeur est de 710 mM à 20°C et à pH = 7,2 [183].

Le quatrième domaine (D) correspond au minimum du potentiel d'interaction total : c'est le minimum primaire. A cette distance d, les forces d'attractions de type Van der Waals sont plus importantes que les forces répulsives : les agrégats se forment facilement et de façon irréversible. Ce minimum correspond à un puits de potentiel traduisant une forte agrégation des nanoparticules. Plus ce puits est profond, plus il est difficile de redisperser les nanoparticules.

Enfin, le cinquième domaine (E) correspond à une distance quasi nulle entre deux nanoparticules (de l'ordre de l'Angström). Le potentiel est infini, ce qui correspond à la répulsion lors de l'interpénétration des nuages électroniques autour des noyaux : c'est l'énergie de Born.

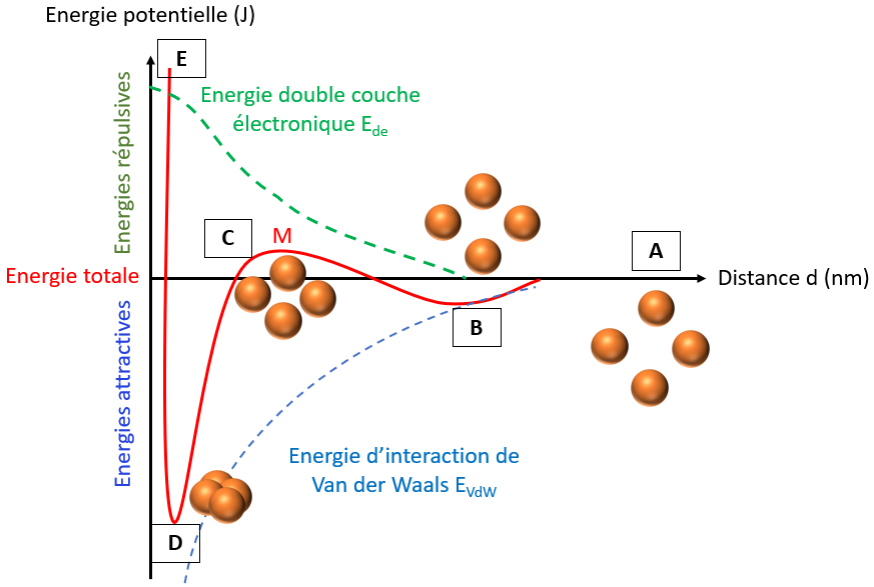


Figure 1. 39 : Profil de l'énergie potentielle d'interaction totale entre nanoparticules en fonction de la distance.

6.2.2. La stabilisation stérique

La stabilisation stérique consiste à greffer des molécules (ligands) à la surface des nanoparticules. Ces molécules de surface créent une couche protectrice et évitent une coalescence des nanoparticules entre elles. Pour permettre une bonne stabilisation des nanoparticules, des ligands très volumineux sont utilisés comme des acides gras (acide oléique, acide palmitique, …) [106,107,184], des polymères (PVA, PMAA, …) [185,186]. De plus, afin d'éviter tout phénomène d'agrégation, le solvant choisi pour disperser les nanoparticules solubilise les ligands.

Si ces ligands sont porteurs de charges, une stabilisation électrostatique est également assurée il s'agit alors d'une stabilisation électro-stérique des nanoparticules. Ce type de stabilisation est le plus souvent rencontré pour un solvant polaire comme l'eau [187,188].

6.3. Les différentes méthodes de stabilisation des nanoparticules

Différentes méthodes existent pour stabiliser les nanoparticules afin d'une part d'éviter l'agrégation des nanoparticules et d'autre part d'apporter des nouvelles propriétés physico-chimiques pour les utiliser dans différents domaines. Ces méthodes de stabilisation limitent également toute modification des nanoparticules. Notamment pour les nanoparticules de magnétite Fe_3O_4, cette couche de protection réduit de manière significative l'oxydation du cœur inorganique en maghémite.

Les principales méthodes de stabilisation des nanoparticules sont représentées en Figure 1. 40 [189,190] :

- la stabilisation par des ligands volumineux comme des polymères. Les polymères les plus utilisés sont le PVA [185], le PEG [102,160,162,191], le dextran [192–194], le PLGA [102,195]. Les polymères sont soit adsorbés à la surface de la nanoparticule (Figure 1. 40.a) soit ils l'encapsulent (Figure 1. 40.b). Il s'agit d'une stabilisation stérique.
- la stabilisation grâce à une coquille inorganique pour former des systèmes de type coeur@coquille. La coquille est en général un métal noble donc non réactif avec le milieu dans lequel il est stabilisé comme de l'argent [196], de l'or [173,197] ou un oxyde comme de la silice [124,198] (Figure 1. 40.c). La stabilisation est électrostatique due aux charges de surface et électro-stérique si la coquille est épaisse.
- la stabilisation via une encapsulation dans des micelles (simple couche lipidique) (Figure 1. 40.d) ou dans des liposomes (double couches lipidiques) (Figure 1. 40.e). Cette encapsulation nécessite l'utilisation des acides gras comme l'acide oléique [106,107]. Cette stabilisation est une stabilisation stérique.
- la stabilisation par des molécules avec une fonction terminale greffée sur la surface de la nanoparticule. Les molécules utilisées sont des polymères modifiés comme le PEG-COOH [199,200] ou des molécules comme le citrate [87,201,202] (Figure 1. 40.f). La stabilisation est alors électro-stérique.

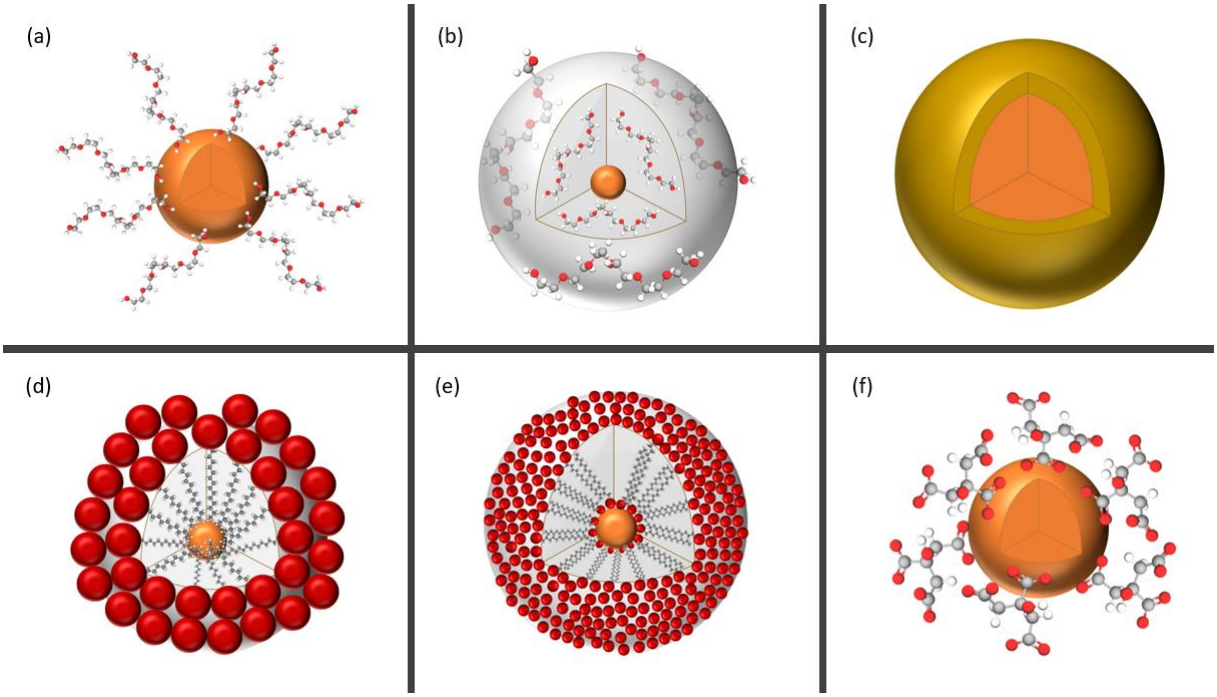


Figure 1. 40 : Schéma des modes de stabilisation des nanoparticules d'oxyde de fer : par des ligands volumineux comme le PEG (a), par une encapsulation (b), avec une coquille inorganique pour former un système cœur@coquille (c), dans une micelle (d), dans un liposome (e) ou par des molécules chargées comme le citrate (f).

Dans le domaine biomédical, de nombreuses molécules comme des protéines sont présentes et influencent la stabilité entre les nanoparticules. Une stabilisation maximale des nanoparticules est

importante : les différents modes de stabilisation présentés précédemment peuvent être associés pour l'atteindre.

6.4. Principales molécules utilisées pour le domaine biomédical

Dans les milieux physiologiques, plusieurs protéines existent et sont souvent chargées : de fortes interactions de type électrostatiques interviennent et les protéines réagissent avec la surface des nanoparticules si elles sont nues (dépourvues de fonctionnalisation). Un greffage, tel que décrit précédemment, de molécules de poids moléculaires variables présentant une fonction carboxylate, sulfate ou phosphonate favorise la formation de liaisons covalentes en raison de l'affinité de ces groupements fonctionnels avec la surface d'oxyde de fer. Un greffage d'une couche de silice peut aussi être mis en œuvre afin d'augmenter l'affinité entre des polymères et la nanoparticule [124,198]. Ces greffages limitent la déstabilisation des nanoparticules par les protéines.

Les molécules les plus utilisées dans la littérature pour des applications dans le domaine biomédical sont des polymères comme l'alcool polyvinylique (PVA) [185], le dextran [192–194], le chitosan [86,203], le polyéthylène-glycol (PEG) [102,160,162,191] ou des molécules comme le citrate [87,201,202], le catéchol [204,205]. Ces molécules sont utilisées dans ce domaine car elles sont biocompatibles et hydrophiles [55,206]. Le greffage de ces molécules sur les nanoparticules d'oxyde de fer est simple à réaliser.

Les polymères sont très utilisés pour stabiliser des nanoparticules d'oxyde de fer destinées au domaine biomédical. Cependant, cette couche organique autour des nanoparticules accroît de manière significative le diamètre hydrodynamique des nanoparticules, considérant le diamètre hydrodynamique comme la somme du diamètre du cœur inorganique de la nanoparticule, de l'épaisseur de la couche organique et de l'épaisseur de la sphère de solvatation. Si ce diamètre hydrodynamique est trop important, l'utilisation de ces nanoparticules est très limitée, notamment dans des applications comme l'IRM (Imagerie à Résonance Magnétique). En effet, l'accès des molécules d'eau au cœur de la nanoparticule va être limitée, ce qui va engendrer une augmentation de la contribution de la sphère externe au mécanisme de relaxation. De plus, la couche organique apporte une contribution diamagnétique, diminuant ainsi l'aimantation à saturation M_S et donc l'effet du contraste [207,208].

Afin de palier à ce problème, le greffage d'acide citrique est une bonne alternative pour stabiliser les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. L'acide citrique ne présente pas de cytotoxicité [209] et est produit au sein des cellules de tous les organismes aérobies via le cycle de Krebs [210].

Dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire à pH 7,2/7,4 et à 37°C, l'acide citrique est sous sa forme totalement déprotonée. En effet, l'acide citrique est un triacide faible dont la valeur de pKa la plus élévée est de 6,40. Dans une solution physiologique, le citrate (forme totalement déprotonée de l'acide citrique) se greffe facilement à la surface de l'oxyde de fer grâce à une de ses fonctions carboxylates (Figure 1. 41). Ce greffage rend les nanoparticules d'oxyde de fer dispersibles dans une

solution aqueuse et stabilisées via des interactions électro-stériques dues aux fonctions carboxylates qui ne sont pas liées à la surface.

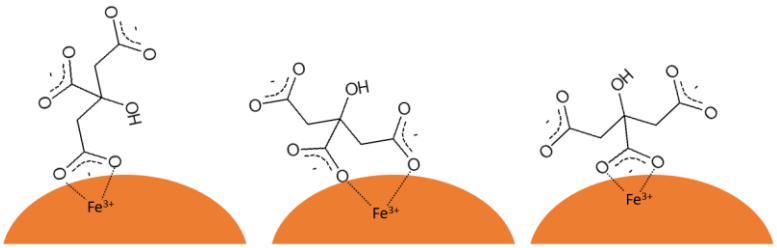


Figure 1. 41 : Schéma de différents modes de liaison entre les molécules de citrate et la nanoparticule d'oxyde de fer.

Grâce à cette fonctionnalisation, le point isoélectrique déterminé pour une solution de nanoparticules et caractéristique de l'agrégation des nanoparticules d'oxyde de fer passe de pH = 7 pour des nanoparticules nues à pH = 5 [89] : il n'y a donc pas de phénomène d'agrégation dans des conditions physiologiques de ces nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées.

Enfin, la molécule de citrate peut être chimiquement modifiée afin d'apporter de nouvelles propriétés physico-chimiques. Une modification des groupements carboxylates libres (non greffés à la surface des nanoparticules) permet par exemple de greffer de nouvelles molécules via des réactions de cyclo-addition (« click chemistry ») [190,211]. Des protéines spécifiques pour des cellules ou des protéines traceurs peuvent donc être greffées sur les nanoparticules par ce procédé pour augmenter le nombre de champs d'applications possibles.

6.5. Conclusion

Pour éviter tout phénomène d'agrégation des nanoparticules, une stabilisation de ces nano-objets est essentielle, particulièrement pour des applications dans le domaine biomédical. Cette stabilisation permet d'éviter toute oxydation de la nanoparticule d'oxyde de fer : des radicaux libres de type $OH^{\bullet}$ ne seront pas libérés dans le milieu physiologique évitant ainsi tout stress oxydatif. Pour obtenir la meilleure stabilisation possible des nanoparticules d'oxyde de fer dans une solution aqueuse, des interactions de type électro-stériques sont à favoriser. Pour cela, une fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer par des citrates est envisageable. Le citrate permet d'éviter une augmentation significative du diamètre hydrodynamique des nanoparticules rendant possible l'utilisation des nanoparticules fonctionnalisées dans de nombreuses applications du domaine biomédical comme l'hyperthermie, la vectorisation des médicaments ou les agents de contraste en IRM.

7. L'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dans les applications biomédicales

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont utilisées depuis plusieurs années dans le domaine biomédical. En effet, grâce à leurs propriétés magnétiques influencées par leur taille (ferrimagnétique ou superparamagnétique), leur biocompatibilité, leur facilité de synthèse et de modifications, ces nanoparticules peuvent être utilisées en thérapie, en diagnostic ou en théranostique. Dans cette partie, la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées sera présentée ainsi que les applications biomédicales possibles : l'hyperthermie, la vectorisation des médicaments et l'imagerie médicale.

7.1. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer

Le corps humain contient naturellement du fer. C'est le 12ème élément chimique le plus abondant dans le corps humain. Environ 3 à 4 g de fer sont contenus dans des protéines comme la ferritine, la transferrine, l'hémosidérine et l'hémoglobine [212]. L'utilisation d'oxyde de fer pour des applications biomédicales n'est donc pas sujet à de la toxicité. Cependant, sous forme de nanoparticules, l'oxyde de fer peut présenter des tailles plus petites que les barrières biologiques et ainsi pénétrer dans les noyaux des cellules, entraînant une dénaturation probable de l'ADN (acide désoxyribonucléique). Comme cela a été décrit dans la partie précédente (paragraphe 6.1), les nanoparticules nues d'oxyde de fer peuvent libérer des radicaux libres $OH^{\bullet}$ générant du stress oxydatif [175,176]. Afin de minimiser ce stress oxydatif, une fonctionnalisation des nanoparticules est prérequise.

De nombreux auteurs ont montré que les nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées engendrent peu de toxicité [19,213,214]. Leur toxicité est minime comparativement aux bénéfices de leur utilisation (le rapport bénéfice/risque de l'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer est donc très élevé).

Néanmoins, même avec cette fonctionnalisation, une toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer est toujours présente, notamment dans le système nerveux central (SNC) [19]. Les étapes conduisant à cette toxicité dans le SNC sont décrites dans la Figure 1. 42 :

- Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent altérer la perméabilité des barrières biologiques comme la barrière hémato encéphalique. Cette altération favorise la formation d'espèces radicalaires (① Figure 1. 42).

- Selon la taille, la forme et les charges à la surface, des protéines du corps humain encapsulent les nanoparticules, générant des phénomènes d'opsonisation (type de phagocytose). De ce fait, les nanoparticules peuvent voir altérer leurs propriétés physico-chimiques et plus facilement passer certaines barrières biologiques (② Figure 1. 42).

- Les nanoparticules d'oxyde de fer sont éliminées par des monocytes (globules blancs) lors de leur circulation dans le système sanguin (③ Figure 1. 42).

- Du fait de leur taille ou de leurs ligands, les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent pénétrer le SNC (④ Figure 1. 42) et les cellules neuronales par pinocytose (si la taille est inférieure à 10 nm) ou endocytose (pour des tailles aux alentours de 10 nm) (⑤ Figure 1. 42).

- En raison de cette internalisation cellulaire et au milieu légèrement plus acide des endosomes (vésicules présentes dans la cellule qui permettent le transport de molécules) [215,216], des ions ferriques ou ferreux peuvent être relargués dans le cytoplasme (⑥ Figure 1. 42).

Dans le SNC, les ions ferriques et ferreux peuvent causer plusieurs dommages car ils participent au cycle d'oxydo-réduction de processus biologiques impliqués dans des maladies neuro-dégénératives (comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, …). Ainsi, la présence de ces ions produit des radicaux libres via la réaction de Fenton (cf paragraphe 6.1), altère la régulation du fer, altère l'activité mitochondriale, génère l'agrégation de protéines ou de l'apoptose (mort cellulaire programmée).

Un contrôle total de la synthèse (taille, forme, fonctionnalisation, état d'agrégation) s'avère par conséquent primordial pour utiliser les nanoparticules d'oxyde de fer à des fins biomédicales. Malgré la toxicité de ces nanoparticules, notamment dans des systèmes très complexes comme le SNC, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont considérées comme un des meilleurs outils pour les applications dans le domaine biomédical.

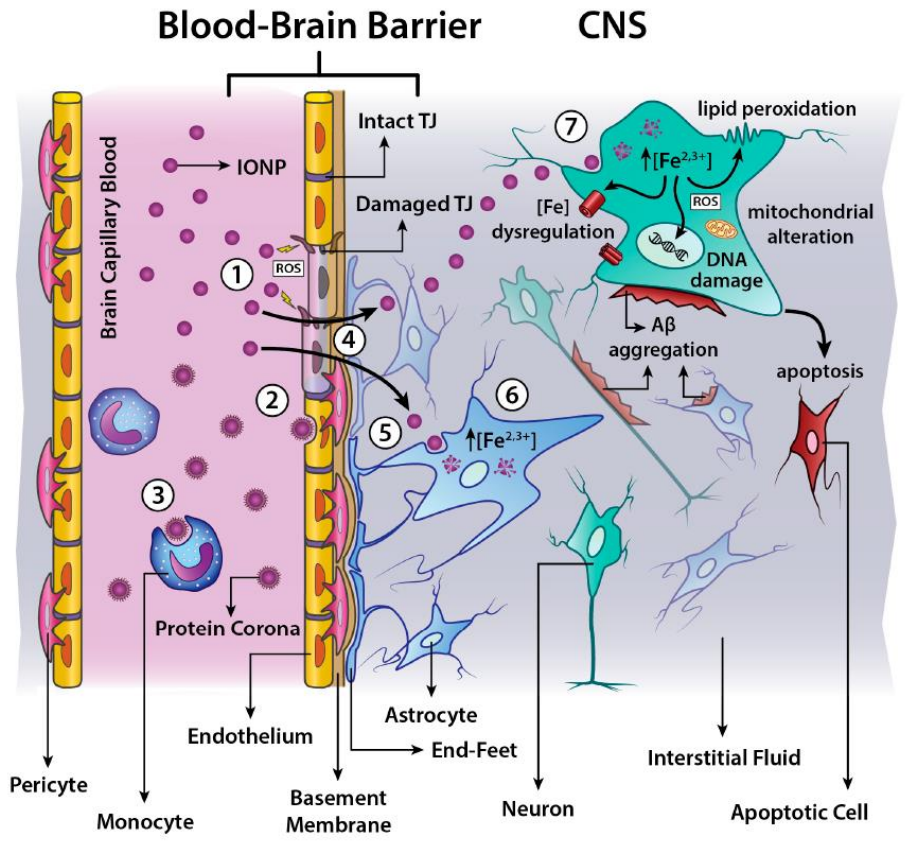


Figure 1. 42 : Influence des nanoparticules d'oxyde de fer dans le système nerveux central et ses effets sur le tissu neuronal [19].

7.2. L'hyperthermie

Une cellule cancéreuse est une cellule au matériel génétique (ADN) altéré qui prolifère de façon anarchique tout en perdant son caractère différencié. Les cellules cancéreuses se divisent à l'infini et échappent à la mort cellulaire programmée (apoptose). Afin de traiter et de détruire ces cellules cancéreuses, plusieurs techniques existent comme la chimiothérapie et la radiothérapie.

Le principe de la chimiothérapie est l'injection par voie intra-veineuse d'agents chimiques pour ralentir ou bloquer la croissance des cellules cancéreuses. Le traitement de la chimiothérapie est appliqué sur tout le corps humain afin de toucher toutes les cellules cancéreuses (celles localisées dans la tumeur comme celles se propageant à travers le système sanguin). Cependant, ce traitement est accompagné de beaucoup de conséquences sur le corps humain. En effet, plusieurs effets secondaires peuvent apparaître comme des troubles digestifs (nausées, vomissements), des inflammations (notamment au niveau buccal), des troubles dermatologiques (éruptions cutanées, modification des ongles), des pertes de cheveux, …

La radiothérapie est une technique plus locale et qui permet de détruire les cellules cancéreuses grâce à des rayonnements ionisants (les plus utilisés sont des rayons X à haute énergie). Cette technique est souvent associée à d'autres techniques anti-cancéreuses comme la chimiothérapie afin d'éradiquer de façon totale la tumeur et les cellules cancéreuses. Les rayonnements ionisants sont appliqués sur la zone où se situe la tumeur. Pour éviter une exposition longue des rayonnements, pouvant détruire les tissus sains autour de la tumeur, la tumeur est irradiée sous plusieurs angles. Même si cette technique est plus localisée et engendre moins de problème sur le corps humain entier, différents effets secondaires comme la chute des cheveux et des poils, des problèmes au niveau des différents organes (cœur, poumons, œsophage, foie), des insuffisances rénales, un asséchement de la peau et des muqueuses existe.

Pour éviter une destruction des tissus sains autour de la tumeur, une nouvelle technique expérimentale est en voie de développement : l'hyperthermie [217]. Cette technique permet de détruire uniquement les cellules cancéreuses et minimise l'apparition d'effets secondaires. Cette technique repose sur l'échauffement local des cellules en utilisant des nanoparticules magnétiques. En effet, grâce à un champ magnétique alternatif, les nanoparticules présentes au sein de la tumeur vibrent selon la fréquence appliquée : cette vibration des nanoparticules conduit à un échauffement local. Or, les cellules cancéreuses sont très sensibles aux variations de température : au-delà d'une température de 42°C (la température physiologique est de 37°C), les cellules tumorales sont détruites [217–219]. Cette sensibilité à la chaleur est due à la croissance rapide et anarchique des cellules tumorales car, en se développant rapidement, ces cellules n'ont pas le temps d'avoir une « architecture » correcte.

La première utilisation de l'hyperthermie est reportée en 1957 en utilisant des nanoparticules de maghémite γ-Fe_2O_3 de 20 à 100 nm de diamètre sur des ganglions lymphatiques [220]. Grâce à un champ magnétique alternatif de 200 à 240 Oe avec une fréquence de 1,2 MHz, une élévation de la température de 14°C est obtenue. Par la suite, la première utilisation de l'hyperthermie sur des humains est réalisée à Berlin au début des années 2000 [221] sur des glioblastomes (tumeur du cerveau) avec une injection de nanoparticules d'oxyde de fer directement dans la tumeur. Cependant, ces premiers résultats n'ont pas été entièrement satisfaisants et de nouvelles perspectives telles que

l'amélioration des nanoparticules magnétiques optimisées pour ce traitement sont en cours de recherche [222,223].

Afin de maximiser l'efficacité des nanoparticules d'oxyde de fer pour des traitement par hyperthermie, plusieurs critères sont à respecter comme :

- la non-toxicité ; il faut éviter de combiner ces nanoparticules avec des éléments potentiellement cancérigènes comme le cobalt,

- la biocompatibilité et la biodisponibilité ; les nanoparticules ne doivent pas s'accumuler dans les organes filtrants comme le rein ou le foie et doivent pouvoir passer les barrières biologiques avec un diamètre inférieur à 20 nm,

- la sélectivité ; les nanoparticules ne doivent cibler que les cellules tumorales et non les cellules saines,

- le champ magnétique appliqué ; en raison de contraintes physiologiques comme la stimulation neuromusculaire ou l'échauffement du corps entier, les gammes de fréquence et d'amplitudes du champ magnétique sont limitées à 50-300 kHz et à 15-30 mT [224].

Pour générer de la chaleur grâce à un champ magnétique alternatif, le moment magnétique porté par les atomes de fer ne doit pas osciller. En effet, d'après la théorie de Néel (Eq.11 paragraphe 2.2.2), les moments magnétiques oscillent de façon spontanée : si le temps de retournement de l'aimantation est plus grand que le temps de mesure, alors la nanoparticule est dans un état bloqué (ferrimagnétisme), si c'est l'inverse alors la nanoparticule est dans un état de superparamagnétisme. Dans le premier cas, une hystérèse sera présente lors des mesures d'aimantation alors qu'il n'y en aura pas si la nanoparticule est dans un état de superparamagnétisme. Or, pour augmenter l'efficacité des nanoparticules dans un traitement par hyperthermie, la présence d'une hystérèse est favorisée. En effet, cette efficacité est quantifiée par la Puissance Absorbée Spécifique PAS (SAR en anglais pour Specific Absorption Rate) et est dépendante de l'aire sous la courbe et la fréquence du champ magnétique tel que :

$$\mathrm{PAS} = \mathrm{A} \times \mathrm{f} \qquad \text{Eq.29}$$

De plus, si la température augmente ou la fréquence du champ magnétique diminue ou la barrière énergétique KV diminue, l'aire du cycle d'hystérèse diminue affectant l'efficacité des nanoparticules pour l'hyperthermie (Figure 1. 43) [225].

Enfin, afin de passer les barrières biologiques, les nanoparticules d'oxyde de fer doivent présenter un diamètre inférieur à 20 nm : elles seront dans un état entre le ferrimagnétisme et le superparamagnétisme (Figure 1. 15). Il faut également que l'aimantation portée par les atomes de fer puisse osciller sous l'effet du champ magnétique alternatif. Le diamètre des nanoparticules pour des applications dans l'hyperthermie doit être compris entre 13 et 15 nm.

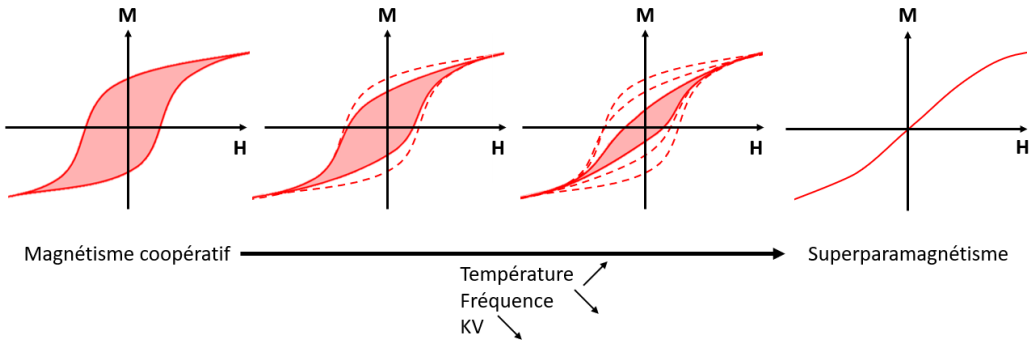


Figure 1. 43 : Evolution des cycles d'hystérèses en fonction de la température, de la fréquence de mesure et de la barrière énergétique de la nanoparticule KV d'après [225].

7.3. Vectorisation des médicaments

Pour délivrer au mieux des principes actifs au sein d'un organisme pour combattre une maladie, l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer peut être envisagée. Grâce au caractère magnétique de ces nanoparticules, elles peuvent être guidées dans le corps humain avec un fort champ magnétique extérieur (ciblage actif). Le principe actif est administré directement sur le site malade permettant ainsi de diminuer une toxicité possible du principe actif sur les autres organes de l'organisme. Un médicament perdant une partie de son principe actif avant d'arriver au lieu de libération de celui-ci, il faut administrer une dose supérieure de principe actif. Cette « surdose » peut générer une toxicité. Avec une fonctionnalisation du principe actif sur les nanoparticules d'oxyde de fer, la dose administrée est réduite et évite donc une toxicité.

Les principes actifs peuvent être soit greffés à la surface des nanoparticules [190,226] soit encapsulés dans une matrice de polymères [227,228]. Si le principe actif est greffé, la libération de celui-ci peut être effectuée dans des conditions physiologiques (changement du pH permettant une désorption du principe actif par exemple [229,230]) ou dans des conditions extérieures à l'organisme (un champ magnétique peut être appliqué permettant de dissocier le principe actif de la nanoparticule en augmentant la température [231,232]). Cependant, cette technique est difficile à mettre en place car le greffage du principe actif sur la nanoparticule peut modifier le principe actif et donc ses propriétés thérapeutiques. De plus, lorsque le principe actif est libéré, les nanoparticules d'oxyde de fer deviennent « nues » et peuvent engendrer une toxicité au sein de l'organisme (cf paragraphe 6.1). Pour pallier à ces problèmes, des systèmes coeur@coquilles ont été développés tel que des systèmes avec un cœur d'oxyde de fer et une coquille d'or [173,197].

Le principe actif peut être encapsulé dans une matrice de polymères : les polymères les plus couramment utilisés sont le PLGA (acide poly lactique-co-glycolique) [102,195], le chitosan [86,203], le PVA (alcool polyvinylique) [185]. Cette matrice permet d'éviter toute réaction entre l'organisme et le principe actif ou la nanoparticule d'oxyde de fer. La matrice se dégrade au niveau du lieu d'action du principe actif pour permettre sa libération sous l'effet d'un échauffement local (grâce à un champ magnétique oscillant faisant vibrer la nanoparticule par exemple) ou en fonction des conditions physiologiques. Par exemple, près d'une cellule tumorale, le pH est plus acide que le pH physiologique

(7,2). Ainsi, avec cette diminution du pH, la coquille de polymères se dégrade permettant de libérer le principe actif [233]. Les maladies visées avec cette technique sont les maladies cardiovasculaires, les AVC (Accident Vasculaire Cérébral), les lésions de la moelle épinière, le diabète [234].

Cependant, la principale utilisation des nanoparticules pour la vectorisation de médicaments concerne le traitement de cancer. En effet, des agents anti-cancéreux sont associés aux nanoparticules d'oxyde de fer. Grâce à un champ magnétique extérieur fort, les nanoparticules s'accumulent dans la zone de la tumeur (ciblage magnétique) et larguent les agents de chimiothérapie : les effets sont limités à la zone de la tumeur [190,229] (Figure 1. 44). Différents ciblages des nanoparticules sur les cellules tumorales existent : le ciblage passif et le ciblage actif. Le ciblage passif est une diffusion des nanoparticules d'oxyde de fer à travers les vaisseaux sanguins vers les cellules tumorales mais sans transporteur comme des transporteurs au glucose par exemple. Le ciblage actif, quant à lui, permet un ciblage spécifique sur les cellules tumorales avec ces transporteurs [235]. Un ciblage magnétique peut être combiné avec ces deux méthodes pour améliorer l'interaction entre les nanoparticules et les cellules cancéreuses. Les nanoparticules utilisées pour le ciblage des cellules tumorales peuvent aussi générer de l'hyperthermie et ainsi présenter une double fonctionnalité [235,236]. Néanmoins, cette technique possède des limites : si la cellule tumorale est profonde, le ciblage devient compliqué voire impossible à réaliser. De plus, les champs magnétiques doivent être puissants afin de cibler au mieux les nanoparticules. Or, ces champs magnétiques ont des coûts très élevés pour les cliniques [237].

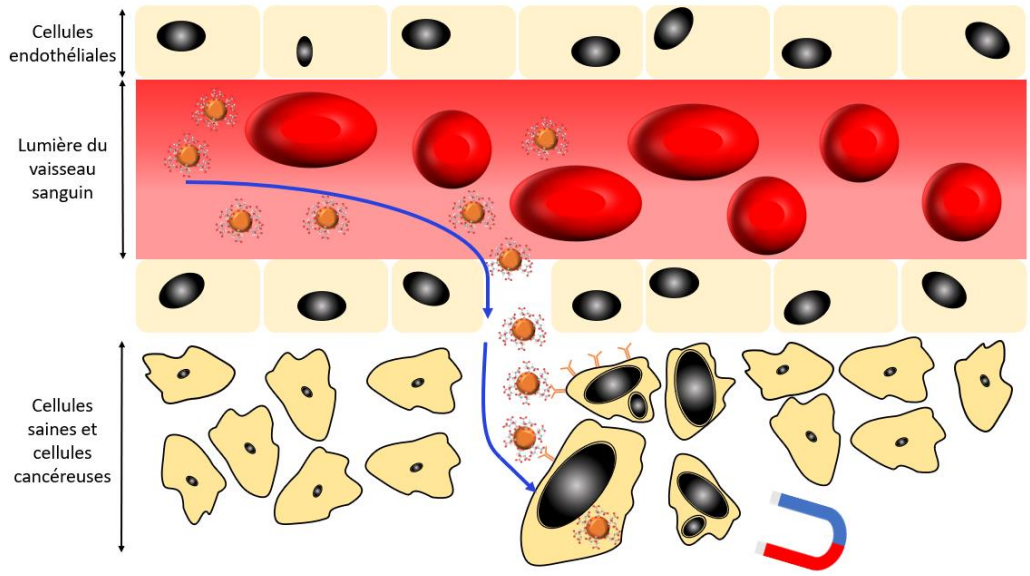


Figure 1. 44 : Schéma d'un ciblage magnétique de cellules tumorales grâce à des nanoparticules d'oxyde de fer via une diffusion passive des nanoparticules et avec un ciblage magnétique à travers les vaisseaux sanguins. Les nanoparticules se fixent aux cellules cancéreuses grâce à leurs ligands et aux protéines de surface de ces cellules (système clé-serrure).

7.4. L'imagerie médicale

Depuis le début du XX^{ème} siècle et la première image de radiographie réalisée par Wilhelm Röntgen (physicien allemand et premier prix Nobel de physique en 1901) avec des rayons X (radiographie de la

main de sa femme), de plus en plus de techniques d'imagerie se sont développées afin de voir de mieux en mieux l'anatomie et la physiologie humaine pour détecter des lésions (Figure 1. 45) [238]. Ces techniques utilisent différents principes comme les rayons X (radiographie, tomodensitométrie), l'imagerie optique, les ultrasons (échographie), l'imagerie nucléaire (IRM pour Imagerie à Résonance Magnétique) ou des positons (TEP pour Tomographie par Emissions de Positons ou PET en anglais).

Ces méthodes d'imagerie ont chacune leurs avantages comme leurs inconvénients. Par exemple, une image obtenue par ultrasons se fait en temps réel et le coût est faible. Cependant, la résolution est très faible et l'examen est dépendant de l'opérateur et de son expérience. En effet, cette méthode d'imagerie n'est donc pas d'une grande reproductibilité, les images n'étant pas identiques en fonction de la méthode d'application de la sonde. Les avantages et inconvénients des autres techniques d'imagerie sont décrites en Figure 1. 46.

Afin de compenser les inconvénients propres à chaque méthode, les techniques sont combinées entre elles. Par exemple, des images en tomographie par émissions de positons sont couplées avec de la tomodensitométrie (couplage TEP/CT pour Computed Tomography) ou des images par TEP/IRM sont réalisées de plus en plus dans les centres hospitaliers. Grâce à ces couplages, une meilleure détection, notamment des cellules cancéreuses, est réalisée. Si les images TEP permettent d'obtenir des informations fonctionnelles avec une haute sensibilité sur les maladies, les images IRM ou CT permettent une information anatomique à haute résolution [239].

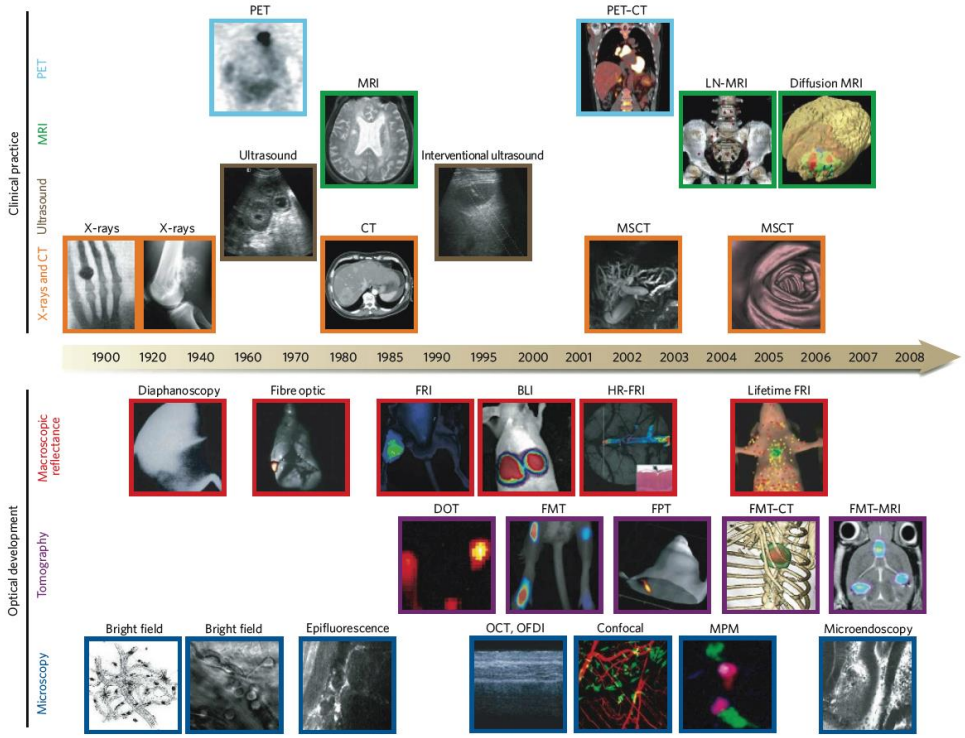


Figure 1. 45 : Historique des différentes techniques d'imagerie [238]. BLI = bioluminescence imaging ; CT = computed tomography ; DOT = diffuse optical tomography ; FMT = fluorescence mediated tomography ; FPT = fluorescence protein tomography ; FRI = fluorescence reflectance imaging ; HR-FRI = high resolution FRI ; LN-MRI = lymphotropic nanoparticle enhanced MRI ; MPM = multiphoton microscopy ; MRI = magnetic resonance imaging ; MSCT = multi slice CT ; OCT = optical cohérence tomography ; OFDI = optical frequency domain imaging ; PET = positron emission tomography.

Pour améliorer la qualité des images ainsi que pour diminuer les temps d'acquisition, des nanoparticules peuvent être utilisées. Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont souvent employées en imagerie pour visualiser les organes qui les capturent (foie, tumeurs, moelle osseuse, …) [240,241], pour évaluer l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique [242], pour évaluer le flux sanguin [243], pour détecter des inflammations [244]. Elles permettent d'améliorer les performances de chaque technique d'imagerie et la qualité des images.

Cependant, outre les différentes toxicités liées à la taille et à l'état de surface des nanoparticules d'oxyde de fer (cf paragraphe 6.1), des inconvénients existent comme l'oxydation et limitent l'utilisation de nanoparticules uniquement composées d'oxyde de fer non fonctionnalisées [245]. Pour compenser ces inconvénients, de nouveaux systèmes comme des systèmes coeur@coquilles peuvent être envisagés. Par exemple, une coquille d'or autour de l'oxyde de fer permet à la fois d'améliorer les images en IRM et d'utiliser ces nanoparticules pour une autre technique d'imagerie (photo-acoustique) [197].

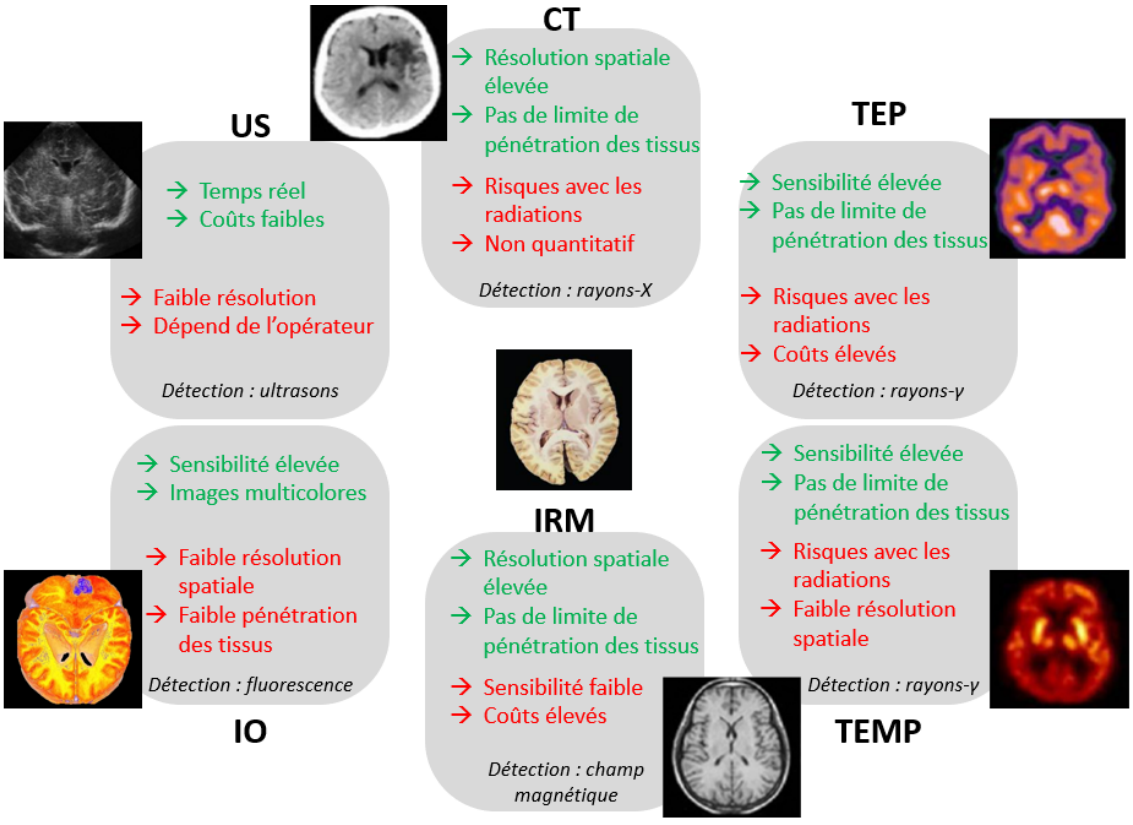


Figure 1. 46 : Caractéristiques des techniques d'imagerie les plus utilisées actuellement. CT = computed tomography ; IO = images optiques ; IRM = image à résonance magnétique ; TEMP = tomographie d'émission monophotonique ; TEP = tomographie par émission de positons ; US = ultra-sons.

7.5. Conclusion

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont de plus en plus utilisées dans le domaine biomédical pour différentes applications que ce soit la vectorisation de médicaments, les traitements par hyperthermie

ou l'imagerie médicale. Si une toxicité de ces nanoparticules existe en fonction de leur taille ou de leur fonction de surface, des alternatives sont possibles (systèmes coeur@coquille, fonctionnalisation, …) pour la minimiser au maximum. Dans la suite de ce manuscrit, nous allons voir plus en détail une technique où les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont utilisées : l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

8. L'IRM : son principe, son fonctionnement et son utilisation avec des agents de contraste

Dans cette partie, après un bref historique de l'IRM, le fonctionnement d'un équipement IRM sera expliqué de la relaxation du proton jusqu'à la conception de l'image. Ensuite, les agents de contraste, leurs propriétés et leur fonctionnement seront expliqués. Enfin les attentes concernant les agents de contraste utilisant des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques pour les établissements hospitaliers seront décrites.

8.1. Historique de l'IRM

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie basée sur le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). La spectroscopie RMN a été décrite pour la première fois en 1946 par Felix Bloch et par Edward Mills Purcell (physiciens suisse et américain qui ont reçu le prix Nobel de physique en 1952 pour leurs travaux sur cette technique).

Vers la fin des années 60, une utilisation de la spectroscopie RMN dans le domaine biomédical devient possible, cette technique étant dédiée initialement à l'analyse chimique. En effet, Raymond Vahan Damadian (scientifique américain) proposa en 1969 d'utiliser la RMN pour visualiser le corps humain et notamment détecter des tumeurs. Il distingua par la suite des temps de relaxation (T_1 et T_2) différents entre une cellule cancéreuse et une cellule saine prouvant ainsi la faisabilité d'imager le corps humain par RMN et surtout d'y distinguer des tumeurs [246].

A partir de 1973, Paul Lauterbur (chimiste américain) utilisa le principe de reconstitution des images en tomodensitométrie pour réaliser la première « imagerie » avec la RMN : il utilisa le principe des gradients afin de capturer une image d'une coupe virtuelle d'un objet en deux dimensions [247]. Dans le même temps et de façon indépendante, Peter Mansfield (physicien britannique) proposa une méthode similaire d'imagerie permettant de capturer de nombreuses images durant un temps court. Grâce aux progrès de l'informatique, des méthodes numériques avec des calculs longs sont développées. En 1975, Richard Ernst (chimiste suisse qui a reçu le prix Nobel de chimie en 1991 pour ses travaux sur la RMN à haute résolution) proposa d'utiliser la transformée de Fourier pour analyser le signal IRM.

Avec toutes ces avancées, la première image d'un corps humain vivant a été réalisée en 1977 par Damadian (Figure 1. 47) [248].

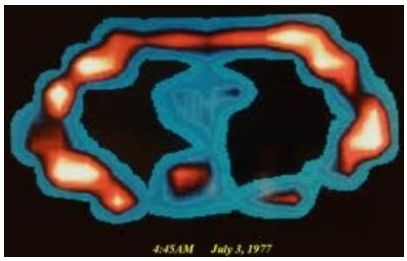


Figure 1. 47 : Première image IRM de l'Histoire d'un corps humain vivant, section d'une cage thoracique réalisée le 3 juillet 1977 [248].

Dans les années suivantes, Damadian développa l'appareil et le premier IRM a été commercialisé en 1980. Cette technique s'est démocratisée dans le domaine biomédical à partir des années 1990 et est devenue une méthode d'imagerie importante pour la visualisation d'un organisme vivant.

En 2003, Lauterbur et Mansfield reçurent le prix Nobel de physiologie pour « leurs découvertes concernant l'imagerie par résonance magnétique ». Le prix Nobel ne fut pas accordé à Damadian par le jury, probablement en raison de ses idées créationnistes.

En 2018, la France comptait 960 IRM installés sur son territoire, un nombre en constante augmentation depuis le début des années 2000 (environ 10% d'appareils en plus chaque année) mais ce nombre reste insuffisant car le délai moyen pour obtenir un rendez-vous est de 32,3 jours (Le plan Cancer 2014-2019 préconisait un délai maximal de 20 jours pour avoir un rendez-vous.) [249].

L'IRM est donc une imagerie importante dans les parcs hospitaliers et l'amélioration de ces équipements constitue une priorité pour une meilleure détection des maladies et cancers au sein des organismes. Avant de détailler les méthodes pour améliorer la qualité des images IRM, le principe de l'IRM est brièvement décrit.

8.2. Le principe de l'IRM

Pour comprendre l'utilisation des nanoparticules pour améliorer les images obtenues en IRM, la compréhension des phénomènes de base est nécessaire.

8.2.1. La Résonance Magnétique Nucléaire

8.2.1.1. Le signal RMN

L'IRM est basée sur les mêmes principes que la RMN. Ces deux techniques sont basées sur l'aimantation nucléaire des atomes. En effet, tous les atomes possèdent des propriétés magnétiques plus ou moins importantes définies par un moment magnétique m_i. Or, la RMN et, par conséquent, l'IRM étant des techniques nucléaires, seuls les atomes ayant un spin nucléaire non nul sont détectables. L'hydrogène ^1H, dû à son coefficient gyromagnétique γ élevé, est un des atomes les plus facilement détectables avec cette technique, son spin nucléaire vaut ½. Une molécule comportant un ^1H et abondante dans le corps humain est nécessaire afin de réaliser des images de l'organisme entier.

La molécule d'eau constitue ainsi le candidat idéal pour cette technique d'imagerie car présente dans tous les tissus composant un corps humain mais à des proportions différentes : 10% dans les dents et plus de 90% dans le plasma sanguin (Figure 1. 48) [250].

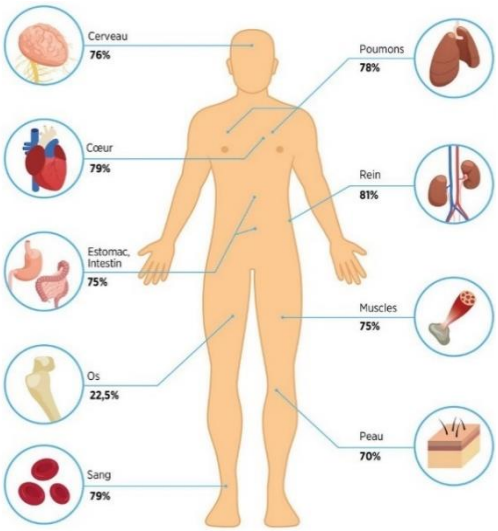


Figure 1. 48 : Proportions d'eau dans les différents organes et tissus du corps humain d'après [250].

Comme cela a été mentionné précédemment, le ^{1}H possède un spin de ½. Le moment magnétique associé à ce spin ½ peut prendre deux orientations privilégiées en présence d'un champ magnétique statique B_0 (orienté selon la direction z du repère du laboratoire) : soit de façon parallèle à ce champ, soit de façon antiparallèle. Deux niveaux d'énergie distincts sont alors créés (Figure 1. 49). Une transition entre ces deux niveaux d'énergie peut être induite par un champ radiofréquence dont la fréquence suit la relation de Bohr tel que $\Delta E = h.\nu_0$ avec ΔE la différence d'énergie entre les deux états et ν_0 la fréquence de Larmor (Figure 1. 49).

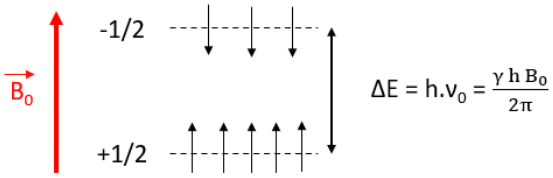


Figure 1. 49 : Diagramme d'énergie d'un spin ½ (par exemple du proton ^{1}H) sous un champ magnétique statique B_0.

La fréquence de Larmor relie donc la fréquence de résonance d'un spin nucléaire à un champ magnétique B_0 tel que :

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \qquad \text{Eq.30}$$

$$\omega_0 = \gamma B_0 \qquad \text{Eq.31}$$

Avec γ le coefficient gyromagnétique, B_0 le champ magnétique appliqué et ν_0 la fréquence de Larmor. Pour l'équation 31, ω_0 correspond à la pulsation de Larmor définie tel que $\omega_0 = 2\pi.\nu_0$.

Pour le proton dans une molécule d'eau, le coefficient gyromagnétique γ est égal à $267{,}513.10^6$ $rad.s^{-1}.T^{-1}$ et la fréquence de Larmor du proton de l'eau vaut 63,86 MHz sous un champ de 1,5T.

Comme le montre la Figure 1. 49, le niveau d'énergie le plus bas est plus peuplé que le niveau avec les spins orientés de façon antiparallèle avec le champ magnétique B_0 : une aimantation macroscopique, notée $\overrightarrow{M_0}$, est donc créée et est colinéaire avec ce champ magnétique (Figure 1. 50.a), cet état correspond à l'état d'équilibre. Pour enregistrer un signal RMN, une perturbation radiofréquence B_1 à la fréquence de Larmor est appliquée de façon brève et perpendiculaire à B_0 afin de sortir cette aimantation de son état d'équilibre : cette perturbation bascule l'aimantation d'un angle donné, par exemple de 90° soit dans le plan xy (Figure 1. 50.b). Dès que le champ magnétique B_1 est arrêté, l'aimantation nucléaire M_0 va retrouver sa position initiale (c'est-à-dire, selon l'axe z) tout en précessant à la fréquence de Larmor (Figure 1. 50.c). Le signal est enregistré lors de ce retour à l'équilibre, donnant le FID (Free Induction Decay) (Figure 1. 50.d). En lui appliquant une transformée de Fourier, ce signal temporel est converti en signal fréquentiel et le spectre RMN est obtenu (Figure 1. 50.e).

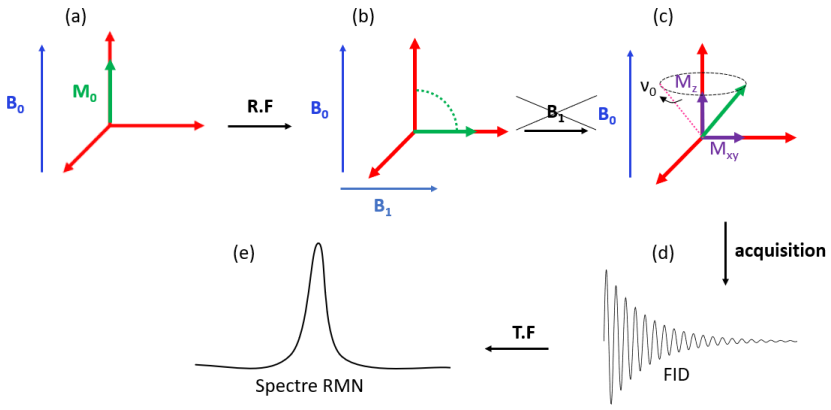


Figure 1. 50 : Schéma du principe de la spectroscopie RMN. Un champ magnétique extérieur B_0 est appliqué permettant aux aimantations nucléaires des protons des molécules de s'aligner selon ce champ (a). Puis une perturbation radiofréquence (RF), B_1, perpendiculaire à B_0 est appliquée amenant M_0 dans le plan xy (b). Après arrêt de la perturbation RF, M_0 retourne à l'équilibre avec un mouvement de précession (c). Une acquisition de ce retour à l'équilibre est réalisée afin de donner le FID (Free Induction Decay) (d). Enfin, en utilisant une transformée de Fourier (T.F), le signal temporel du FID est transformé en signal fréquentiel et le spectre RMN est obtenu (e).

Le phénomène de précession s'accompagne d'un phénomène de relaxation qui permet effectivement le retour à l'équilibre de l'aimantation macroscopique. Ce retour à l'équilibre des spins a été décrit par Félix Bloch :

$$\frac{d\,M_x}{dt} = \gamma . M_y . B_0 - \frac{M_x}{T_2} \quad \text{Eq.32}$$

$$\frac{d\,M_y}{dt} = -\gamma . M_x . B_0 - \frac{M_y}{T_2} \quad \text{Eq.33}$$

$$\frac{d\,M_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad \text{Eq.34}$$

Ces équations permettent ainsi de décrire le phénomène de précession (en vert dans les équations précédentes) ainsi que le phénomène de relaxation (en rouge) : les composantes en x et en y (Eq.32 et Eq.33) sont regroupées sous le terme d'aimantation transversale. Cette composante va décroître en fonction d'un temps noté T_2. La composante z (Eq.34) est dépendante d'un autre temps noté T_1. Ces deux temps, de retour à l'équilibre, se nomment temps de relaxation.

8.2.1.2. La relaxation

Comme exprimé précédemment, il existe deux temps de relaxation T_1 et T_2 : ce sont les temps de relaxation longitudinale (T_1) et transversale (T_2).

Après une impulsion radiofréquence d'angle π/2, la composante longitudinale de l'aimantation est nulle (M_z (0) = 0) alors que sa composante transversale est maximale ($M_{x,y}(0) = M_0$). A partir de ce moment, l'aimantation va revenir à son état d'équilibre : la composante longitudinale va croître en fonction du temps T_1 et la composante transversale va disparaître en fonction du temps T_2. Plus précisément, T_1 correspond au temps que met l'aimantation à se reconstruire à 63% de M_0 selon l'axe z (Figure 1. 51.a). En effet, la résolution de l'équation 34 avec $M_z(0) = 0$ permet de décrire l'évolution exponentielle de la composante M_z au cours du temps t et en fonction de T_1 :

$$M_z(t) = M_0 . \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right) \quad \text{Eq.35}$$

L'ordre de grandeur du temps de relaxation longitudinale est de l'ordre de la seconde, voire de la milliseconde en solution. La relaxation est due à la modulation des interactions (notamment des interactions dipolaires) du fait de la dynamique des molécules. C'est pour cela que dans de l'eau ultra-pure, environnement où les molécules d'eau sont libres et présentent un mouvement rapide, le temps de relaxation longitudinale est long alors que dans des tissus graisseux (composés de grosses molécules et de peu de molécules d'eau), ce temps de relaxation est court [251,252].

Pendant que la composante M_z se reconstruit, la composante dans le plan xy M_{xy} disparaît. Le temps que met l'aimantation M_{xy} à disparaître est le temps de relaxation transversale T_2. Plus précisément, le temps de relaxation T_2 correspond à la déconstruction de 63% de l'aimantation M_{xy} (Figure 1. 51.b).

En résolvant les équations de Bloch des composantes x et y (Eq. 32 et Eq.33), l'équation permettant de décrire la disposition de la composante transversale selon une loi exponentielle décroissante s'écrit :

$$M_{xy}(t) = M_0 . e^{-\frac{t}{T_2}} \qquad \text{Eq.36}$$

Le retour à l'équilibre de la composante longitudinale selon T_1 et la disparition de la composante transverse selon T_2 sont deux processus disjoints. Dans le cas de mouvements rapides des molécules (domaine appelé rétrécissement extrême, par exemple de l'eau pure), les temps de relaxation longitudinale et transverse sont identiques. Mais, il peut arriver que les valeurs de T_2 soient jusqu'à 10 fois inférieures à celles de T_1. C'est le cas de molécules ayant des mouvements plus lents comme par exemple dans les tissus graisseux [251,252].

Dans la pratique, c'est le temps de relaxation noté T_2^* qui intervient en raison des inhomogénéités de champ magnétique. T_2^* contient donc à la fois le temps de relaxation transversale T_2 ainsi que la contribution de toutes ces inhomogénéités de champ magnétique $\Delta\omega$ tel que :

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma . \Delta\omega \qquad \text{Eq.37}$$

Cette valeur de T_2^* caractéristique de l'échantillon et plus précisément des tissus biologiques est très utilisée en IRM.

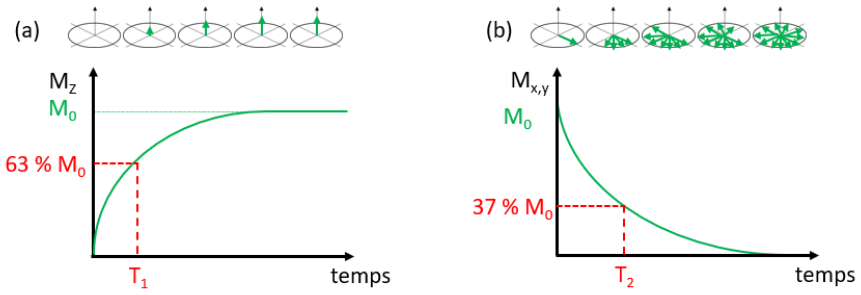


Figure 1. 51 : Evolution de la composante longitudinale après une impulsion à π/2 en fonction du temps pour permettre de déterminer les temps de relaxation longitudinale T_1 qui correspond à 63% de M_0 (a) et transversale T_2 qui correspond à 37% de M_0 (b).

8.2.2. L'IRM

8.2.2.1. Marquage spatial et obtention d'images

Afin d'obtenir une image à partir du signal des protons, un codage de l'espace est créé. Pour l'IRM, le codage consiste à donner une valeur différente au champ magnétique statique ressenti par les spins à différentes positions dans l'espace. Pour ceci, un gradient de champ magnétique est appliqué et

provoque une variation linéaire du champ dans une direction donnée. Si ce gradient (noté G) est appliqué par exemple dans la direction x, alors le champ ressenti par les spins sera fonction de leur position selon cet axe : leur fréquence sera donc également fonction de cette position (Eq.38). Ce marquage spatial permet alors d'obtenir un profil en densité de spin, ce qui reflète simplement le nombre de spins en fonction de la position dans la direction x de l'échantillon. En IRM, pour reconstruire des images d'un objet, ces gradients de champ sont appliqués dans les trois directions de l'espace.

$$\nu = \frac{\gamma B_{eff}}{2\pi} = \frac{\gamma(B_0 + G \times X)}{2\pi} \qquad \text{Eq.38}$$

Avec B_{eff} le champ magnétique effectif ressenti par le spin nucléaire en fonction de sa position.

Une cartographie est alors créée en fonction de la concentration locale de molécules d'eau (c'est-à-dire la densité des protons). Dans la pratique, des sélections de tranches (Figure 1. 52.a) sont réalisées afin d'imager tout le volume de l'échantillon (Figure 1. 52.b).

(a)

(b)

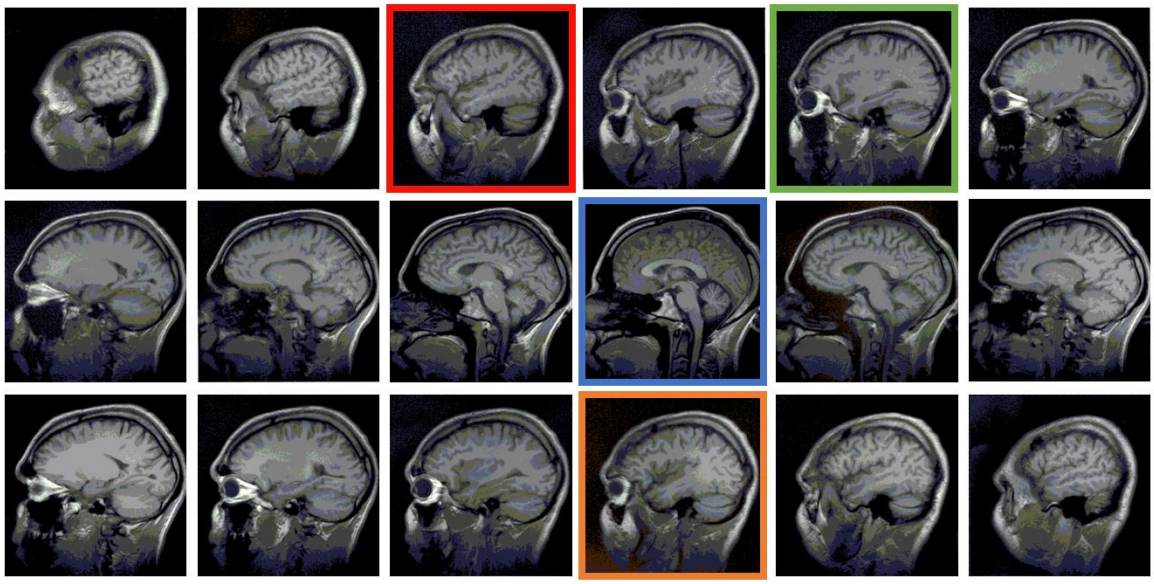


Figure 1. 52 : Représentation des coupes anatomiques pour les images IRM (a) et images IRM d'une tête humaine en pondération T_1 en coupe sagittale (b). Les coupes anatomiques de la figure (a) sont encadrées sur les images IRM selon leur couleur en (b).

Les séquences utilisées en IRM sont très variées et nombreuses. Nous retiendrons ici qu'elles nécessitent l'emploi de techniques d'écho caractérisées par un temps d'écho T_E. Un autre temps caractéristique des séquences IRM est le temps de répétition T_R qui sépare deux mesures consécutives.

8.2.2.2. Les contrastes

Comme expliqué ci-dessus, l'IRM permet d'obtenir des images de la densité de protons dans les tissus biologiques. Des contrastes peuvent donc apparaître car la quantité d'eau n'est pas répartie de façon homogène dans tout le corps (Figure 1. 48). Mais, il est également possible d'obtenir des contrastes qui sont dus à la relaxation. En effet, les temps de relaxation des protons de l'eau diffèrent en fonction de la mobilité et de l'environnement. Le Tableau 1. 3 résume les temps de relaxation T_1 et T_2 dans de l'eau ultra-pure et dans les différents tissus biologiques [251–253].

Tableau 1. 3 : Exemple des temps de relaxation de différents tissus sous un champ de 1,5T et à 37°C [251–253].

Nature	T_1 (ms)	T_2 (ms)	Teneur en eau
Liquide céphalo-rachidien	2500	1000	99%
Sang	1200	327	83%
Cœur		44	80%
Substance grise	1086	35	76%
Muscle	1060	35	75%
Substance blanche	778	79	76%
Reins	709	61	81%
Foie	600	54	70%
Graisse	200	75	10%
Eau ultra-pure	3000	3000	100%

Un contraste dit en T_1 sera obtenu en jouant sur le T_R des séquences d'impulsion IRM alors qu'un contraste en T_2 sera obtenu en jouant sur le temps T_E.

Des informations différentes peuvent apparaître entre des images pondérées en T_1 et des images pondérées en T_2 (Figure 1. 53.a et b). En effet, les images pondérées en T_1 vont permettre d'avoir une information anatomique des tissus. Ainsi, sur une image IRM d'une coupe de cerveau, la substance blanche et la substance grise (neurones différents du cerveau) sont différenciées (Figure 1. 53.a). Quant aux images pondérées en T_2, une information plus pathologique est obtenue : ces images permettent de mettre en évidence la présence de liquide dans les tissus, souvent synonyme d'œdèmes ou d'inflammation, mais également la présence de sang, synonyme d'hémorragie. Pour le cerveau, avec une image pondérée en T_2, il est impossible de différencier la substance blanche de la substance grise (Figure 1. 53.b). Il existe également des images pondérées en T_2^* mettant en évidence des structures plus fines que les images en T_2 mais avec des contrastes moins intenses. Enfin, les images pondérées en P (densité de protons) permettent d'accéder à une information anatomique très précise et sont surtout utilisées dans des systèmes à haut champ (Figure 1. 53.c) [254].

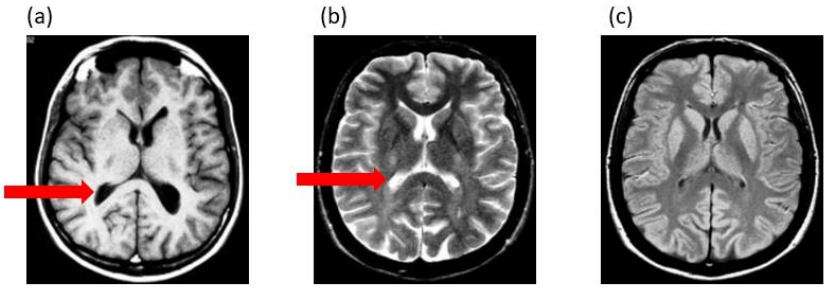


Figure 1. 53 : Images IRM d'une coupe axiale de cerveau pondérée en T_1 (a), en T_2 (b) ou en densité de protons (c). Les flèches rouges montrent le troisième ventricule où se trouve du liquide céphalo-rachidien en noir en T_1 (a) et en blanc en T_2 (b) [254].

En conclusion, la caractéristique principale d'une image IRM provient de son contraste. Selon la pondération ainsi que la nature du tissu, le contraste est différent. Par exemple, le liquide céphalo-rachidien est noir sur les images pondérées en T_1 (flèche rouge Figure 1. 53.a) mais blanc sur les images pondérées en T_2 (flèche rouge Figure 1. 53.b). Les tissus en blanc sur des images IRM correspondent à un hypersignal alors que les tissus en noir correspondent à un hyposignal. Afin d'améliorer ces contrastes, l'utilisation d'agents de contraste est une solution.

8.3. Les agents de contrastes

8.3.1. Utilisation des agents de contrastes en IRM

Les images IRM, grâce à leurs contrastes, permettent d'accéder à une bonne information spatiale dans les tissus humains. Cependant, dans certaines zones, il est possible que le contraste soit insuffisant. Afin de pallier à cela, des agents de contraste ont été développés permettant ainsi d'accentuer la relaxation des ^1H de l'eau.

Le premier agent de contraste, développé en 1988, était une molécule à base de gadolinium III sous la forme d'un complexe (Gd^{3+}-DTPA pour acide gadopentétique) (Figure 1. 54) [255,256].

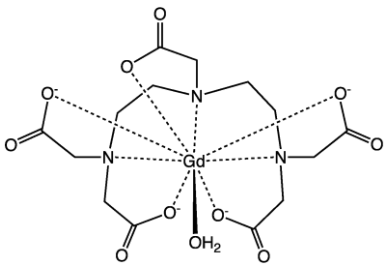


Figure 1. 54 : Formule chimique du premier agent de contraste développé Gd^{3+}-DTPA (Magnevist®).

Depuis le développement de celui-ci, de plus en plus d'agents de contraste sous forme de complexes ou de nanoparticules ont été synthétisés. Ils sont utilisés dans 40% des examens IRM. En général, les agents de contraste sont injectés par voie intra-veineuse. Ils permettent d'améliorer le contraste en

accélérant les vitesses de relaxation des protons de l'eau. Grâce à eux, le temps des examens IRM est réduit et une meilleure distinction entre les tissus sains et les tissus malades comme les tissus cancéreux est observable (Figure 1. 55). Ils permettent une meilleure compréhension du fonctionnement de certains organes [257].

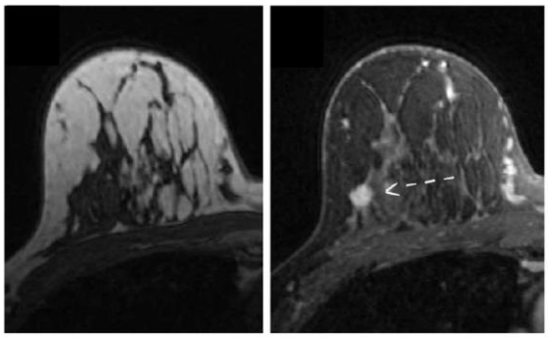


Figure 1. 55 : Images IRM du sein sans agent de contraste (gauche) et avec agent de contraste (droite). Les cellules cancéreuses sont plus visibles avec l'agent de contraste (flèche sur l'image de droite) [257].

Afin de mieux comprendre le principe des agents de contraste, dans le paragraphe suivant, la notion de relaxivité est définie. Puis, les agents de contraste sont présentés pour les différents temps de relaxation en expliquant leur mécanisme. Enfin, les agents de contraste actuellement sur le marché sont présentés.

8.3.2. La relaxivité

8.3.2.1. Définition

Pour comparer les agents de contraste, la relaxivité $r_{i\,(i=1\,;2)}$ doit être définie. Cette relaxivité r_i permet de quantifier l'efficacité de l'agent de contraste sur la relaxation des protons de l'eau. Elle est liée à la vitesse de relaxation R_i (inverse du temps de relaxation T_i des ^1H de l'eau) ainsi qu'à la concentration de l'agent de contraste selon la relation :

$$R_i = \frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_0} + r_i \times [C] \qquad \text{Eq.39}$$

Avec R_i la vitesse de relaxation en s^{-1}, T_i le temps de relaxation en s, T_0 le temps de relaxation de l'eau pure en s, [C] la concentration de l'agent de contraste en mmol.L^{-1} (mM) et r_i la relaxivité en $s^{-1}.mM^{-1}$ (i = 1 ; 2). Ainsi, pour les temps de relaxation longitudinale (i = 1) et transversale (i = 2), une valeur de relaxivité est définie comme étant l'augmentation de la vitesse de relaxation des protons de l'eau produit par 1 mM d'agent de contraste. Cette valeur permet de comparer les différents agents de contraste entre eux, de mesurer leur efficacité et de la quantifier. Expérimentalement, cette relaxivité est déterminée par la valeur de la pente de la régression linéaire entre la concentration en agent de contraste et la vitesse de relaxation des ^1H de l'eau (Figure 1. 56).

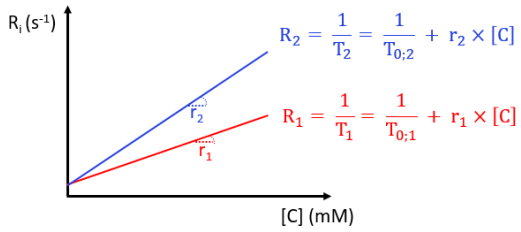


Figure 1. 56 : Représentation graphique de la vitesse de relaxation $R_{i\ (i\ =\ 1\ ;2)}$ en fonction de la concentration de l'agent de contraste afin de déterminer la relaxivité $r_{i\ (i\ =\ 1\ ;2)}$.

8.3.2.2. Mesure de la relaxivité

Pour mesurer les valeurs de temps de relaxation (T_1 et T_2), il faut perturber l'aimantation macroscopique puis suivre l'évolution de ses composantes (M_z ou $M_{x,y}$) en fonction d'un temps variable.

Pour le temps de relaxation longitudinale T_1, la séquence impulsionnelle la plus couramment utilisée est la séquence d'inversion-récupération. Deux impulsions radiofréquences, une à 180° et une à 90°, sont émises. L'aimantation nucléaire, après l'impulsion de 180°, se retrouve selon l'axe z mais dans les valeurs négatives puis un délai τ est appliqué permettant à l'aimantation de revenir à l'équilibre. Après ce délai, une impulsion à 90° est réalisée et le signal est mesuré (Figure 1. 57). Cette séquence est répétée plusieurs fois en utilisant différents délais τ.

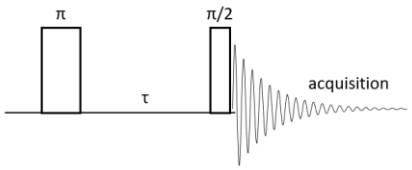


Figure 1. 57 : Séquence impulsionnelle de l'inversion-récupération pour mesurer le temps de relaxation longitudinale T_1.

Le temps T_1 est obtenu par l'analyse de l'évolution du signal mesuré en fonction de τ (cf équation de Bloch Eq.34).

Pour mesurer le temps de relaxation transversale T_2, la séquence impulsionnelle utilisée est la séquence spin-écho. Cette séquence d'impulsion consiste à attendre un délai de 2τ après avoir placé l'aimantation dans le plan de mesure (impulsion à 90°). Une impulsion à π est placée au centre de ce délai pour s'affranchir de tout effet de déplacement chimique (Figure 1. 58).

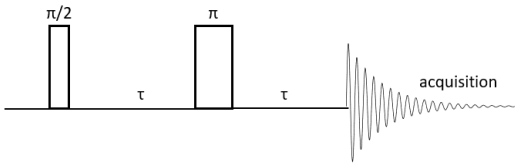


Figure 1. 58 : Séquence impulsionnelle spin-écho pour mesurer le temps de relaxation transversale T_2.

Cependant, cette séquence n'est pas appropriée pour des échantillons où la diffusion moléculaire est rapide et en présence d'inhomogénéités de champ. Pour éviter ce problème, l'idée est de réduire ce délai pour minimiser les effets de diffusion. Un train d'écho est donc appliqué, consistant en une répétition d'impulsions radiofréquence à 90° entre un temps de délai de 2τ (Figure 1. 59) : cette séquence d'impulsion est la séquence de Carr Purcell Meiboom Gill (séquence CPMG).

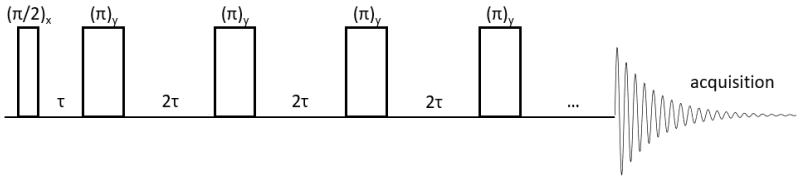


Figure 1. 59 : Séquence impulsionnelle spin-écho avec un train d'écho (séquence CPMG) pour mesurer le temps de relaxation transversale T_2.

Le temps T_2 est ensuite obtenue par l'analyse de l'évolution du signal mesuré en fonction de τ et du nombre d'échos réalisés (cf équation de Bloch Eq.32 et Eq.33).

8.3.3. Les différents types d'agents de contraste

Des agents de contraste existent qui vont augmenter préférentiellement une valeur de relaxivité, c'est-à-dire soit la relaxivité longitudinale r_1, soit la relaxivité transversale r_2. Cette variation de relaxivité est liée aux propriétés magnétiques de l'agent de contraste. Ainsi, pour accentuer le contraste en T_1, des agents de contrastes avec un cœur paramagnétique sont utilisés alors que le contraste en T_2, des agents de contraste avec un cœur superparamagnétique sont privilégiés.

8.3.3.1. Les agents de contrastes paramagnétiques

Ces agents de contraste sont appelés agents de contraste positifs car ils ont un effet sur le T_1 des protons de l'eau et donc sur la vitesse de reconstruction du signal. Ils sont essentiellement composés de gadolinium (III) (Gd^{3+}) au moment paramagnétique très élevé. En effet, il est composé de 7 électrons non appariés de spin 7/2 [258]. D'autre ions avec des moments paramagnétiques forts peuvent être utilisés comme Mn^{2+} ou Fe^{3+} sans égaler les agents de contraste à base de Gd^{3+}. Ces agents de contraste

paramagnétiques fonctionnent par interactions entre le cœur paramagnétique et les molécules d'eau environnantes se complexant sur le gadolinium (Figure 1. 60). Ce phénomène est décrit par le modèle de la sphère interne et de la sphère externe de coordination des ions métalliques [258–260].

Le problème majeur de ces agents de contraste réside dans la toxicité de Gd^{3+}. En effet, à l'état libre, l'ion gadolinium (III) a un rayon ionique proche de l'ion calcium Ca^{2+} (107,8 pm pour Gd^{3+} et 114 pm pour Ca^{2+}). Gd^{3+} peut bloquer de façon préférentielle les canaux calciques voltage-dépendants [261,262], inhibant ainsi la contraction musculaire, la coagulation sanguine ou la transmission de l'influx nerveux [263–265]. Enfin, il peut inhiber l'activité de certaines enzymes comme l'ATPase [266,267]. Pour éviter ces problèmes de cytotoxicité, les agents de contraste avec un cœur de gadolinium (III) sont complexés soit par une coquille inorganique, soit par une coquille organique (Figure 1. 60) [268,269].

De nombreux agents de contraste existent actuellement sur le marché à base de gadolinium. Une liste non exhaustive est présentée dans le Tableau 1. 4.

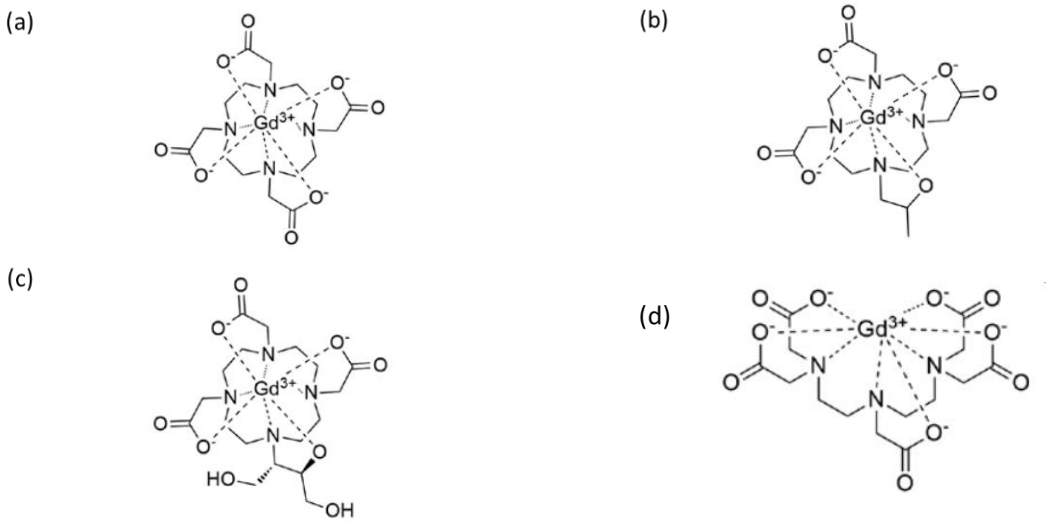


Figure 1. 60 : Exemples d'agents de contraste commercialisés comme Gd-DOTA (Dotarem®) (a) ; Gd-HP-DO3A (ProHance®) (b) ; Gd-DO3A-butrol (Gadovist®) (c) et Gd-DTPA (Magnevist®) (d) [268,269].

Tableau 1. 4 : Principaux agents de contraste paramagnétiques commerciaux et leur relaxivité à 20 MHz (fréquence du ^1H, soit 0,47 T) [253,270].

Nom	Formule chimique	Biodistribution	Relaxivité r_1 ($s^{-1}.mM^{-1}$)
Dotarem®	$[Gd(DOTA)H_2O]^-$	Extracellulaire	4,2
ProHance®	$[Gd(HP\text{-}DO3A)H_2O]$	Extracellulaire	4,4
Gadovist®	$[Gd(BT\text{-}DO3A)H_2O]$	Extracellulaire	5,3
Magnevist®	$[Gd(DTPA)H_2O]^{2-}$	Extracellulaire	4,3
Primovist®	$[Gd(EOB\text{-}DTPA)H_2O]^-$	Hépatobiliaire	7,3
Vasovist®	MS-325	Vasculaire	19

Cependant, même avec cette protection organique ou inorganique, des phénomènes de transmétallation et de libération de Gd^{3+} peuvent persister et générer des pathologies rénales

[266,267]. De plus, le temps de demi-vie plasmatique de ces agents de contraste est relativement court (90 min) car ils diffusent très rapidement dans le milieu extracellulaire.

8.3.3.2. Les agents de contraste superparamagnétiques

Afin d'améliorer le contraste T_2, des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques, soit de la magnétite Fe_3O_4 soit de la maghémite γ-Fe_2O_3, sont très utilisées. En effet, ces nanoparticules contiennent des ions Fe^{2+} ou Fe^{3+} paramagnétiques : la susceptibilité magnétique de ces agents de contraste est ainsi supérieure à celle des agents de contraste pour les images pondérées en T_1.

L'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques permet de diminuer le temps de relaxation T_2 : elle est liée à l'inhomogénéité du champ magnétique autour des nanoparticules. Ce phénomène est décrit par le mécanisme de la sphère interne et de la sphère externe (Figure 1. 61) [258–260,271].

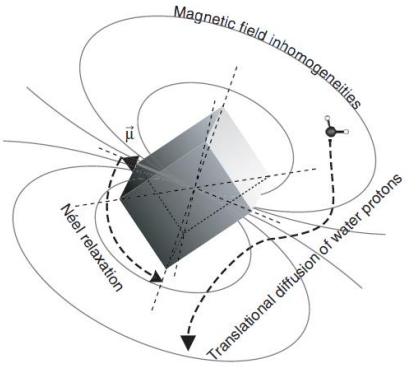


Figure 1. 61 : Schéma du mécanisme de relaxation de la sphère externe [271].

En diminuant le temps de relaxation transversale, ces agents de contrastes diminuent fortement le signal et assombrissent les images IRM pondérées en T_2. Ces agents de contraste sont appelés agents négatifs.

Comme cela a été évoqué précédemment dans ce chapitre (cf 6.3), les nanoparticules d'oxyde de fer sont fonctionnalisées afin d'éviter toute cytotoxicité. Cependant, pour éviter que la relaxivité soit fortement diminuée, la couche organique protégeant le cœur inorganique ne doit pas être très épaisse. Pour cela, des molécules organiques comme le dextran sont très utilisées et permettent de créer un compromis entre l'épaisseur de la couche organique et la maximisation de la relaxivité [192–194]. Ainsi, la valeur du diamètre hydrodynamique (diamètre du cœur inorganique plus de la couche organique et de la sphère de solvatation) constitue un paramètre important. Selon le diamètre hydrodynamique, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (en anglais Superpamagnetic Iron Oxide Nanoparticle ou SPION), peuvent être classées en différentes catégories pour des applications en IRM différentes :

- Les agents VSOP (Very Small superparamagnetic iron Oxide nanoParticle) d'un diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm [272,273]. Ces nanoparticules sont efficaces pour des images par angiographie à résonance magnétique ainsi que pour la visualisation des artères coronaires (artères autour du cœur).
- Les agents USPION (Ultra small Superpamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) au diamètre hydrodynamique compris entre 10 et 50 nm [274,275]. Cette catégorie est souvent associée avec les VSOP en définissant un diamètre hydrodynamique inférieur à 50nm. Ces nanoparticules ne s'accumulent pas dans le système réticuloendothéliale (ensemble de cellules immunitaires générant la phagocytose) et restent un moment dans les organismes. En effet, le temps de demi-vie plasmique de ces nano-objets est de l'ordre de deux heures [276–278]. Ils sont utilisés pour l'angiographie à résonance magnétique, dans la détection de maladies inflammatoires ou dégénératives associées à la diffusion de macrophages [279].
- Les agents SPION au diamètre hydrodynamique compris entre 60 et 150nm sont soit à l'état de mono-grains soit à l'état d'agglomérats [280,281]. En raison de de la taille de ces nanoparticules, leur temps de demi-vie plasmatique est plus court au sein de l'organisme (de l'ordre de la minute, voire de l'heure). Elles ne peuvent pas être utilisées pour le ciblage spécifique de tumeurs [282]. Ces nanoparticules s'accumulent fortement, notamment dans le foie ou la rate [283], permettant d'imager les lésions ou les tumeurs présentes [284,285].
- Les agents MPIO (Micron-sized Paramagnetic Iron Oxide particle) d'une taille supérieure au µm [286]. Ces particules, paramagnétiques en raison de leur taille, sont utilisées pour visualiser les cellules de façon individuelle [287,288].

Dans le milieu hospitalier, les SPIONs et les USPIONs sont les nanoparticules les plus souvent utilisées en tant qu'agents de contraste pour les images pondérées en T_2. En effet, leur valeur de relaxivité transversale r_2 est très élevée. Pour déterminer si un agent négatif est suffisant pour des analyses en IRM, un critère utilisé est le rapport entre la relaxivité transversale et la relaxivité longitudinale (r_2/r_1). Si ce rapport est supérieur à 2, l'agent de contraste permet d'avoir une bonne qualité d'image pondérée en T_2 [271]. Le Tableau 1. 5 présente une liste non exhaustive des agents commerciaux les plus connus. Ces agents de contraste ont tous été retirés du marché du médicament en France ou n'ont pas été approuvé par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Par exemple, Lumirem® a été mis sur le marché le 07/06/1993 et a été retiré du marché en 2014. De plus, son autorisation de mise sur le marché a été abrogée le 28/12/2016. Il en est de même pour l'Endorem® qui a été mis sur le marché en 1994, retiré en 2011 et son AMM a été abrogé en 2012.

Tableau 1. 5 : Principaux agents de contraste à base d'oxyde de fer superparamagnétiques pour des images pondérées en T_2 avec leur relaxivité en fonction du champ à 37°C [253,270].

Nom	Diamètre hydrodynamique (nm)	Enrobage	Biodistribution	Relaxivité r_2 ($s^{-1}.mM^{-1}$)
Lumirem®	300	Siloxane	Gastro-intestinale	3,8 (0,47T)
Endorem®	80 - 150	Dextran	Foie	107 (0,47T)
Feridex®	120 - 180	Dextran	Foie	130 (0,47T)
Supravist®	21	Carboxy-dextran	Sang	38 (1,5T)
Combidex®	20 - 40	Dextran	Foie, ganglions lymphatiques	65 (1,5T)
Abdoscan®	7	Citrate	Marquage cellulaire, sang	33,4 (1,5T)

De nos jours en France, les examens IRM sont majoritairement réalisés sous un champ magnétique de 1,5T (en 2011, 92% des examens étaient réalisés sous un champ de 1,5T, 5% sous un champ de 3T, 2% sous un champ de 1T et 1% sous un champ inférieur à 1T [249]). Pour augmenter la sensibilité et la résolution des images obtenues en IRM, les champs magnétiques des installations IRM tendent à augmenter malgré l'augmentation du coût de ces installations. C'est ici que les agents de contraste T_2 montrent tout leur intérêt. En effet, la relaxivité r_2 des nanoparticules d'oxyde de fer augmente quand le champ magnétique augmente avec un plateau à haut champ, alors que la relaxivité r_1 chute drastiquement (Figure 1. 62) : les agents de contrastes négatifs seront donc plus avantageux avec ces IRM à haut champ magnétique [152]. Cette évolution est décrite par des profils NMRD pour Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion qui représentent l'évolution de la relaxivité en fonction de la fréquence de résonance du ^1H ou de manière équivalente en fonction du champ magnétique B_0.

Les nanoparticules peuvent être dopées avec un élément chimique magnétique comme le nickel, le cobalt ou le manganèse mais, ces éléments sont toxiques ou allergisant pour le corps humain [289–291].

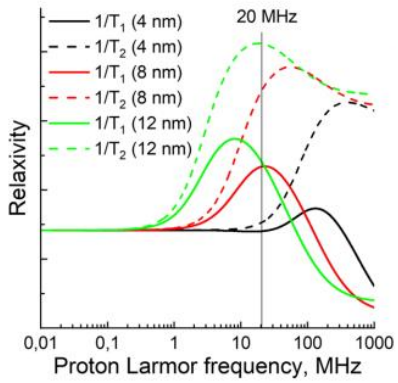


Figure 1. 62 : Profils NMRD (de 10kHz à 1000 MHz) de nanoparticules d'oxyde de fer de différentes tailles : r_1 (traits pleins) et r_2 (traits pointillés) [152].

Pour augmenter la relaxivité, une dernière solution est d'augmenter le diamètre hydrodynamique. Néanmoins, le temps de demi-vie plasmatique diminuerait fortement. De plus en plus d'études sont donc tournées vers la diminution de la taille des nanoparticules et du diamètre hydrodynamique afin qu'elles puissent rester suffisamment longtemps pour réaliser des imageries des systèmes sanguin et lymphatique [207,208]. De plus, grâce à cette réduction de diamètre hydrodynamique, ces nanoparticules peuvent passer les barrières biologiques comme la barrière hémato-encéphalique, le problème majeur restant de bien protéger ces nanoparticules pour éviter toute cytotoxicité (cf paragraphe 6.1).

8.4. Conclusion

L'IRM est devenue une technique d'imagerie de plus en plus utilisée depuis quelques années car non invasive et de bonne résolution spatiale. Cependant, les examens IRM peuvent être longs et manquer de précision. Pour cela, des agents de contraste sont utilisés pour réduire le temps des examens et améliorer les contrastes. Il existe des agents de contraste positifs ayant un effet sur la relaxation longitudinale T_1 et des agents de contraste négatifs ayant un effet sur la relaxation transverse T_2.

Les agents de contraste négatifs les plus utilisés sont des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. En effet, la synthèse de ces nanomatériaux est facile à mettre en œuvre, leur relaxivité est bonne mais est dépendante de nombreux paramètres comme leurs propriétés magnétiques ou leur taille. De plus, pour éviter toute toxicité au niveau de l'organisme, une protection du cœur de l'oxyde de fer par une coquille organique comme du dextran est souvent réalisée. Cependant, si la taille devient trop élevée, ces agents de contraste sont rapidement éliminés de l'organisme car leur temps de demi-vie plasmatique est réduit.

De nombreuses études sont donc réalisées sur la synthèse et la relaxivité de nanoparticules avec des diamètres environ égaux à 5nm pour viser un temps de demi-vie plasmatique suffisamment élevé pour réaliser des analyses IRM. De plus, avec cette réduction de taille, même si la relaxivité transversale diminue, la relaxivité longitudinale augmente fortement, allant jusqu'à des valeurs de 50 $s^{-1}.mM^{-1}$ [292] : ces nouveaux agents de contraste pourraient être utilisés à la fois pour des images pondérées en T_1 et en T_2 [114,293].

9. Conclusion générale du chapitre 1

Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont très étudiées à travers le monde. En effet, leurs propriétés magnétiques particulières (pas d'aimantation à température ambiante) permettent leur utilisation potentielle dans de nombreuses applications notamment des applications biomédicales comme la vectorisation de médicament, le traitement par hyperthermie ou l'imagerie médicale.

De nombreuses techniques de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer existent, allant de la plus simple comme la technique par coprécipitation à des techniques plus difficiles à mettre en œuvre comme la technique par flux d'injection. Chacune des techniques de synthèse possède des avantages comme des inconvénients. Pour des utilisations dans le domaine biomédical, les techniques permettant l'élaboration des nanoparticules directement dans l'eau sont privilégiées. Cependant, les nanoparticules obtenues sont généralement polydisperses et s'agrègent rapidement. Pour minimiser ces inconvénients, l'ajout de ligands est souvent utilisé pour stabiliser les nanoparticules dans le milieu aqueux et éviter leur agrégation. Pour améliorer ces facteurs clés, une nouvelle technique de synthèse peut être couplée à l'ajout des ligands : la synthèse par voie micro-ondes. Elle doit permettre d'augmenter la monodispersité des nanoparticules tout en réduisant le temps de synthèse.

L'objectif de cette thèse est donc de développer une nouvelle méthode de synthèse à partir du micro-ondes et de comparer les propriétés physico-chimiques des nanoparticules synthétisées avec celles obtenues par une technique conventionnelle. Une optimisation des paramètres de synthèse est à envisager afin de répondre au mieux pour les applications dans le domaine biomédical. En effet, ces nanoparticules pourraient être utilisées en tant qu'agents de contraste pour les IRM avec une bonne stabilité dans l'eau, une bonne cristallinité, une fonctionnalisation et des propriétés magnétiques adéquates.

L'étude biologique des nanoparticules développées est essentielle pour prévenir une éventuelle cytotoxicité. En effet, en fonction de leur taille, de leur état de surface et de leur stabilité, les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent se révéler toxiques pour les cellules en générant du stress oxydatif, en pénétrant le noyau des cellules et en altérant le code génétique des cellules. Pour une utilisation en IRM et considérant le nombre d'équipements IRM à travers le monde utilisant des champs magnétiques différents, il est important de déterminer la relaxivité et l'efficacité des nanoparticules synthétisées en fonction de ce champ magnétique.

10. Bibliographie Chapitre 1

[1] Lide, D.R.; Baysinger, G.; Chemistry, S.; Berger, L.I.; Goldberg, R.N.; Kehiaian, H.V. CRC Handbook of Chemistry and Physics. **2017**, *97th édition*, 2661.

[2] Bragg, W.H. The Structure of Magnetite and the Spinels. *Nature*, **1915**, 561.

[3] Nishikawa, S. Structure of Some Crystals of the Spinel Group, **1915**, 199–209.

[4] Cornell, R.M.; Schwertmann, U. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*; 2ème édition.; **2006**.

[5] Teja, A.S.; Koh, P.-Y. Synthesis, Properties, and Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, **2009**, *55*, 22–45.

[6] Morales, M.P.; Pecharroman, C.; Gonzalez Carreño, T.; Serna, C.J. Structural Characteristics of Uniform Gamma-Fe2O3 Particles with Different Axial (Length/Width) Ratios. *Journal of solid state chemistry*, **1994**, 158–163.

[7] Morales, M.P.; Andres-Vergés, M.; Veintemillas-Verdaguer, M.; Montero, M.I.; Serna, C.J. Structural Effects on the Magnetic Properties of Gamma-Fe2O3 Nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **1999**, 146–148.

[8] Shmakov, A.N.; Krvukova, G.N.; Tsvbulva, S.V. Vacancy Ordering in Y-Fe203: Synchrotron X-Ray Powder Diffraction and High-Resolution Electron Microscopy Studies. *Journal of Applied Crystallography*, **1995**, *28*, 141–145.

[9] Daou, T.J.; Grenèche, J.M.; Pourroy, G.; Buathong, S.; Derory, A.; Ulhaq-Bouillet, C.; Donnio, B.; Guillon, D.; Begin-Colin, S. Coupling Agent Effect on Magnetic Properties of Functionalized Magnetite-Based Nanoparticles. *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 5869–5875.

[10] Venturini, P. Synthèse et caractérisation de nanomatériaux hybrides innovants pour le biomédical, Université de Lorraine, **2017**.

[11] Schwaminger, S.P.; Fraga-García, P.; Selbach, F.; Hein, F.G.; Fuß, E.C.; Surya, R.; Roth, H.-C.; Blank-Shim, S.A.; Wagner, F.E.; Heissler, S.; Berensmeier, S. Bio-Nano Interactions: Cellulase on Iron Oxide Nanoparticle Surfaces. *Adsorption*, **2017**, *23*, 281–292.

[12] Schwertmann, U.; Cornell, R.M. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*; 2nd completely rev. and extended ed.; Wiley-VCH: Weinheim ; New York, **2000**.

[13] Hillion, A. Étude des propriétés magnétiques d'assemblées de nanoparticules de Co, FeRh et FeAu., Université de Lyon 1, **2012**.

[14] Guimarães, A.P. Magnetic Domains. In *Principles of Nanomagnetism*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2009**; pp. 21–56.

[15] Kronmüller, H. General Micromagnetic Theory. In *Handbook of Magnetism and Advanced Magnetic Materials*; Kronmüller, H.; Parkin, S., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2007**; p. 201.

[16] Kolhatkar, A.; Jamison, A.; Litvinov, D.; Willson, R.; Lee, T. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *IJMS*, **2013**, *14*, 15977–16009.

[17] Krishnan, K.M. Biomedical Nanomagnetics: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy. *IEEE Trans. Magn.*, **2010**, *46*, 2523–2558.

[18] Schwaminger, S.; Syhr, C.; Berensmeier, S. Controlled Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Magnetite or Maghemite? *Crystals*, **2020**, *10*, 214.

[19] Ansari, S.; Ficiarà, E.; Ruffinatti, F.; Stura, I.; Argenziano, M.; Abollino, O.; Cavalli, R.; Guiot, C.; D'Agata, F. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System. *Materials*, **2019**, *12*, 465.

[20] Lacroix, L.-M. Nanoparticules de Fer de Taille Contrôlée Pour l'hyperhermie Synthèse Par Voie Organométallique, Caractérisations Magnétiques et Mesures de Puissance Dissipée, Université de Toulouse, **2008**.

[21] Guimarães, A.P. Magnetism of Small Particles. In *Principles of Nanomagnetism*; Guimarães, A.P., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2009**; pp. 57–104.

[22] Figuerola, A.; Di Corato, R.; Manna, L.; Pellegrino, T. From Iron Oxide Nanoparticles towards Advanced Iron-Based Inorganic Materials Designed for Biomedical Applications. *Pharmacological Research*, **2010**, *62*, 126–143.
[23] Jeong, U.; Teng, X.; Wang, Y.; Yang, H.; Xia, Y. Superparamagnetic Colloids: Controlled Synthesis and Niche Applications. *Adv. Mater.*, **2007**, *19*, 33–60.
[24] Skumryev, V.; Blythe, H.J.; Cullen, J.; Coey, J.M.D. AC Susceptibility of a Magnetite Crystal. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **1999**, *196–197*, 515–517.
[25] Valstyn, E.P.; Hanton, J.P.; Morrish, A.H. Ferromagnetic Resonance of Single-Domain Particles. *Phys. Rev.*, **1962**, *128*, 2078–2087.
[26] Baaziz, W.; Pichon, B.P.; Fleutot, S.; Liu, Y.; Lefevre, C.; Greneche, J.-M.; Toumi, M.; Mhiri, T.; Begin-Colin, S. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Reproducible Tuning of the Size and Nanosized-Dependent Composition, Defects, and Spin Canting. *J. Phys. Chem. C*, **2014**, *118*, 3795–3810.
[27] Mørup, S.; Brok, E.; Frandsen, C. Spin Structures in Magnetic Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, **2013**, *2013*, 1–8.
[28] Morales, M.P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Montero, M.I.; Serna, C.J.; Roig, A.; Casas, Ll.; Martínez, B.; Sandiumenge, F. Surface and Internal Spin Canting in γ-Fe2O3 Nanoparticles. *Chem. Mater.*, **1999**, *11*, 3058–3064.
[29] Néel, L. Anisotropie magnétique superficielle et surstructures d'orientation. *J. Phys. Radium*, **1954**, *15*, 225–239.
[30] Peddis, D.; Cannas, C.; Piccaluga, G.; Agostinelli, E.; Fiorani, D. Spin-Glass-like Freezing and Enhanced Magnetization in Ultra-Small $CoFe_2O_4$ Nanoparticles. *Nanotechnology*, **2010**, *21*, 125705.
[31] Martínez, B.; Obradors, X.; Balcells, Ll.; Rouanet, A.; Monty, C. Low Temperature Surface Spin-Glass Transition in Gamma Fe2O3 Nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.*, **1998**, *80*, 181–184.
[32] Park, J.; An, K.; Hwang, Y.; Park, J.-G.; Noh, H.-J.; Kim, J.-Y.; Park, J.-H.; Hwang, N.-M.; Hyeon, T. Ultra-Large-Scale Syntheses of Monodisperse Nanocrystals. *Nature Materials*, **2004**, *3*, 891–895.
[33] Demortière, A.; Panissod, P.; Pichon, B.P.; Pourroy, G.; Guillon, D.; Donnio, B.; Bégin-Colin, S. Size-Dependent Properties of Magnetic Iron Oxidenanocrystals. *Nanoscale*, **2011**, *3*, 225–232.
[34] Néel, L. Théorie du traînage magnétique des substances massives dans le domaine de Rayleigh. *J. Phys. Radium*, **1950**, *11*, 49–61.
[35] Néel, L. Influence Des Fluctuations Thermiques Sur l'aimantation de Grains Ferromagnétiques Très Fins. 4.
[36] Dormann, J.L. Magnetic Relaxation in Fine-Particle Systems. *Advances in Chemical Physics*, **1997**, *98*, 283–494.
[37] Nunes, W.C.; Folly, W.S.D.; Sinnecker, J.P.; Novak, M.A. Temperature Dependence of the Coercive Field in Single-Domain Particle Systems. *Phys. Rev. B*, **2004**, *70*, 014419.
[38] Maggioni, D.; Arosio, P.; Orsini, F.; Ferretti, A.M.; Orlando, T.; Manfredi, A.; Ranucci, E.; Ferruti, P.; D'Alfonso, G.; Lascialfari, A. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Stabilized by a Poly(Amidoamine)-Rhenium Complex as Potential Theranostic Probe. *Dalton Trans.*, **2014**, *43*, 1172–1183.
[39] Huang, J.-H.; Parab, H.J.; Liu, R.-S.; Lai, T.-C.; Hsiao, M.; Chen, C.-H.; Sheu, H.-S.; Chen, J.-M.; Tsai, D.-P.; Hwu, Y.-K. Investigation of the Growth Mechanism of Iron Oxide Nanoparticles via a Seed-Mediated Method and Its Cytotoxicity Studies. *J. Phys. Chem. C*, **2008**, *112*, 15684–15690.
[40] Jayaprabha, K.N.; Joy, P.A. Citrate Modified β-Cyclodextrin Functionalized Magnetite Nanoparticles: A Biocompatible Platform for Hydrophobic Drug Delivery. *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 22117–22125.
[41] Sreeja, V.; Jayaprabha, K.N.; Joy, P.A. Water-Dispersible Ascorbic-Acid-Coated Magnetite Nanoparticles for Contrast Enhancement in MRI. *Appl Nanosci*, **2015**, *5*, 435–441.
[42] Bruvera, I.J.; Mendoza Zélis, P.; Pilar Calatayud, M.; Goya, G.F.; Sánchez, F.H. Determination of the Blocking Temperature of Magnetic Nanoparticles: The Good, the Bad, and the Ugly. *Journal of Applied Physics*, **2015**, *118*, 184304.

[43] Thakur, M.; De, K.; Giri, S.; Si, S.; Kotal, A.; Mandal, T.K. Interparticle Interaction and Size Effect in Polymer Coated Magnetite Nanoparticles. *J. Phys.: Condens. Matter*, **2006**, *18*, 9093–9104.
[44] Hah, H.Y.; Gray, S.; Johnson, C.E.; Johnson, J.A.; Kolesnichenko, V.; Kucheryavy, P.; Goloverda, G. Mössbauer Spectroscopy of Superparamagnetic Fe3O4 Nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2021**, *539*, 168382.
[45] LaMer, V.K.; Dinegar, R.H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, *72*, 4847–4854.
[46] WZ, O. Ostwald Ripening. *Physical Chemistry*, **1900**, *34*, 495–503.
[47] Pauly, M.; Pichon, B.P.; Albouy, P.-A.; Fleutot, S.; Leuvrey, C.; Trassin, M.; Gallani, J.-L.; Begin-Colin, S. Monolayer and Multilayer Assemblies of Spherically and Cubic-Shaped Iron Oxide Nanoparticles. *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 16018.
[48] Duan, H.; Kuang, M.; Wang, X.; Wang, Y.A.; Mao, H.; Nie, S. Reexamining the Effects of Particle Size and Surface Chemistry on the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanocrystals: New Insights into Spin Disorder and Proton Relaxivity. *J. Phys. Chem. C*, **2008**, *112*, 8127–8131.
[49] Wang, Q.; Ma, X.; Liao, H.; Liang, Z.; Li, F.; Tian, J.; Ling, D. Artificially Engineered Cubic Iron Oxide Nanoparticle as a High-Performance Magnetic Particle Imaging Tracer for Stem Cell Tracking. *ACS Nano*, **2020**, *14*, 2053–2062.
[50] Zhang, L.; Wu, J.; Liao, H.; Hou, Y.; Gao, S. Octahedral Fe3O4 Nanoparticles and Their Assembled Structures. *Chem. Commun.*, **2009**, 4378.
[51] Kim, D.; Park, J.; An, K.; Yang, N.-K.; Park, J.-G.; Hyeon, T. Synthesis of Hollow Iron Nanoframes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 5812–5813.
[52] Kovalenko, M.V.; Bodnarchuk, M.I.; Lechner, R.T.; Hesser, G.; Schäffler, F.; Heiss, W. Fatty Acid Salts as Stabilizers in Size-and Shape-Controlled Nanocrystal Synthesis: The Case of Inverse Spinel Iron Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, **2007**, *129*, 6352–6353.
[53] Pichon, B.P.; Gerber, O.; Lefevre, C.; Florea, I.; Fleutot, S.; Baaziz, W.; Pauly, M.; Ohlmann, M.; Ulhaq, C.; Ersen, O. Microstructural and Magnetic Investigations of Wustite-Spinel Core-Shell Cubic-Shaped Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, **2011**, *23*, 2886–2900.
[54] Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE transactions on magnetics*, **1981**, *17*, 1247–1248.
[55] Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R.N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 2064–2110.
[56] Ali, A.; Zafar, H.; Zia, M.; ul Haq, I.; Phull, A.R.; Ali, J.S.; Hussain, A. Synthesis, Characterization, Applications, and Challenges of Iron Oxide Nanoparticles. *NSA*, **2016**, *Volume 9*, 49–67.
[57] Majidi, S.; Zeinali Sehrig, F.; Farkhani, S.M.; Soleymani Goloujeh, M.; Akbarzadeh, A. Current Methods for Synthesis of Magnetic Nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **2016**, *44*, 722–734.
[58] Slimani, S.; Meneghini, C.; Abdolrahimi, M.; Talone, A.; Murillo, J.P.M.; Barucca, G.; Yaacoub, N.; Imperatori, P.; Illés, E.; Smari, M.; Dhahri, E.; Peddis, D. Spinel Iron Oxide by the Co-Precipitation Method: Effect of the Reaction Atmosphere. *Applied Sciences*, **2021**, *11*, 5433.
[59] Guo, X.; Wang, W.; Yang, Y.; Tian, Q. Designing a Large Scale Synthesis Strategy for High Quality Magnetite Nanocrystals on the Basis of a Solution Behavior Regulated Formation Mechanism. *CrystEngComm*, **2016**, *18*, 9033–9041.
[60] Lu, T.; Wang, J.; Yin, J.; Wang, A.; Wang, X.; Zhang, T. Surfactant Effects on the Microstructures of Fe3O4 Nanoparticles Synthesized by Microemulsion Method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2013**, *436*, 675–683.
[61] Starowicz, M.; Starowicz, P.; Żukrowski, J.; Przewoźnik, J.; Lemański, A.; Kapusta, C.; Banaś, J. Electrochemical Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles with Controlled Size. *J Nanopart Res*, **2011**, *13*, 7167–7176.
[62] Salazar-Alvarez, G.; Muhammed, M.; Zagorodni, A.A. Novel Flow Injection Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Narrow Size Distribution. *Chemical Engineering Science*, **2006**, *61*, 4625–4633.

[63] Kahil, H.; Faramawy, A.; El-Sayed, H.; Abdel-Sattar, A. Magnetic Properties and SAR for Gadolinium-Doped Iron Oxide Nanoparticles Prepared by Hydrothermal Method. *Crystals*, **2021**, *11*, 1153.

[64] Bertuit, E.; Neveu, S.; Abou-Hassan, A. High Temperature Continuous Flow Syntheses of Iron Oxide Nanoflowers Using the Polyol Route in a Multi-Parametric Millifluidic Device. *Nanomaterials*, **2021**, *12*, 119.

[65] Sciancalepore, C.; Rosa, R.; Barrera, G.; Tiberto, P.; Allia, P.; Bondioli, F. Microwave-Assisted Nonaqueous Sol–Gel Synthesis of Highly Crystalline Magnetite Nanocrystals. *Materials Chemistry and Physics*, **2014**, *148*, 117–124.

[66] Morales, M.P.; Bomati-Miguel, O.; Pérez de Alejo, R.; Ruiz-Cabello, J.; Veintemillas-Verdaguer, S.; O'Grady, K. Contrast Agents for MRI Based on Iron Oxide Nanoparticles Prepared by Laser Pyrolysis. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2003**, *266*, 102–109.

[67] Ali Dheyab, M.; Aziz, A.A.; Jameel, M.S. Recent Advances in Inorganic Nanomaterials Synthesis Using Sonochemistry: A Comprehensive Review on Iron Oxide, Gold and Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles. *Molecules*, **2021**, *26*, 2453.

[68] Karaagac, O.; Kockar, H. Iron Oxide Nanoparticles Co-Precipitated in Air Environment: Effect of [Fe+2]/[Fe+ 3] Ratio. *IEEE transactions on magnetics*, **2012**, *48*, 1532–1536.

[69] Besenhard, M.O.; Panariello, L.; Kiefer, C.; LaGrow, A.P.; Storozhuk, L.; Perton, F.; Begin, S.; Mertz, D.; Thanh, N.T.K.; Gavriilidis, A. Small Iron Oxide Nanoparticles as MRI T_1 Contrast Agent: Scalable Inexpensive Water-Based Synthesis Using a Flow Reactor. *Nanoscale*, **2021**, *13*, 8795–8805.

[70] Saxena, N.; Singh, M. Efficient Synthesis of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles under Air for Biomedical Applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2017**, *429*, 166–176.

[71] Ge, J.; Hu, Y.; Biasini, M.; Dong, C.; Guo, J.; Beyermann, W.P.; Yin, Y. One-Step Synthesis of Highly Water-Soluble Magnetite Colloidal Nanocrystals. *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 7153–7161.

[72] Cheah, P.; Cowan, T.; Zhang, R.; Fatemi-Ardekani, A.; Liu, Y.; Zheng, J.; Han, F.; Li, Y.; Cao, D.; Zhao, Y. Continuous Growth Phenomenon for Direct Synthesis of Monodisperse Water-Soluble Iron Oxide Nanoparticles with Extraordinarily High Relaxivity. *Nanoscale*, **2020**, *12*, 9272–9283.

[73] Liang, Y.-J.; Zhang, Y.; Guo, Z.; Xie, J.; Bai, T.; Zou, J.; Gu, N. Ultrafast Preparation of Monodisperse Fe_3O_4 Nanoparticles by Microwave-Assisted Thermal Decomposition. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 11807–11815.

[74] Sathya, A.; Kalyani, S.; Ranoo, S.; Philip, J. One-Step Microwave-Assisted Synthesis of Water-Dispersible Fe 3 O 4 Magnetic Nanoclusters for Hyperthermia Applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2017**, *439*, 107–113.

[75] Bao, Y.; Sherwood, J.A.; Sun, Z. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles as T_1 Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *J. Mater. Chem. C*, **2018**, *6*, 1280–1290.

[76] Thomas, G.; Demoisson, F.; Boudon, J.; Millot, N. Efficient Functionalization of Magnetite Nanoparticles with Phosphonate Using a One-Step Continuous Hydrothermal Process. *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 10821–10829.

[77] Masthoff, I.-C.; Kraken, M.; Mauch, D.; Menzel, D.; Munevar, J.A.; Baggio Saitovitch, E.; Litterst, F.J.; Garnweitner, G. Study of the Growth Process of Magnetic Nanoparticles Obtained via the Non-Aqueous Sol–Gel Method. *J Mater Sci*, **2014**, *49*, 4705–4714.

[78] Cheah, P.; Qu, J.; Li, Y.; Cao, D.; Zhu, X.; Zhao, Y. The Key Role of Reaction Temperature on a Polyol Synthesis of Water-Dispersible Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2021**, *540*, 168481.

[79] Salvador, M.; Gutiérrez, G.; Noriega, S.; Moyano, A.; Blanco-López, M.C.; Matos, M. Microemulsion Synthesis of Superparamagnetic Nanoparticles for Bioapplications. *IJMS*, **2021**, *22*, 427.

[80] Ramimoghadam, D.; Bagheri, S.; Hamid, S.B.A. Progress in Electrochemical Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2014**, *368*, 207–229.

[81] Suryawanshi, P.L.; Sonawane, S.H.; Bhanvase, B.A.; Ashokkumar, M.; Pimplapure, M.S.; Gogate, P.R. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles in a Continuous Flow Spiral Microreactor and Corning® Advanced Flow™ Reactor. *Green Processing and Synthesis*, **2018**, *7*, 1–11.

[82] Dolores, R.; Raquel, S.; Adianez, G.-L. Sonochemical Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Loaded with Folate and Cisplatin: Effect of Ultrasonic Frequency. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2015**, *23*, 391–398.

[83] Stodt, M.F.B.; Liu, C.; Li, S.; Mädler, L.; Fritsching, U.; Kiefer, J. Phase-Selective Laser–Induced Breakdown Spectroscopy in Flame Spray Pyrolysis for Iron Oxide Nanoparticle Synthesis. *Proceedings of the Combustion Institute*, **2021**, *38*, 1711–1718.

[84] Jolivet, J.-P.; Henry, M.; Livage, J. *Metal Oxide Chemistry and Synthesis: From Solution to Solid State*; Wiley-Blackwell, **2000**.

[85] Besenhard, M.O.; LaGrow, A.P.; Hodzic, A.; Kriechbaum, M.; Panariello, L.; Bais, G.; Loizou, K.; Damilos, S.; Margarida Cruz, M.; Thanh, N.T.K.; Gavriilidis, A. Co-Precipitation Synthesis of Stable Iron Oxide Nanoparticles with NaOH: New Insights and Continuous Production via Flow Chemistry. *Chemical Engineering Journal*, **2020**, *399*, 125740.

[86] Feng, B.; Hong, R.Y.; Wu, Y.J.; Liu, G.H.; Zhong, L.H.; Zheng, Y.; Ding, J.M.; Wei, D.G. Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles via Chitosan–Poly(Acrylic Acid) Template and Their Application in MRI. *Journal of Alloys and Compounds*, **2009**, *473*, 356–362.

[87] Girardet, T.; Cherraj, A.; Pinzano, A.; Henrionnet, C.; Cleymand, F.; Fleutot, S. Study of the Influence of Autoclave Sterilization on the Properties of Citrate Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. *Pure and Applied Chemistry*, **2021**, *93*, 1265–1273.

[88] Ahn, T.; Kim, J.H.; Yang, H.-M.; Lee, J.W.; Kim, J.-D. Formation Pathways of Magnetite Nanoparticles by Coprecipitation Method. *J. Phys. Chem. C*, **2012**, *116*, 6069–6076.

[89] Lefebure, S.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Neveu, S.; Massart, R. Monodisperse Magnetic Nanoparticles: Preparation and Dispersion in Water and Oils. *J. Mater. Res.*, **1998**, *13*, 2975–2981.

[90] Massart, R.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Hasmonay, E. Preparation and Properties of Monodisperse Magnetic Fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **1995**, *149*, 1–5.

[91] Murray, C.B.; Norris, D.J.; Bawendi, M.G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = Sulfur, Selenium, Tellurium) Semiconductor Nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 8706–8715.

[92] Peng, X.; Wickham, J.; Alivisatos, A. Kinetics of II-VI and III-V Colloidal Semiconductor Nanocrystal Growth:"Focusing" of Size Distributions. *Journal of the American Chemical Society*, **1998**, *120*, 5343–5344.

[93] O'Brien, S.; Brus, L.; Murray, C.B. Synthesis of Monodisperse Nanoparticles of Barium Titanate: Toward a Generalized Strategy of Oxide Nanoparticle Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, *123*, 12085–12086.

[94] Sun, S.; Zeng, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 8204–8205.

[95] Qi, B.; Ye, L.; Stone, R.; Dennis, C.; Crawford, T.M.; Mefford, O.T. Influence of Ligand–Precursor Molar Ratio on the Size Evolution of Modifiable Iron Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, **2013**, *117*, 5429–5435.

[96] Lattuada, M.; Hatton, T.A. Functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles. *Langmuir*, **2007**, *23*, 2158–2168.

[97] Liu, X.; Cao, K.; Chen, Y.; Ma, Y.; Zhang, Q.; Zeng, D.; Liu, X.; Wang, L.-S.; Peng, D.-L. Shape-Dependent Magnetic and Microwave Absorption Properties of Iron Oxide Nanocrystals. *Materials Chemistry and Physics*, **2017**, *192*, 339–348.

[98] Cotin, G.; Kiefer, C.; Perton, F.; Ihiawakrim, D.; Blanco-Andujar, C.; Moldovan, S.; Lefevre, C.; Ersen, O.; Pichon, B.; Mertz, D.; Bégin-Colin, S. Unravelling the Thermal Decomposition Parameters for The Synthesis of Anisotropic Iron Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials*, **2018**, *8*, 881.

[99] Yu, W.W.; Falkner, J.C.; Yavuz, C.T.; Colvin, V.L. Synthesis of Monodisperse Iron Oxide Nanocrystals by Thermal Decomposition of Iron Carboxylate Salts. *Chem. Commun.*, **2004**, 2306.

[100] Baaziz, W.; Pichon, B.P.; Grenèche, J.-M.; Begin-Colin, S. Effect of Reaction Environment and *in Situ* Formation of the Precursor on the Composition and Shape of Iron Oxide Nanoparticles Synthesized by the Thermal Decomposition Method. *CrystEngComm*, **2018**, *20*, 7206–7220.

[101] Perton, F.; Cotin, G.; Kiefer, C.; Strub, J.-M.; Cianferani, S.; Greneche, J.-M.; Parizel, N.; Heinrich, B.; Pichon, B.; Mertz, D.; Begin-Colin, S. Iron Stearate Structures: An Original Tool for Nanoparticles Design. *Inorg. Chem.*, **2021**, *60*, 12445–12456.

[102] Jani, K.; Kaushal, N.; Sadoqi, M.; Long, G.; Chen, Z.-S.; Squillante, E. Formulation and Characterization of Oleic Acid Magnetic PEG PLGA Nanoparticles for Targeting Glioblastoma Multiforme. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2021**, *533*, 167970.

[103] Zhu, Y.; Jiang, F.Y.; Chen, K.; Kang, F.; Tang, Z.K. Size-Controlled Synthesis of Monodisperse Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, **2011**, *509*, 8549–8553.

[104] Kwon, S.G.; Piao, Y.; Park, J.; Angappane, S.; Jo, Y.; Hwang, N.-M.; Park, J.-G.; Hyeon, T. Kinetics of Monodisperse Iron Oxide Nanocrystal Formation by "Heating-Up" Process. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 12571–12584.

[105] Herman, D.A.J.; Ferguson, P.; Cheong, S.; Hermans, I.F.; Ruck, B.J.; Allan, K.M.; Prabakar, S.; Spencer, J.L.; Lendrum, C.D.; Tilley, Richard.D. Hot-Injection Synthesis of Iron/Iron Oxide Core/Shell Nanoparticles for T2 Contrast Enhancement in Magnetic Resonance Imaging. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 9221.

[106] Masur, S.; Zingsem, B.; Marzi, T.; Meckenstock, R.; Farle, M. Characterization of the Oleic Acid/Iron Oxide Nanoparticle Interface by Magnetic Resonance. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2016**, *415*, 8–12.

[107] Goroncy, C.; Saloga, P.E.J.; Gruner, M.; Schmudde, M.; Vonnemann, J.; Otero, E.; Haag, R.; Graf, C. Influence of Organic Ligands on the Surface Oxidation State and Magnetic Properties of Iron Oxide Particles. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **2018**, *232*, 819–844.

[108] Wood, M.H.; Welbourn, R.J.L.; Charlton, T.; Zarbakhsh, A.; Casford, M.T.; Clarke, S.M. Hexadecylamine Adsorption at the Iron Oxide–Oil Interface. *Langmuir*, **2013**, *29*, 13735–13742.

[109] Reyes-Ortega, F.; Delgado, Á.; Iglesias, G. Modulation of the Magnetic Hyperthermia Response Using Different Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Morphologies. *Nanomaterials*, **2021**, *11*, 627.

[110] Narnaware, P.K.; Ravikumar, C. Influence of Solvents, Reaction Temperature, and Aging Time on the Morphology of Iron Oxide Nanoparticles. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, **2022**, *52*, 922–936.

[111] Xu, Z.; Shen, C.; Hou, Y.; Gao, H.; Sun, S. Oleylamine as Both Reducing Agent and Stabilizer in a Facile Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Chem. Mater.*, **2009**, *21*, 1778–1780.

[112] Mourdikoudis, S.; Liz-Marzán, L.M. Oleylamine in Nanoparticle Synthesis. *Chem. Mater.*, **2013**, *25*, 1465–1476.

[113] Jun, Y.; Choi, J.; Cheon, J. Shape Control of Semiconductor and Metal Oxide Nanocrystals through Nonhydrolytic Colloidal Routes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 3414–3439.

[114] Alipour, A.; Soran-Erdem, Z.; Utkur, M.; Sharma, V.K.; Algin, O.; Saritas, E.U.; Demir, H.V. A New Class of Cubic SPIONs as a Dual-Mode T1 and T2 Contrast Agent for MRI. *Magnetic Resonance Imaging*, **2018**, *49*, 16–24.

[115] Bronstein, L.M.; Atkinson, J.E.; Malyutin, A.G.; Kidwai, F.; Stein, B.D.; Morgan, D.G.; Perry, J.M.; Karty, J.A. Nanoparticles by Decomposition of Long Chain Iron Carboxylates: From Spheres to Stars and Cubes. *Langmuir*, **2011**, *27*, 3044–3050.

[116] Roca, A.G.; Gutiérrez, L.; Gavilán, H.; Fortes Brollo, M.E.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Morales, M. del P. Design Strategies for Shape-Controlled Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2019**, *138*, 68–104.

[117] Monnier, C.A.; Lattuada, M.; Burnand, D.; Crippa, F.; Martinez-Garcia, J.C.; Hirt, A.M.; Rothen-Rutishauser, B.; Bonmarin, M.; Petri-Fink, A. A Lock-in-Based Method to Examine the Thermal Signatures of Magnetic Nanoparticles in the Liquid, Solid and Aggregated States. *Nanoscale*, **2016**, *8*, 13321–13332.

[118] Crippa, F.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hua, X.; Goris, B.; Bals, S.; Garitaonandia, J.S.; Balog, S.; Burnand, D.; Hirt, A.M.; Haeni, L.; Lattuada, M.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Phase Transformation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles via Thermal Annealing: Implications for Hyperthermia Applications. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2019**, *2*, 4462–4470.

[119] Cai, J.; Miao, Y.Q.; Yu, B.Z.; Ma, P.; Li, L.; Fan, H.M. Large-Scale, Facile Transfer of Oleic Acid-Stabilized Iron Oxide Nanoparticles to the Aqueous Phase for Biological Applications. *Langmuir*, **2017**, *33*, 1662–1669.

[120] Lam, T.; Avti, P.; Pouliot, P.; Maafi, F.; Tardif, J.-C.; Rhéaume, É.; Lesage, F.; Kakkar, A. Fabricating Water Dispersible Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications through Ligand Exchange and Direct Conjugation. *Nanomaterials*, **2016**, *6*, 100.

[121] Guadalupe Valverde Aguilar ED1 - Guadalupe Valverde Aguilar. Introductory Chapter: A Brief Semblance of the Sol-Gel Method in Research. In *Sol-Gel Method*; IntechOpen: Rijeka, **2018**; p. Ch. 1.

[122] Akkurt, N.; Altan, C.L.; Sarac, M.F. Continuous Flow–Assisted Polyol Synthesis of Citric Acid Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, **2022**, *35*, 615–623.

[123] Xu, Y.; Zhuang, L.; Lin, H.; Shen, H.; Li, J.W. Preparation and Characterization of Polyacrylic Acid Coated Magnetite Nanoparticles Functionalized with Amino Acids. *Thin Solid Films*, **2013**, *544*, 368–373.

[124] Nayeem, J.; Al-Bari, Md.A.A.; Mahiuddin, Md.; Rahman, Md.A.; Mefford, O.T.; Ahmad, H.; Rahman, Md.M. Silica Coating of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles by Reverse Microemulsion Method and Their Functionalization with Cationic Polymer P(NIPAm-Co-AMPTMA) for Antibacterial Vancomycin Immobilization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2021**, *611*, 125857.

[125] Pascal, C.; Pascal, J.L.; Favier, F.; Elidrissi Moubtassim, M.L.; Payen, C. Electrochemical Synthesis for the Control of γ-Fe2O3 Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. *Chem. Mater.*, **1999**, *11*, 141–147.

[126] Cabrera, L.; Gutierrez, S.; Menendez, N.; Morales, M.P.; Herrasti, P. Magnetite Nanoparticles: Electrochemical Synthesis and Characterization. *Electrochimica Acta*, **2008**, *53*, 3436–3441.

[127] Karimzadeh, I.; Aghazadeh, M.; Doroudi, T.; Ganjali, M.R.; Kolivand, P.H. Electrochemical Preparation and Characterization of Chitosan-Coated Superparamagnetic Iron Oxide (Fe_3O_4) Nanoparticles. *Materials Research Innovations*, **2017**, 1–9.

[128] Hee Kim, E.; Sook Lee, H.; Kook Kwak, B.; Kim, B.-K. Synthesis of Ferrofluid with Magnetic Nanoparticles by Sonochemical Method for MRI Contrast Agent. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2005**, *289*, 328–330.

[129] Abbas, M.; Takahashi, M.; Kim, C. Facile Sonochemical Synthesis of High-Moment Magnetite (Fe3O4) Nanocube. *J Nanopart Res*, **2013**, *15*, 1354.

[130] Fazio, E.; Santoro, M.; Lentini, G.; Franco, D.; Guglielmino, S.P.P.; Neri, F. Iron Oxide Nanoparticles Prepared by Laser Ablation: Synthesis, Structural Properties and Antimicrobial Activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2016**, *490*, 98–103.

[131] Majctich, G. Application of Commercial Microwave Ovens to Organic Synthesis. 4.

[132] Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. The Use of Microwave Ovens for Rapid Organic Synthesis. *Tetrahedron Letters*, **1986**, *27*, 279–282.

[133] Kappe, C.O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6250–6284.

[134] Nüchter, M.; Ondruschka, B.; Bonrath, W.; Gum, A. Microwave Assisted Synthesis – a Critical Technology Overview. *Green Chem.*, **2004**, *6*, 128–141.

[135] Liao, X.; Zhu, J.; Zhong, W.; Chen, H.-Y. Synthesis of Amorphous Fe2O3 Nanoparticles by Microwave Irradiation. *Materials Letters*, **2001**, *50*, 341–346.

[136] LidstroÈm, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. Microwave Assisted Organic Synthesis a Review. **2001**, 59.

[137] Mingos, D.; Baghurst, D. Microwave-Assisted Reactions and Processes. *Chem. Soc. Rev*, **1991**, *20*, 1–47.
[138] Kappe, C.O.; Stadler, A.; Dallinger, D. *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*; John Wiley & Sons, **2012**; Vol. 52.
[139] Kingston, H.M.; Jassie, L.B. *Introduction to Microwave Sample Preparation*; American Chemical Society, **1988**.
[140] Gabriel, C.; Gabriel, S.; H. Grant, E.; H. Grant, E.; S. J. Halstead, B.; Michael P. Mingos, D. Dielectric Parameters Relevant to Microwave Dielectric Heating. *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, *27*, 213.
[141] Metaxas, A.; Meredith, R. Engineers' Handbook of Industrial Microwave Heating. *London: Peter Peregrinus*, **1988**, *8*.
[142] Bogdal, D.; Prociak, A. Microwave-Enhanced Polymer Chemistry and Technology. **2007**.
[143] Gawande, M.B.; Shelke, S.N.; Zboril, R.; Varma, R.S. Microwave-Assisted Chemistry: Synthetic Applications for Rapid Assembly of Nanomaterials and Organics. *Account of chemical research*, **2014**, 1338–1348.
[144] Schanche, J.-S. Microwave Synthesis Solutions from Personal Chemistry. *Mol Divers*, **2003**, *7*, 291–298.
[145] Obermayer, D.; Znidar, D.; Glotz, G.; Stadler, A.; Dallinger, D.; Kappe, C.O. Design and Performance Validation of a Conductively Heated Sealed-Vessel Reactor for Organic Synthesis. *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 11788–11801.
[146] Baghbanzadeh, M.; Carbone, L.; Cozzoli, P.D.; Kappe, C.O. Microwave-Assisted Synthesis of Colloidal Inorganic Nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 11312–11359.
[147] Dufour, F.; Cassaignon, S.; Durupthy, O.; Colbeau-Justin, C.; Chanéac, C. Do TiO_2 Nanoparticles Really Taste Better When Cooked in a Microwave Oven? *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, *2012*, 2707–2715.
[148] Thostenson, E.T.; Chou, T.-W. Microwave Processing: Fundamentals and Applications. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, **1999**, *30*, 1055–1071.
[149] Poux, M.; Estel, L.; Len, C. Micro-ondes en synthèse organique. *Chimie verte*, **2016**.
[150] Kremsner, J.M.; Stadler, A. *A Chemist's Guide to Microwave Synthesis*; 3ème édition.; Anton Paar, **2018**.
[151] Kowalczyk, B.; Lagzi, I.; Grzybowski, B.A. Nanoseparations: Strategies for Size and/or Shape-Selective Purification of Nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2011**, *16*, 135–148.
[152] Solodov, A.N.; Shayimova, J.R.; Burilova, E.A.; Shurtakova, D.V.; Zhuravleva, Y.I.; Cherosov, M.A.; Tian, Y.; Kiiamov, A.G.; Amirov, R.R. Understanding the Nucleation and Growth of Iron Oxide Nanoparticle Formation by a "Heating-Up" Process: An NMR Relaxation Study. *J. Phys. Chem. C*, **2021**, *125*, 20980–20992.
[153] Li, P.; Kumar, A.; Ma, J.; Kuang, Y.; Luo, L.; Sun, X. Density Gradient Ultracentrifugation for Colloidal Nanostructures Separation and Investigation. *Science Bulletin*, **2018**, *63*, 645–662.
[154] Qi, X.; Li, M.; Kuang, Y.; Wang, C.; Cai, Z.; Zhang, J.; You, S.; Yin, M.; Wan, P.; Luo, L.; Sun, X. Controllable Assembly and Separation of Colloidal Nanoparticles through a One-Tube Synthesis Based on Density Gradient Centrifugation. *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 7211–7216.
[155] Qiu, P.; Mao, C. Viscosity Gradient as a Novel Mechanism for the Centrifugation-Based Separation of Nanoparticles. *Adv. Mater.*, **2011**, *23*, 4880–4885.
[156] Gravelsins, S.; Dhirani, A.-A. A Rapid, High Yield Size-Selective Precipitation Method for Generating Au Nanoparticles in Organic Solvents with Tunably Monodisperse Size Distributions and Replaceable Ligands. *RSC Adv.*, **2017**, *7*, 55830–55834.
[157] Seo, E.Y.; Cheong, Y.W.; Yim, G.J.; Min, K.W.; Geroni, J.N. Recovery of Fe, Al and Mn in Acid Coal Mine Drainage by Sequential Selective Precipitation with Control of PH. *CATENA*, **2017**, *148*, 11–16.
[158] Snoswell, D.R.E.; Duan, J.; Fornasiero, D.; Ralston, J. The Selective Aggregation and Separation of Titania from a Mixed Suspension of Silica and Titania. *International Journal of Mineral Processing*, **2005**, *78*, 1–10.

[159] Tovstun, S.A.; Razumov, V.F. Theory of Size-Selective Precipitation. *J Nanopart Res*, **2017**, *19*, 8.

[160] Stanicki, D.; Larbanoix, L.; Boutry, S.; Vangijzegem, T.; Ternad, I.; Garifo, S.; Muller, R.N.; Laurent, S. Impact of the Chain Length on the Biodistribution Profiles of PEGylated Iron Oxide Nanoparticles: A Multimodal Imaging Study. *J. Mater. Chem. B*, **2021**, *9*, 5055–5068.

[161] Kalsoom, U.; Ahsan, Z.; Bhatti, H.N.; Amin, F.; Nadeem, R.; Aftab, K.; Bilal, M. Iron Oxide Nanoparticles Immobilized Aspergillus Flavus Manganese Peroxidase with Improved Biocatalytic, Kinetic, Thermodynamic, and Dye Degradation Potentialities. *Process Biochemistry*, **2022**, *117*, 117–133.

[162] Lassenberger, A.; Bixner, O.; Gruenewald, T.; Lichtenegger, H.; Zirbs, R.; Reimhult, E. Evaluation of High-Yield Purification Methods on Monodisperse PEG-Grafted Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir*, **2016**, *32*, 4259–4269.

[163] Mireles, L.-K.; Sacher, E.; Yahia, L.; Laurent, S.; Stanicki, D. Washing Effect on Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Data in Brief*, **2016**, *7*, 1296–1301.

[164] Zaloga, J.; Stapf, M.; Nowak, J.; Pöttler, M.; Friedrich, R.; Tietze, R.; Lyer, S.; Lee, G.; Odenbach, S.; Hilger, I.; Alexiou, C. Tangential Flow Ultrafiltration Allows Purification and Concentration of Lauric Acid-/Albumin-Coated Particles for Improved Magnetic Treatment. *IJMS*, **2015**, *16*, 19291–19307.

[165] Babes, L.; Denizot, B.; Tanguy, G.; Le Jeune, J.J.; Jallet, P. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1999**, *212*, 474–482.

[166] Beaudry, J.W.; Sengupta, S. Phosphorus Recovery from Wastewater Using Pyridine-based Ion-exchange Resins: Role of Impregnated Iron Oxide Nanoparticles and Preloaded Lewis Acid (Cu^{2+}). *Water Environment Research*, **2021**, *93*, 774–786.

[167] Wiogo, H.T.R.; Lim, M.; Bulmus, V.; Yun, J.; Amal, R. Stabilization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Biological Media by Fetal Bovine Serum (FBS). *Langmuir*, **2011**, *27*, 843–850.

[168] Mühlberger, M.; Janko, C.; Unterweger, H.; Band, J.; Schreiber, E.; Lehmann, C.; Dudziak, D.; Lee, G.; Alexiou, C.; Tietze, R. Non-Magnetic Chromatographic Separation of Colloidally Metastable Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Suspension Cells. *Journal of Chromatography B*, **2019**, *1122–1123*, 83–89.

[169] Guo, H.; Barnard, A.S. Naturally Occurring Iron Oxide Nanoparticles: Morphology, Surface Chemistry and Environmental Stability. *J. Mater. Chem. A*, **2013**, *1*, 27–42.

[170] Voinov, M.A.; Pagán, J.O.S.; Morrison, E.; Smirnova, T.I.; Smirnov, A.I. Surface-Mediated Production of Hydroxyl Radicals as a Mechanism of Iron Oxide Nanoparticle Biotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 35–41.

[171] Berg, J.M.; Romoser, A.; Banerjee, N.; Zebda, R.; Sayes, C.M. The Relationship between PH and Zeta Potential Of∼ 30 Nm Metal Oxide Nanoparticle Suspensions Relevant to in Vitro Toxicological Evaluations. *Nanotoxicology*, **2009**, *3*, 276–283.

[172] Favela-Camacho, S.E.; Samaniego-Benítez, E.J.; Godínez-García, A.; Avilés-Arellano, L.Ma.; Pérez-Robles, J.F. How to Decrease the Agglomeration of Magnetite Nanoparticles and Increase Their Stability Using Surface Properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2019**, *574*, 29–35.

[173] Li, Y.; Qi, L.; Shen, Y.; Ma, H. Facile Preparation of Surface-Exchangeable Core@shell Iron Oxide@gold Nanoparticles for Magnetic Solid-Phase Extraction: Use of Gold Shell as the Intermediate Platform for Versatile Adsorbents with Varying Self-Assembled Monolayers. *Analytica Chimica Acta*, **2014**, *811*, 36–42.

[174] Fenton, H.J.H. Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, **1894**, *65*, 899–910.

[175] Marquis, B.J.; Love, S.A.; Braun, K.L.; Haynes, C.L. Analytical Methods to Assess Nanoparticle Toxicity. **2009**, 15.

[176] Petters, C.; Irrsack, E.; Koch, M.; Dringen, R. Uptake and Metabolism of Iron Oxide Nanoparticles in Brain Cells. *Neurochem Res*, 13.

[177] Derjaguin, B.; Landau, L. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. *Progress in Surface Science*, **1993**, *43*, 30–59.

[178] Verwey, E.J.W. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *The Journal of Physical Chemistry*, **1947**, *51*, 631–636.

[179] Li, Q.; Jonas, U.; Zhao, X.S.; Kappl, M. The Forces at Work in Colloidal Self-Assembly: A Review on Fundamental Interactions between Colloidal Particles. *Asia-Pacific Jrnl of Chem. Eng*, **2008**, *3*, 255–268.

[180] Stern, O. Zur Theorie Der Elektrolytischen Doppelschicht. *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie*, **1924**, *30*, 508–516.

[181] Wu, L.; Zhang, J.; Watanabe, W. Physical and Chemical Stability of Drug Nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2011**, *63*, 456–469.

[182] Islam, A.M.; Chowdhry, B.Z. Heteroaggregation in Colloidal Dispersions. 28.

[183] Li, W.; Liu, D.; Wu, J.; Kim, C.; Fortner, J.D. Aqueous Aggregation and Surface Deposition Processes of Engineered Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Environmental Applications. 17.

[184] Sawisai, R.; Wanchanthuek, R.; Radchatawedchakoon, W.; Sakee, U. Simple Continuous Flow Synthesis of Linoleic and Palmitic Acid-Coated Magnetite Nanoparticles. *Surfaces and Interfaces*, **2019**, *17*, 100344.

[185] Kottana, R.K.; Maurizi, L.; Schnoor, B.; Morris, K.; Webb, J.A.; Massiah, M.A.; Millot, N.; Papa, A. Anti-Platelet Effect Induced by Iron Oxide Nanoparticles: Correlation with Conformational Change in Fibrinogen. *Small*, **2021**, *17*, 2004945.

[186] Pimpha, N.; Woramongkolchai, N.; Sunintaboon, P.; Saengkrit, N. Recyclable Iron Oxide Loaded Poly (Methyl Methacrylate) Core/Polyethyleneimine Shell Nanoparticle as Antimicrobial Nanomaterial for Zoonotic Pathogen Controls. *J Clust Sci*, **2022**, *33*, 567–577.

[187] Park, Y.C.; Paulsen, J.; Nap, R.J.; Whitaker, R.D.; Mathiyazhagan, V.; Song, Y.-Q.; Hürlimann, M.; Szleifer, I.; Wong, J.Y. Adsorption of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Silica and Calcium Carbonate Sand. *Langmuir*, **2014**, *30*, 784–792.

[188] Yakasai, F.; Jaafar, M.Z.; Bandyopadhyay, S.; Agi, A.; Sidek, M.A. Application of Iron Oxide Nanoparticles in Oil Recovery – A Critical Review of the Properties, Formulation, Recent Advances and Prospects. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **2022**, *208*, 109438.

[189] Chakraborty, S.; Panigrahi, P.K. Stability of Nanofluid: A Review. *Applied Thermal Engineering*, **2020**, *174*, 115259.

[190] Hola, K.; Markova, Z.; Zoppellaro, G.; Tucek, J.; Zboril, R. Tailored Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles for MRI, Drug Delivery, Magnetic Separation and Immobilization of Biosubstances. *Biotechnology Advances*, **2015**, *33*, 1162–1176.

[191] Anbarasu, M.; Anandan, M.; Chinnasamy, E.; Gopinath, V.; Balamurugan, K. Synthesis and Characterization of Polyethylene Glycol (PEG) Coated Fe3O4 Nanoparticles by Chemical Co-Precipitation Method for Biomedical Applications. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2015**, *135*, 536–539.

[192] Ohannesian, N.; De Leo, C.T.; Martirosyan, K.S. Dextran Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Produced by Microfluidic Process. *Materials Today: Proceedings*, **2019**, *13*, 397–403.

[193] Predescu, A.M.; Matei, E.; Berbecaru, A.C.; Pantilimon, C.; Drăgan, C.; Vidu, R.; Predescu, C.; Kuncser, V. Synthesis and Characterization of Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *R. Soc. open sci.*, **2018**, *5*, 171525.

[194] Li, L.; Mak, K.; Shi, J.; Leung, C.; Wong, C.; Leung, C.W.; Mak, C.; Chan, K.; Chan, N.; Wu, E. Sterilization on Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles: Effects of Autoclaving, Filtration, UV Irradiation, and Ethanol Treatment. *Microelectronic engineering*, **2013**, *111*, 310–313.

[195] Schleich, N.; Sibret, P.; Danhier, P.; Ucakar, B.; Laurent, S.; Muller, R.N.; Jérôme, C.; Gallez, B.; Préat, V.; Danhier, F. Dual Anticancer Drug/Superparamagnetic Iron Oxide-Loaded PLGA-Based

Nanoparticles for Cancer Therapy and Magnetic Resonance Imaging. *International Journal of Pharmaceutics*, **2013**, *447*, 94–101.

[196] Padmavathy, N.; Chakraborty, I.; Kumar, A.; Roy, A.; Bose, S.; Chatterjee, K. Fe_3O_4 @Ag and Ag@Fe_3O_4 Core–Shell Nanoparticles for Radiofrequency Shielding and Bactericidal Activity. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2022**, *5*, 237–248.

[197] Kang, N.; Xu, D.; Han, Y.; Lv, X.; Chen, Z.; Zhou, T.; Ren, L.; Zhou, X. Magnetic Targeting Core/Shell Fe3O4/Au Nanoparticles for Magnetic Resonance/Photoacoustic Dual-Modal Imaging. *Materials Science and Engineering: C*, **2019**, *98*, 545–549.

[198] Nasiri, R.; Dabagh, S.; Meamar, R.; Idris, A.; Muhammad, I.; Irfan, M.; Rashidi Nodeh, H. Papain Grafted into the Silica Coated Iron-Based Magnetic Nanoparticles 'IONPs@SiO_2 -PPN' as a New Delivery Vehicle to the HeLa Cells. *Nanotechnology*, **2020**, *31*, 195603.

[199] Hu, F.; Jia, Q.; Li, Y.; Gao, M. Facile Synthesis of Ultrasmall PEGylated Iron Oxide Nanoparticles for Dual-Contrast T_1 - and T_2 -Weighted Magnetic Resonance Imaging. *Nanotechnology*, **2011**, *22*, 245604.

[200] Mahin, J.; Franck, C.O.; Fanslau, L.; Patra, H.K.; Mantle, M.D.; Fruk, L.; Torrente-Murciano, L. Green, Scalable, Low Cost and Reproducible Flow Synthesis of Biocompatible PEG-Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. *React. Chem. Eng.*, **2021**, *6*, 1961–1973.

[201] Segers, F.M.E.; Ruder, A.V.; Westra, M.M.; Lammers, T.; Dadfar, S.M.; Roemhild, K.; Lam, T.S.; Kooi, M.E.; Cleutjens, K.B.J.M.; Verheyen, F.K.; Schurink, G.W.H.; Haenen, G.R.; van Berkel, T.J.C.; Bot, I.; Halvorsen, B.; Sluimer, J.C.; Biessen, E.A.L. Magnetic Resonance Imaging Contrast-Enhancement with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Amplifies Macrophage Foam Cell Apoptosis in Human and Murine Atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, **2022**, cvac032.

[202] Granath, T.; Mandel, K.; Löbmann, P. The Significant Influence of the PH Value on Citrate Coordination upon Modification of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Part & Part Syst Charact*, **2022**, *39*, 2100279.

[203] Development of Synthesis Method of Magnetic Nanoparticles Modified by Oleic Acid and Chitosan as a Candidate for Drug Delivery Agent. *J App Pharm Sci*, **2019**, *9*, 1–11.

[204] Na, H.B.; Palui, G.; Rosenberg, J.T.; Ji, X.; Grant, S.C.; Mattoussi, H. Multidentate Catechol-Based Polyethylene Glycol Oligomers Provide Enhanced Stability and Biocompatibility to Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Nano*, **2012**, *6*, 389–399.

[205] Pozo-Torres, E.; Caro, C.; Avasthi, A.; Páez-Muñoz, J.M.; García-Martín, M.L.; Fernández, I.; Pernia Leal, M. Clickable Iron Oxide NPs Based on Catechol Derived Ligands: Synthesis and Characterization. *Soft Matter*, **2020**, *16*, 3257–3266.

[206] Gupta, A.K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials*, **2005**, *26*, 3995–4021.

[207] Fernández-Barahona, I.; Muñoz-Hernando, M.; Ruiz-Cabello, J.; Herranz, F.; Pellico, J. Iron Oxide Nanoparticles: An Alternative for Positive Contrast in Magnetic Resonance Imaging. **2020**, 23.

[208] Pellico, J.; Ruiz-Cabello, J.; Fernández-Barahona, I.; Gutiérrez, L.; Lechuga-Vieco, A.V.; Enríquez, J.A.; Morales, M.P.; Herranz, F. One-Step Fast Synthesis of Nanoparticles for MRI: Coating Chemistry as the Key Variable Determining Positive or Negative Contrast. **2017**, 9.

[209] Fiume, M.M.; Heldreth, B.A.; Bergfeld, W.F.; Belsito, D.V.; Hill, R.A.; Klaassen, C.D.; Liebler, D.C.; Marks, J.G.; Shank, R.C.; Slaga, T.J.; Snyder, P.W.; Andersen, F.A. Safety Assessment of Citric Acid, Inorganic Citrate Salts, and Alkyl Citrate Esters as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol*, **2014**, *33*, 16S-46S.

[210] Krebs, H.A. The History of the Tricarboxylic Acid Cycle. *Perspectives in Biology and Medicine*, **1970**, *14*, 154–172.

[211] Venturini, P.; Fleutot, S.; Cleymand, F.; Hauet, T.; Dupin, J.; Ghanbaja, J.; Martinez, H.; Robin, J.; Lapinte, V. Facile One-Step Synthesis of Polyoxazoline-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *ChemistrySelect*, **2018**, *3*, 11898–11901.

[212] Gould, P. Nanomagnetism Shows in Vivo Potential. *Nano Today*, **2006**, *1*, 34–39.

[213] Israel, L.L.; Galstyan, A.; Holler, E.; Ljubimova, J.Y. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Imaging, Targeting and Treatment of Primary and Metastatic Tumors of the Brain. *Journal of Controlled Release*, **2020**, *320*, 45–62.

[214] Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Milani, A.S.; Stroeve, P. Cell Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2009**, *336*, 510–518.

[215] Modi, S.; M. G., S.; Goswami, D.; Gupta, G.D.; Mayor, S.; Krishnan, Y. A DNA Nanomachine That Maps Spatial and Temporal PH Changes inside Living Cells. *Nature Nanotech*, **2009**, *4*, 325–330.

[216] Cooper, G.M.; Hausman, R.E.; Hausman, R.E. *The Cell: A Molecular Approach*; 7ème édition.; ASM press Washington, DC, **2015**; Vol. 4.

[217] Kumar, C.S.S.R.; Mohammad, F. Magnetic Nanomaterials for Hyperthermia-Based Therapy and Controlled Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2011**, *63*, 789–808.

[218] Deatsch, A.E.; Evans, B.A. Heating Efficiency in Magnetic Nanoparticle Hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2014**, *354*, 163–172.

[219] Issels, R.; Kampmann, E.; Kanaar, R.; Lindner, L.H. Hallmarks of Hyperthermia in Driving the Future of Clinical Hyperthermia as Targeted Therapy: Translation into Clinical Application. *International Journal of Hyperthermia*, **2016**, *32*, 89–95.

[220] Gilchrist, R.K.; Medal, R.; Shorey, W.D.; Hanselman, R.C.; Parrott, J.C.; Taylor, C.B. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes: *Annals of Surgery*, **1957**, *146*, 596–606.

[221] Jordan, A.; Scholz, R.; Maier-Hau, K.; Johannsen, M.; Wust, P.; Nadobny, J.; Schirra, H.; Schmidt, H.; Deger, S.; Loening, S.; Lanksch, W.; Felix, R. Presentation of a New Magnetic Field Therapy System for the Treatment of Human Solid Tumors with Magnetic Fluid Hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2001**, 9.

[222] Abenojar, E.C.; Wickramasinghe, S.; Bas-Concepcion, J.; Samia, A.C.S. Structural Effects on the Magnetic Hyperthermia Properties of Iron Oxide Nanoparticles. *Progress in Natural Science: Materials International*, **2016**, *26*, 440–448.

[223] Nemati, Z.; Alonso, J.; Rodrigo, I.; Das, R.; Garaio, E.; García, J.Á.; Orue, I.; Phan, M.-H.; Srikanth, H. Improving the Heating Efficiency of Iron Oxide Nanoparticles by Tuning Their Shape and Size. *J. Phys. Chem. C*, **2018**, *122*, 2367–2381.

[224] Hergt, R.; Dutz, S. Magnetic Particle Hyperthermia—Biophysical Limitations of a Visionary Tumour Therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2007**, *311*, 187–192.

[225] Lacroix, L.-M.; Lachaize, S.; Carrey, J.; Respaud, M. Les nanoparticules de fer de taille contrôlée. 8.

[226] Magro, M.; Campos, R.; Baratella, D.; Lima, G.; Holà, K.; Divoky, C.; Stollberger, R.; Malina, O.; Aparicio, C.; Zoppellaro, G.; Zbořil, R.; Vianello, F. A Magnetically Drivable Nanovehicle for Curcumin with Antioxidant Capacity and MRI Relaxation Properties. *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 11913–11920.

[227] Jaiswal, M.K.; Gogoi, M.; Dev Sarma, H.; Banerjee, R.; Bahadur, D. Biocompatibility, Biodistribution and Efficacy of Magnetic Nanohydrogels in Inhibiting Growth of Tumors in Experimental Mice Models. *Biomater. Sci.*, **2014**, *2*, 370–380.

[228] Scialabba, C.; Licciardi, M.; Mauro, N.; Rocco, F.; Ceruti, M.; Giammona, G. Inulin-Based Polymer Coated SPIONs as Potential Drug Delivery Systems for Targeted Cancer Therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2014**, *88*, 695–705.

[229] Dadfar, S.M.; Roemhild, K.; Drude, N.I.; von Stillfried, S.; Knüchel, R.; Kiessling, F.; Lammers, T. Iron Oxide Nanoparticles: Diagnostic, Therapeutic and Theranostic Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2019**, *138*, 302–325.

[230] Lim, E.-K.; Huh, Y.-M.; Yang, J.; Lee, K.; Suh, J.-S.; Haam, S. PH-Triggered Drug-Releasing Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy Guided by Molecular Imaging by MRI. *Adv. Mater.*, **2011**, *23*, 2436–2442.

[231] Li, K.; Nejadnik, H.; Daldrup-Link, H.E. Next-Generation Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cancer Theranostics. *Drug Discovery Today*, **2017**, *22*, 1421–1429.

[232] Wang, H.; Yi, J.; Mukherjee, S.; Banerjee, P.; Zhou, S. Magnetic/NIR-Thermally Responsive Hybrid Nanogels for Optical Temperature Sensing, Tumor Cell Imaging and Triggered Drug Release. *Nanoscale*, **2014**, *6*, 13001–13011.

[233] Vangijzegem, T.; Stanicki, D.; Laurent, S. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Drug Delivery: Applications and Characteristics. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2019**, *16*, 69–78.

[234] Zhuo, Z.; Wang, J.; Luo, Y.; Zeng, R.; Zhang, C.; Zhou, W.; Guo, K.; Wu, H.; Sha, W.; Chen, H. Targeted Extracellular Vesicle Delivery Systems Employing Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, **2021**, *134*, 13–31.

[235] Chen, L.; Wu, Y.; Wu, H.; Li, J.; Xie, J.; Zang, F.; Ma, M.; Gu, N.; Zhang, Y. Magnetic Targeting Combined with Active Targeting of Dual-Ligand Iron Oxide Nanoprobes to Promote the Penetration Depth in Tumors for Effective Magnetic Resonance Imaging and Hyperthermia. *Acta Biomaterialia*, **2019**, *96*, 491–504.

[236] Soleymani, M.; Velashjerdi, M.; Shaterabadi, Z.; Barati, A. One-Pot Preparation of Hyaluronic Acid-coated Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Therapy and Targeting CD44-Overexpressing Cancer Cells. *Carbohydrate polymers*, **2020**, *237*, 116130.

[237] Tay, Z.W.; Chandrasekharan, P.; Chiu-Lam, A.; Hensley, D.W.; Dhavalikar, R.; Zhou, X.Y.; Yu, E.Y.; Goodwill, P.W.; Zheng, B.; Rinaldi, C.; Conolly, S.M. Magnetic Particle Imaging-Guided Heating *in Vivo* Using Gradient Fields for Arbitrary Localization of Magnetic Hyperthermia Therapy. *ACS Nano*, **2018**, *12*, 3699–3713.

[238] Weissleder, R.; Pittet, M.J. Imaging in the Era of Molecular Oncology. *Nature*, **2008**, *452*, 580–589.

[239] Lee, D.-E.; Koo, H.; Sun, I.-C.; Ryu, J.H.; Kim, K.; Kwon, I.C. Multifunctional Nanoparticles for Multimodal Imaging and Theragnosis. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 2656–2672.

[240] Jin, R.; Lin, B.; Li, D.; Ai, H. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for MR Imaging and Therapy: Design Considerations and Clinical Applications. *Current Opinion in Pharmacology*, **2014**, *18*, 18–27.

[241] Ward, J. Use of Contrast Agents for Liver MRI. *Radiography*, **2007**, *13*, e54–e72.

[242] Tysiak, E.; Asbach, P.; Aktas, O.; Waiczies, H.; Smyth, M.; Schnorr, J.; Taupitz, M.; Wuerfel, J. Beyond Blood Brain Barrier Breakdown–in Vivodetection of Occult Neuroinflammatory Foci by Magnetic Nanoparticles in High Field MRI. *Journal of Neuroinflammation*, **2009**, *6*, 1–8.

[243] Varallyay, C.G.; Nesbit, E.; Fu, R.; Gahramanov, S.; Moloney, B.; Earl, E.; Muldoon, L.L.; Li, X.; Rooney, W.D.; Neuwelt, E.A. High-Resolution Steady-State Cerebral Blood Volume Maps in Patients with Central Nervous System Neoplasms Using Ferumoxytol, a Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle. *J Cereb Blood Flow Metab*, **2013**, *33*, 780–786.

[244] Vermeij, E.A.; Koenders, M.I.; Bennink, M.B.; Crowe, L.A.; Maurizi, L.; Vallée, J.-P.; Hofmann, H.; van den Berg, W.B.; van Lent, P.L.E.M.; van de Loo, F.A.J. The In-Vivo Use of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to Detect Inflammation Elicits a Cytokine Response but Does Not Aggravate Experimental Arthritis. *PLoS ONE*, **2015**, *10*, e0126687.

[245] Alphandéry, E. Iron Oxide Nanoparticles as Multimodal Imaging Tools. *RSC Adv.*, **2019**, *9*, 40577–40587.

[246] Damadian, R. Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. *Science*, **1971**, *171*, 1151–1153.

[247] Lauterbur, P.C. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *nature*, **1973**, *242*, 190–191.

[248] Damadian, R.; Goldsmith, M.; Minkoff, L. Nmr in Cancer: Xvi. Fonar Image of the Uve Human Body. *Physiol. Chem*, **1977**, *9*, 97–100.

[249] *Puissance de Champ Magnétique Nécessaire à l'exploration Ostéo-Articulaire Des Membres Par IRM*; MZQJ001-MZQN001-NZQJ001-NZQN001; Haute Autorité de la Santé, **2011**; p. 61.

[250] Boron, W.F.; Boulpaep, E.L. *Concise Medical Physiology*; Elsevier Health Sciences, **2020**.

[251] Forbes, R.; Cooper, A.; Mitchell, H. The Composition of the Adult Human Body as Determined by Chemical Analysis. *J Biol Chem*, **1953**, *203*, 359–366.

[252] Stanisz, G.J.; Odrobina, E.E.; Pun, J.; Escaravage, M.; Graham, S.J.; Bronskill, M.J.; Henkelman, R.M. T1, T2 Relaxation and Magnetization Transfer in Tissue at 3T. *Magn. Reson. Med.*, **2005**, *54*, 507–512.

[253] Basly, B. Conception et Caractérisation de Nano-Objets Magnétiques Pour l'imagerie Par Résonnance Magnétique (IRM), Université de Strasbourg, **2010**.

[254] Kastler, B.; Pousse, A.; Parmentier, M.; Vetter, D.; Patay, Z. Images T1, T2 et densité protonique. *EMC - Radiologie et imagerie médicale - Principes et techniques - Radioprotection*, **2006**, *1*, 1–9.

[255] de Haën, C. Conception of the First Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents: A Brief History: *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, **2001**, *12*, 221–230.

[256] van der Molen, A.J.; Bellin, M.-F. Extracellular Gadolinium-Based Contrast Media: Differences in Diagnostic Efficacy. *European Journal of Radiology*, **2008**, *66*, 168–174.

[257] Wallace, A.M.; Comstock, C.; Hoh, C.K.; Vera, D.R. Breast Imaging: A Surgeon's Prospective. *Nuclear Medicine and Biology*, **2005**, *32*, 781–792.

[258] Strijkers, G.J.; M. Mulder, W.J.; F. van Tilborg, G.A.; Nicolay, K. MRI Contrast Agents: Current Status and Future Perspectives. *ACAMC*, **2007**, *7*, 291–305.

[259] Fortin, M.-A. Magnetic Nanoparticles Used as Contrast Agents in MRI: Relaxometric Characterisation. In *Magnetic Characterization Techniques for Nanomaterials*; Kumar, C.S.S.R., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2017**; pp. 511–555.

[260] Laurent, S.; Elst, L.V.; Muller, R.N. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for MRI. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; Merbach, A.; Helm, L.; Tóth, É., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2013**; pp. 427–447.

[261] Spencer, A.J.; Wilson, S.A.; Batchelor, J.; Reid, A.; Pees, J.; Harpur, E. Gadolinium Chloride Toxicity in the Rat. *Toxicol Pathol*, **1997**, *25*, 245–255.

[262] Idée, J.-M.; Port, M.; Raynal, I.; Schaefer, M.; Le Greneur, S.; Corot, C. Clinical and Biological Consequences of Transmetallation Induced by Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: A Review. *Fundam Clin Pharmacol*, **2006**, *20*, 563–576.

[263] Evans, C.H. *Biochemistry of the Lanthanides*; Springer Science & Business Media, **2013**; Vol. 8.

[264] Lansman, J.B. Blockade of Current through Single Calcium Channels by Trivalent Lanthanide Cations. Effect of Ionic Radius on the Rates of Ion Entry and Exit. *The Journal of general physiology*, **1990**, *95*, 679–696.

[265] Biagi, B.A.; Enyeart, J.J. Gadolinium Blocks Low-and High-Threshold Calcium Currents in Pituitary Cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **1990**, *259*, C515–C520.

[266] Idée, J.-M.; Berthommier, C.; Goulas, V.; Corot, C.; Santus, R.; Hermine, C.; Schaefer, M.; Bonnemain, B. Haemodynamic Effects of Macrocyclic and Linear Gadolinium Chelates in Rats: Role of Calcium and Transmetallation. 11.

[267] Krasnow, N. Effects of Lanthanum and Gadolinium Ions on Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1972**, *282*, 187–194.

[268] Xiao, Y.-D.; Paudel, R.; Liu, J.; Ma, C.; Zhang, Z.-S.; Zhou, S.-K. MRI Contrast Agents: Classification and Application. *International Journal of Molecular Medicine*, **2016**, *38*, 1319–1326.

[269] Zhang, L.; Liu, R.; Peng, H.; Li, P.; Xu, Z.; Whittaker, A.K. The Evolution of Gadolinium Based Contrast Agents: From Single-Modality to Multi-Modality. *Nanoscale*, **2016**, *8*, 10491–10510.

[270] Morfin, J.-F.; Beloeil, J.-C.; Tóth, É. Agents de contraste pour l'IRM. *Technologies biomédicales*, **2014**.

[271] Gossuin, Y.; Gillis, P.; Hocq, A.; Vuong, Q.L.; Roch, A. Magnetic Resonance Relaxation Properties of Superparamagnetic Particles. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, **2009**, *1*, 299–310.

[272] Taupitz, M.; Wagner, S.; Schnorr, J.; Kravec, I.; Pilgrimm, H.; Bergmann-Fritsch, H.; Hamm, B. Phase I Clinical Evaluation of Citrate-Coated Monocrystalline Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles as a New Contrast Medium for Magnetic Resonance Imaging. *Investigative Radiology*, **2004**, *39*, 394–405.

[273] Poller, W.C.; Pieber, M.; Boehm-Sturm, P.; Ramberger, E.; Karampelas, V.; Möller, K.; Schleicher, M.; Wiekhorst, F.; Löwa, N.; Wagner, S.; Schnorr, J.; Taupitz, M.; Stangl, K.; Stangl, V.; Ludwig, A. Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Long-Term Fate and Metabolic

Processing in Atherosclerotic Mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2018**, *14*, 2575–2586.

[274] Wang, G.; Zhang, X.; Skallberg, A.; Liu, Y.; Hu, Z.; Mei, X.; Uvdal, K. One-Step Synthesis of Water-Dispersible Ultra-Small Fe3O4 Nanoparticles as Contrast Agents for T1 and T2 Magnetic Resonance Imaging. *Nanoscale*, **2014**, *6*, 2953.

[275] Chen, C.; Ge, J.; Gao, Y.; Chen, L.; Cui, J.; Zeng, J.; Gao, M. Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: A next Generation Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, **2022**, *14*.

[276] Raynal, I.; Prigent, P.; Peyramaure, S.; Najid, A.; Rebuzzi, C.; Corot, C. Macrophage Endocytosis of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Mechanisms and Comparison of Ferumoxides and Ferumoxtran-10. *Investigative Radiology*, **2004**, *39*, 56–63.

[277] Bonnemain, B. Superparamagnetic Agents in Magnetic Resonance Imaging: Physicochemical Characteristics and Clinical Applications A Review. *Journal of Drug Targeting*, **1998**, *6*, 167–174.

[278] Qiao, R.; Yang, C.; Gao, M. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: From Preparations to in Vivo MRI Applications. *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, 6274.

[279] Wadghiri, Y.Z.; Li, J.; Wang, J.; Hoang, D.M.; Sun, Y.; Xu, H.; Tsui, W.; Li, Y.; Boutajangout, A.; Wang, A.; de Leon, M.; Wisniewski, T. Detection of Amyloid Plaques Targeted by Bifunctional USPIO in Alzheimer's Disease Transgenic Mice Using Magnetic Resonance Microimaging. *PLoS ONE*, **2013**, *8*, e57097.

[280] Ma, X.; Gong, A.; Chen, B.; Zheng, J.; Chen, T.; Shen, Z.; Wu, A. Exploring a New SPION-Based MRI Contrast Agent with Excellent Water-Dispersibility, High Specificity to Cancer Cells and Strong MR Imaging Efficacy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2015**, *126*, 44–49.

[281] Aziz, O.A.A.; Arafa, K.; Dena, A.S.A.; El-Sherbiny, I.M. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): Preparation and Recent Applications. **2020**, 9.

[282] Lin, M.M.; Kim, D.K.; El Haj, A.J.; Dobson, J. Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) for Translation to Clinical Applications. *IEEE Trans.on Nanobioscience*, **2008**, *7*, 298–305.

[283] Moore, A.; Marecos, E.; Bogdanov, A.; Weissleder, R. Tumoral Distribution of Long-Circulating Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles in a Rodent Model. *Radiology*, **2000**, *214*, 568–574.

[284] Reimer, P.; Tombach, B. Hepatic MRI with SPIO: Detection and Characterization of Focal Liver Lesions. *European radiology*, **1998**, *8*, 1198–1204.

[285] Vogl, T.J.; Hammerstingl, R.; Schwarz, W.; Mack, M.G.; Müller, P.; Pegios, W.; Keck, H.; Eibl-Eibesfeldt, A.; Hoelzl, J.; Woessmer, B. Superparamagnetic Iron Oxide--Enhanced versus Gadolinium-Enhanced MR Imaging for Differential Diagnosis of Focal Liver Lesions. *Radiology*, **1996**, *198*, 881–887.

[286] Alegret, N.; Criado, A.; Prato, M. Recent Advances of Graphene-Based Hybrids with Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Current medicinal chemistry*, **2017**, *24*, 529–536.

[287] Hinds, K.A.; Hill, J.M.; Shapiro, E.M.; Laukkanen, M.O.; Silva, A.C.; Combs, C.A.; Varney, T.R.; Balaban, R.S.; Koretsky, A.P.; Dunbar, C.E. Highly Efficient Endosomal Labeling of Progenitor and Stem Cells with Large Magnetic Particles Allows Magnetic Resonance Imaging of Single Cells. *Blood*, **2003**, *102*, 867–872.

[288] Shapiro, E.M.; Skrtic, S.; Koretsky, A.P. Sizing It up: Cellular MRI Using Micron-Sized Iron Oxide Particles. *Magn. Reson. Med.*, **2005**, *53*, 329–338.

[289] Leyssens, L.; Vinck, B.; Van Der Straeten, C.; Wuyts, F.; Maes, L. Cobalt Toxicity in Humans—A Review of the Potential Sources and Systemic Health Effects. *Toxicology*, **2017**, *387*, 43–56.

[290] O'Neal, S.L.; Zheng, W. Manganese Toxicity upon Overexposure: A Decade in Review. *Current environmental health reports*, **2015**, *2*, 315–328.

[291] Zdrojewicz, Z.; Popowicz, E.; Winiarski, J. Nickel-Role in Human Organism and Toxic Effects. *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, **2016**, *41*, 115–118.

[292] Pershina, A.; Demin, A.; Ivanov, V.; Nevskaya, K.; Shevelev, O.; Minin, A.; Byzov, I.; Sazonov, A.; Krasnov, V.; Ogorodova, L. 3-Aminopropylsilane-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Contrast-

Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Liver Lesions Induced by Opisthorchis Felineus. *IJN*, **2016**, *Volume 11*, 4451–4463.

[293] Jung, H.; Park, B.; Lee, C.; Cho, J.; Suh, J.; Park, J.; Kim, Y.; Kim, J.; Cho, G.; Cho, H. Dual MRI T1 and T2 (∗) Contrast with Size-Controlled Iron Oxide Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2014**, *10*, 1679–1689.

Chapitre 2

Comparaison de deux méthodes de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques : coprécipitation vs micro-ondes

Table des matières Chapitre 2

1. L'ajout de ligands : un moyen d'augmenter la monodispersité _____ 111

1.1. Les nanoparticules d'oxyde de fer nues_____ 111

1.1.1. La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer nues _____ 111

1.1.2. Taille et morphologie des nanoparticules d'oxyde de fer _____ 112

1.2. Le choix du ligand _____ 113

1.3. L'acide citrique : un ligand permettant d'augmenter la monodispersité_____ 114

2. Passage à la synthèse micro-ondes _____ 115

3. Conclusion générale du chapitre 2 _____ 116

4. Bibliographie Chapitre 2 _____ 117

Comme présenté au premier chapitre, plusieurs techniques de synthèse de nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques existent. Le choix de la méthode employée est souvent régi par les propriétés et l'application visées. Ce travail de thèse vise à développer des nanoparticules d'oxydes de fer utilisables en tant qu'agent de contraste pour l'IRM dans le domaine biomédical. Les conditions essentielles à satisfaire sont l'obtention de nanoparticules d'oxyde de fer stables dans un milieu aqueux, non agrégées et monodisperses.

Pour remplir au mieux ces conditions, la première méthode de synthèse choisie est la méthode par coprécipitation. En effet, cette méthode décrite par Massart pour la première fois en 1981 permet d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques directement dans un solvant aqueux [1]. La seconde méthode développée est basée sur l'utilisation des micro-ondes.

Dans ce chapitre, les deux méthodes de synthèse sont comparées afin de déterminer la plus adaptée au cahier des charges.

1. L'ajout de ligands : un moyen d'augmenter la monodispersité

1.1. Les nanoparticules d'oxyde de fer nues

1.1.1. La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer nues

Pour obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dans un milieu aqueux, la méthode la plus simple à utiliser est la synthèse par coprécipitation. Le but des différentes synthèses est d'obtenir des nanoparticules de magnétite Fe_3O_4 car, comme cela a été expliqué dans le chapitre 1, ce type d'oxyde de fer présente le moment magnétique le plus élevé. Pour obtenir de la magnétite via une synthèse de coprécipitation, deux sels de fer, un sel de fer (II) et un sel de fer (III), sont mélangés. Cette synthèse classique de coprécipitation a été réalisée sur la base des résultats obtenus dans l'équipe par Pierre Venturini dans son travail de thèse [2].

Un mélange de 5,03 mmol (soit 1 g) de chlorure de fer (II) tétra hydraté ($FeCl_2.4H_2O$; CAS : 13478-10-9) et de 8,88 mmol (soit 2,4 g) de chlorure de fer (III) hexa hydraté ($FeCl_3.6H_2O$) a été dissous dans 40 mL d'eau ultra pure (résistivité de 18.2 MΩ.cm). Pour obtenir de la magnétite, le rapport de quantité de matière entre les ions Fe^{2+} et les ions Fe^{3+} doit être de 1:2 (c'est-à-dire une mole de Fe^{2+} pour deux moles de Fe^{3+}). Un excès de quantité d'ions ferreux est introduit en raison de la possibilité d'une légère oxydation des ions Fe^{2+} en ions Fe^{3+} lors du stockage du sel. Ce mélange est placé dans un ballon chauffé et couplé à un système à reflux. Le mélange est porté à 80°C sous agitation magnétique. A ce stade, la solution est de couleur orangée. Afin d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer, le pH de la solution doit être basique. Pour cela, un ajout de la base hydroxyde d'ammonium (NH_4OH ; CAS : 1336-21-6) est réalisé pour atteindre des valeurs de pH de la solution de 9,5 à 10. Cet ajout, de 10 mL, rapide et sous agitation magnétique entraîne un changement instantané de la couleur de la solution qui devient noire. La solution est maintenue à 80°C pendant 90 minutes puis est refroidie jusqu'à température ambiante.

La solution est ensuite collectée afin d'être lavée pour éliminer les résidus de synthèse. Pour cela, la méthode de lavage par centrifugation est couplée avec la méthode de sélection de taille par précipitation (méthode SSP selection size precipitation) : ces deux méthodes ont été décrites dans le

chapitre 1 (paragraphe 5.1 et 5.2). La première étape consiste à ajouter de l'éthanol absolu dans des tubes de centrifugation contenant la synthèse de nanoparticules. L'éthanol absolu joue le rôle de mauvais solvant car les nanoparticules d'oxyde de fer ne se solubilisent pas dans ce solvant. L'ensemble est centrifugé pendant 5 minutes à 10 000 tours par minutes. Le surnageant est ensuite éliminé car contenant des résidus de synthèse. Le culot, qui contient les nanoparticules, est suspendu dans 7 mL d'eau ultra pure et dans 14 mL d'éthanol absolu. Une deuxième centrifugation, identique à la première, est réalisée. Cette étape permet d'éliminer les dernières traces de résidus. Le surnageant est de nouveau éliminé et le culot est redispersé dans quelques millilitres d'eau ultra pure afin de conserver les nanoparticules. Pour la suite de ce manuscrit, l'échantillon obtenu sera nommé NPs_{CoP}.

1.1.2. Taille et morphologie des nanoparticules d'oxyde de fer

La technique la plus adéquate pour décrire visuellement les nanoparticules d'oxyde de fer est la Microscopie Electronique en Transmission (MET). Dans ce travail, nous utilisons un microscope CM-200 FEI (Philips) opérant à une tension d'accélération de 200kV. Une à deux gouttes de la solution contenant les nanoparticules ont été déposées sur la face carbonée recouvrant une grille de cuivre (EMS CF200-Cu). La grille est laissée sous une hotte jusqu'à évaporation du solvant (environ une dizaine de minutes) puis peut être utilisée au microscope.

Pour déterminer la taille des nanoparticules, plusieurs images à différents grandissements sont réalisées. Une image de NPs_{CoP} est présentée en Figure 2. 1.a. Sur la micrographie, les nanoparticules ont toutes une forme quasi sphérique, ce qui est attendu pour des nanoparticules issues de ce type de synthèse [3,4]. Un phénomène d'agrégation des nanoparticules est observé, dû à l'absence de molécules à la surface des nanoparticules pour éviter les interactions entre les nanoparticules. Pour déterminer la taille moyenne des nanoparticules d'un échantillon, il faut considérer au minimum 200 particules se situant à différents endroits de la grille pour réaliser un histogramme de la distribution de taille. Le logiciel utilisé est Image J [5]. L'histogramme de distribution de taille est généré (Figure 2. 1.b) avec un ajustement via une fonction gaussienne (ligne rouge sur la Figure 2. 1.b). Cet ajustement est réalisé pour tous les histogrammes dans ce manuscrit afin de pouvoir comparer toutes les tailles entre elles. Cependant, pour des petites particules, une méthode statistique classique (détermination de la moyenne, de la médiane et de l'écart type) doit être réalisée. Pour NPs_{CoP}, le diamètre moyen est de 10,4 ± 2,8 nm, en accord avec la littérature reportée pour la synthèse par coprécipitation [3,4].

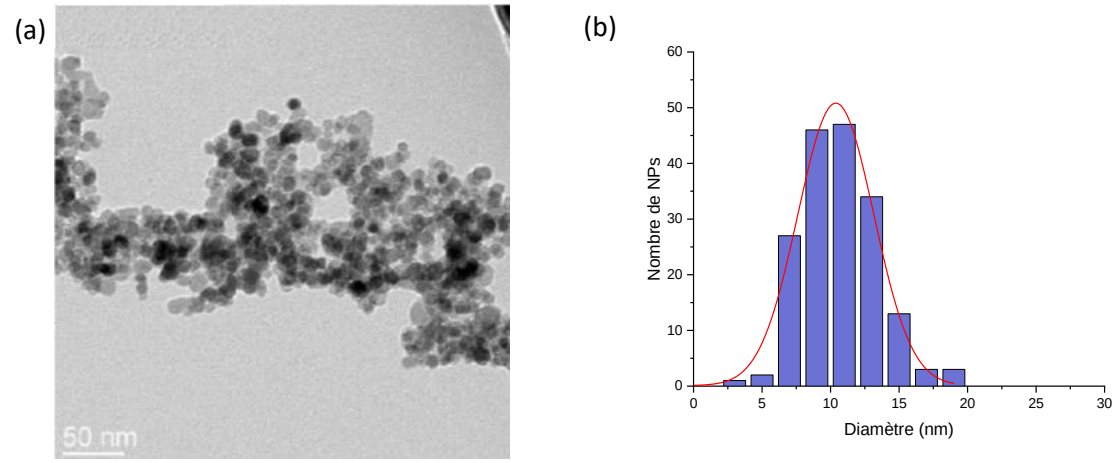


Figure 2. 1 : Micrographie MET de NPs$_{CoP}$ (a) avec sa distribution de taille associée (b).

Pour les applications biomédicales, il est important de limiter le phénomène d'agrégation observé et d'assurer la stabilité colloïdale des nanoparticules. Dans la littérature, et notamment pour les nanoparticules d'oxyde de fer, différentes méthodes de stabilisation sont définies comme la formation de systèmes cœur@coquille, l'utilisation de ligands plus ou moins volumineux, l'encapsulation, … [6–9]. Toutes ces méthodes ont été décrites dans le paragraphe 6.3 du chapitre 1.

1.2. Le choix du ligand

Dans ce travail, la méthode choisie pour limiter l'agrégation est l'ajout de molécules appelées ligands à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. Le choix des ligands est orienté par ses propriétés, sa solubilité dans différents solvants et son affinité avec la surface des nanoparticules. L'ajout de ligands est une méthode relativement facile à réaliser, ne demandant pas d'étapes supplémentaires (Le rendement est donc conservé.) et peu onéreuse en coût et en énergie sous réserve du coût des molécules choisies.

Les ligands, selon les groupements chimiques présents, ont une affinité plus ou moins forte avec l'oxyde de fer. Cette affinité entre les ligands et le cœur inorganique est liée à une interaction de type électrostatique qui peut donc facilement être rompue par des contraintes physiques et/ou chimiques. Le ligand sélectionné doit donc présenter une suffisamment bonne affinité avec le cœur d'oxyde de fer pour qu'il puisse rester fixer en surface. Par exemple, un ligand avec un ou des groupements carboxylates aura une meilleure affinité avec l'oxyde de fer qu'un ligand avec groupements sulfates ou amines [10–12].

Pour l'application visée ici, les ligands doivent permettre la stabilité des nanoparticules dans un milieu aqueux. Certaines molécules sont donc à proscrire comme les acides gras (acide oléique, acide folique, …) car ils possèdent une longue chaîne carbonée hydrophobe ne permettant pas la dispersion des nanoparticules dans l'eau. Des ligands avec un groupement hydrophile pourront être considérés.

Avec ces contraintes, le choix du ligand pour stabiliser nos nanoparticules dans un milieu aqueux s'est porté sur l'acide citrique. En effet, cette molécule comporte trois fonctions carboxyliques qui, aux valeurs de pH de la précipitation des oxydes de fer (pH ≈ 9,5), sont totalement déprotonées (pKa le plus élevé est de 6,4). Ainsi, au moins une fonction carboxylate est en interaction avec le cœur d'oxyde

de fer, les autres permettent la solubilisation de l'ensemble dans l'eau. De plus, l'acide citrique est une molécule non toxique [13], ce qui est essentiel pour une utilisation éventuelle des nanoparticules fonctionnalisées dans le domaine biomédical.

1.3. L'acide citrique : un ligand permettant d'augmenter la monodispersité

Si le choix de l'acide citrique comme ligand doit nous permettre de stabiliser et de solubiliser les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dans un solvant aqueux, l'ajout du ligand réactionnel pourrait également conduire à augmenter la monodispersité des nanoparticules en contrôlant leur croissance.

Pour synthétiser les nanoparticules fonctionnalisées par du citrate, le protocole de synthèse est similaire à celui réalisé pour obtenir l'échantillon NPs_{CoP} (cf paragraphe 1.1.1 du chapitre 2). La seule différence réside dans l'ajout de 6,95 mmol (soit 1,34 g) d'acide citrique ($C_6H_8O_7$; CAS 77-92-9) au milieu réactionnel. Les nanoparticules fonctionnalisées synthétisées sont notées NPs_{CoP}@Cit pour des nanoparticules issues d'une synthèse de coprécipitation fonctionnalisées par des ligands citrates.

Suite à la synthèse et au lavage, la micrographie obtenue par MET et présentée en Figure 2. 2.a ainsi que l'histogramme de distribution de taille associé en Figure 2. 2.b. indique une taille moyenne de 6,2 ± 1,4 nm : l'ajout de ligand a réduit la taille des nanoparticules de 10,4 nm à 6,2 nm et a permis de mieux contrôler celle-ci car la déviation standard a été fortement réduite en passant de 2,8 à 1,4 nm. Nous pouvons toutefois toujours constater une légère agrégation des nanoparticules pouvant entraîner des phénomènes de toxicité au sein d'un organisme, malgré la diminution de l'agrégation de l'échantillon NPs_{CoP}@Cit par rapport à NPs_{CoP} (Figure 2. 1.a). Cette légère agrégation révèle un défaut de fonctionnalisation certainement lié à un manque de ligands en surface des nanoparticules : des réactions de Fenton peuvent donc se produire générant un stress oxydatif [14–16].

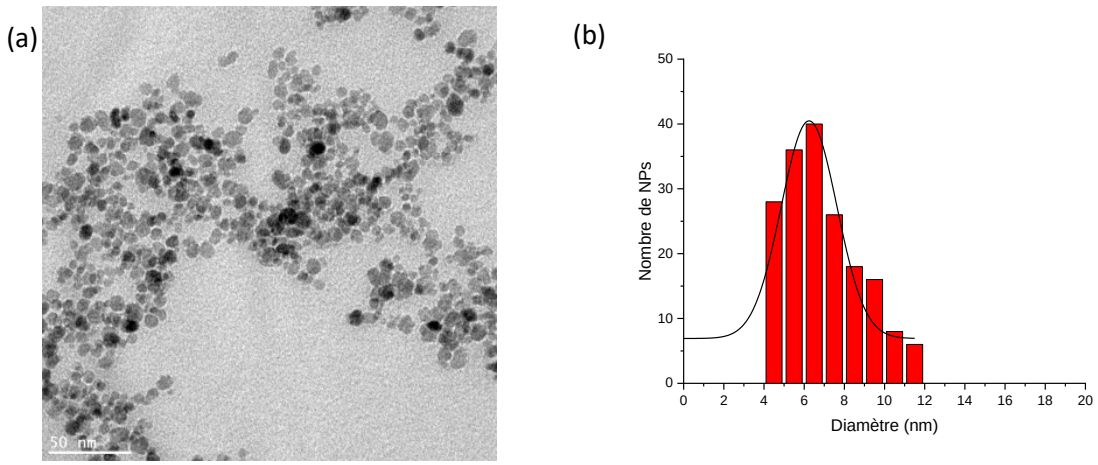


Figure 2. 2 : Micrographie MET de NPs_{CoP}@Cit (a) avec sa distribution de taille associée (b).

Pour essayer de contrôler au mieux la taille des nanoparticules, une autre voie de synthèse basée sur l'utilisation des micro-ondes a été considéré.

2. Passage à la synthèse micro-ondes

Comme cela a été mentionné dans le chapitre 1, l'utilisation des micro-ondes permet de diminuer la durée de la synthèse [17]. Cette méthode est simple à mettre œuvre et doit conduire à une bonne reproductibilité des synthèses. Grâce aux ondes micro-ondes, une vibration moléculaire du solvant polaire (ici l'eau) génère de la chaleur permettant ainsi une uniformité de la température au sein du réacteur. Avec un gradient de température très faible, la croissance des nanoparticules devrait être uniforme améliorant ainsi leur monodispersité.

Une comparaison est réalisée entre la synthèse par coprécipitation avec des ligands NPs_{CoP}@Cit et son équivalent dans un réacteur micro-ondes NPs_{MW}@Cit. Cette comparaison sera détaillée à la fin du chapitre, dans la publication « Elaboration of functionalized iron oxide nanoparticles by microwave assisted co-precipitation: a new one-step method in water ».

3. Conclusion générale du chapitre 2

Dans ce chapitre, la méthode de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques a été définie pour la suite du travail développé dans ce manuscrit.

Parmi les différentes méthodes de synthèse existantes, il convient en effet de choisir la méthode la plus adaptée pour les utilisations visées des objets synthétisés. Sachant que l'objectif de ce travail est de synthétiser des nanoparticules pouvant être utilisées en tant qu'agent de contraste en IRM, une voie d'élaboration permettant une synthèse directement dans l'eau paraît la plus appropriée. De ce fait, le choix s'est d'abord porté sur la synthèse par coprécipitation. En effet, cette synthèse à l'avantage d'être facile à mettre en place, peu onéreuse et d'avoir un bon rendement. Une première synthèse a donc été réalisée en mélangeant directement deux sels de fer (chlorure de fer II et chlorure de fer III) en présence d'une base afin d'obtenir des nanoparticules de magnétite Fe_3O_4. Or, avec ces conditions, les nanoparticules obtenues ont tendance à se répulser en raison des charges de surface et des interactions dipolaires.

Afin de remédier à cela, une fonctionnalisation *in-situ* par un ligand a été réalisée. Le choix du ligand s'est porté sur la molécule du citrate qui a une bonne affinité avec le cœur d'oxyde de fer grâce à ses trois fonctions carboxylates et qui permet de solubiliser les nanoparticules dans un milieu aqueux. Les nanoparticules fonctionnalisées obtenues présentent une agrégation moindre mais rédhibitoire pour une utilisation dans le domaine biomédical.

Un nouveau procédé a ainsi été envisagé afin d'accroître la monodispersité ainsi que la stabilité des nanoparticules fonctionnalisées dans un milieu aqueux. L'utilisation du procédé micro-ondes s'est imposé, l'homogénéité de température obtenue dans un réacteur par cette méthode permettant de faciliter a priori une croissance homogène des nanoparticules ; cela avec des temps de synthèse réduits, passant de plusieurs heures avec une synthèse par coprécipitation classique à moins d'une heure en utilisant les micro-ondes.

Une comparaison a été réalisée entre ces deux méthodes de synthèses. Les nanoparticules fonctionnalisées issues de ces deux méthodes ont des propriétés physico-chimiques similaires, notamment une bonne cristallinité. La différence majeure caractérisée est l'absence d'agrégation des nanoparticules obtenues par la synthèse micro-ondes. Ainsi, pour des applications en tant qu'agent de contraste en IRM, nous avons choisi de synthétiser les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques en utilisant la synthèse micro-ondes. La synthèse décrite dans ce chapitre, plus particulièrement dans la publication à la fin de celui-ci, ne constitue qu'une première approche. Les paramètres de synthèse dépendant de l'équipement micro-ondes ne sont pas optimisés. Il convient de déterminer dans quelles conditions nous pouvons obtenir les nanoparticules avec les meilleurs paramètres physico-chimiques pour les utiliser en tant qu'agent de contraste. Pour cela, un plan d'expérience a été réalisé et fait l'objet du chapitre 3.

4. Bibliographie Chapitre 2

[1] Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE transactions on magnetics*, **1981**, *17*, 1247–1248.

[2] Venturini, P. Synthèse et caractérisation de nanomatériaux hybrides innovants pour le biomédical, Université de Lorraine, **2017**.

[3] Besenhard, M.O.; Panariello, L.; Kiefer, C.; LaGrow, A.P.; Storozhuk, L.; Perton, F.; Begin, S.; Mertz, D.; Thanh, N.T.K.; Gavriilidis, A. Small Iron Oxide Nanoparticles as MRI T_1 Contrast Agent: Scalable Inexpensive Water-Based Synthesis Using a Flow Reactor. *Nanoscale*, **2021**, *13*, 8795–8805.

[4] Slimani, S.; Meneghini, C.; Abdolrahimi, M.; Talone, A.; Murillo, J.P.M.; Barucca, G.; Yaacoub, N.; Imperatori, P.; Illés, E.; Smari, M.; Dhahri, E.; Peddis, D. Spinel Iron Oxide by the Co-Precipitation Method: Effect of the Reaction Atmosphere. *Applied Sciences*, **2021**, *11*, 5433.

[5] Abràmoff, D.M.D. Image Processing with ImageJ. 7.

[6] Kottana, R.K.; Maurizi, L.; Schnoor, B.; Morris, K.; Webb, J.A.; Massiah, M.A.; Millot, N.; Papa, A. Anti-Platelet Effect Induced by Iron Oxide Nanoparticles: Correlation with Conformational Change in Fibrinogen. *Small*, **2021**, *17*, 2004945.

[7] Li, Y.; Qi, L.; Shen, Y.; Ma, H. Facile Preparation of Surface-Exchangeable Core@shell Iron Oxide@gold Nanoparticles for Magnetic Solid-Phase Extraction: Use of Gold Shell as the Intermediate Platform for Versatile Adsorbents with Varying Self-Assembled Monolayers. *Analytica Chimica Acta*, **2014**, *811*, 36–42.

[8] Jani, K.; Kaushal, N.; Sadoqi, M.; Long, G.; Chen, Z.-S.; Squillante, E. Formulation and Characterization of Oleic Acid Magnetic PEG PLGA Nanoparticles for Targeting Glioblastoma Multiforme. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2021**, *533*, 167970.

[9] Segers, F.M.E.; Ruder, A.V.; Westra, M.M.; Lammers, T.; Dadfar, S.M.; Roemhild, K.; Lam, T.S.; Kooi, M.E.; Cleutjens, K.B.J.M.; Verheyen, F.K.; Schurink, G.W.H.; Haenen, G.R.; van Berkel, T.J.C.; Bot, I.; Halvorsen, B.; Sluimer, J.C.; Biessen, E.A.L. Magnetic Resonance Imaging Contrast-Enhancement with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Amplifies Macrophage Foam Cell Apoptosis in Human and Murine Atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, **2022**, cvac032.

[10] Mourdikoudis, S.; Liz-Marzán, L.M. Oleylamine in Nanoparticle Synthesis. *Chem. Mater.*, **2013**, *25*, 1465–1476.

[11] Xu, Z.; Shen, C.; Hou, Y.; Gao, H.; Sun, S. Oleylamine as Both Reducing Agent and Stabilizer in a Facile Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Chem. Mater.*, **2009**, *21*, 1778–1780.

[12] Sahoo, Y.; Pizem, H.; Fried, T.; Golodnitsky, D.; Burstein, L.; Sukenik, C.N.; Markovich, G. Alkyl Phosphonate/Phosphate Coating on Magnetite Nanoparticles: A Comparison with Fatty Acids. *Langmuir*, **2001**, *17*, 7907–7911.

[13] Fiume, M.M.; Heldreth, B.A.; Bergfeld, W.F.; Belsito, D.V.; Hill, R.A.; Klaassen, C.D.; Liebler, D.C.; Marks, J.G.; Shank, R.C.; Slaga, T.J.; Snyder, P.W.; Andersen, F.A. Safety Assessment of Citric Acid, Inorganic Citrate Salts, and Alkyl Citrate Esters as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol*, **2014**, *33*, 16S-46S.

[14] Marquis, B.J.; Love, S.A.; Braun, K.L.; Haynes, C.L. Analytical Methods to Assess Nanoparticle Toxicity. **2009**, 15.

[15] Fenton, H.J.H. Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, **1894**, *65*, 899–910.

[16] Petters, C.; Irrsack, E.; Koch, M.; Dringen, R. Uptake and Metabolism of Iron Oxide Nanoparticles in Brain Cells. *Neurochem Res*, 13.

[17] Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. The Use of Microwave Ovens for Rapid Organic Synthesis. *Tetrahedron Letters*, **1986**, *27*, 279–282.

Elaboration of functionalized iron oxide nanoparticles by microwave-assisted coprecipitation: a new one-step method in water

Thomas Girardet[1], Amel Cherraj[1], Pierre VENTURINI[1], Hervé MARTINEZ[2], Jean-Charles DUPIN[2], Franck CLEYMAND[1], Solenne FLEUTOT[1]

1. Institut Jean Lamour UMR CNRS-UL 7198, Campus Artem, 2 allée André Guinier, BP 50840 -54011 NANCY CEDEX
2. CNRS/University of Pau and Pays de l'Adour/E2S UPPA, Institut des Sciences Analytiques et de Physicochimie pour l'Environnement et les Matériaux—UMR 5254, F-64000 Pau, France

Abstract

Iron oxide nanoparticles are widely used in various areas and especially in the biomedical field. For this application, nanoparticles have specific requirements such as size, morphology, physicochemical properties, stability and biocompatibility. The coprecipitation assisted by microwave provides easily water-soluble nanoparticles. The functionalization during the synthesis by citrate is a main element to have a stable colloidal solution. The goal of this study is to determine the best synthesis between a classical coprecipitation and a microwave assisted coprecipitation. Synthesized nanoparticles were characterized by TEM, DLS, FTIR, XRD and magnetic characterization. The results showed stable and non-aggregated nanoparticles, considering a functionalization *in situ* by citrate during the synthesis.

Keywords: microwave; coprecipitation; citrate; iron oxide; nanoparticles

Introduction

Nanomaterials are defined by their nanometer scale in one of the three dimensions of the space. Among them, nanoparticles (NPs) have the whole three dimensions under 100 nm. A NP is an assembly from a hundred to a couple of thousands of atoms, achieving a nanometric object (1 to 100 nm). This extreme low size increases the surface-to-volume ratio, giving them a better surface reactivity, which modifies their properties.
In this field, iron oxide NPs are especially attractive thanks to magnetic properties of magnetite (Fe_3O_4) and maghemite (γ-Fe_2O_3) which is superparamagnetic under 20 nm, conferring them a ferrofluidic behavior [1]. These magnetic properties imply that, at room temperature, there is no spontaneous magnetism, only when there is an extern magnetic field. It has a great interest in medical applications: drug carrier [2], drug release [3], cancer therapy [4], hyperthermia [5], magnetic separation [6], and notably for magnetic resonance imaging (MRI) [7]. Many challenges must be overcome to use NPs in the human body. The most important of them are controlled physicochemical characteristics such as size [8], shape [9], composition [10], biocompatibility along with stability and non-aggregation of the NP over time.

Iron oxide NPs can be synthetized by various methods: hydrothermal [11], ultrasound [12], gel-sol process [13], thermal decomposition [14] and co-precipitation [15]. Each synthesis has its advantages and disadvantages. The co-precipitation was chosen for its good yield and its easiness to obtain water

soluble nanoparticles with a low temperature reaction. However, there are also constraints such as the poor size control for nanoparticles and the low crystallinity.
In the classical co-precipitation, ferric salts (Fe^{3+}) and ferrous salt (Fe^{2+}) are precipitated in a basic aqueous medium, while it is heated and stirred. The formula of the chemical reaction may be written as below [16]:

$$Fe^{2+}_{(aq)} + 2\ Fe^{3+}_{(aq)} + 8\ OH^{-}_{(aq)} \rightarrow Fe_3O_{4\,(s)} + 4\ H_2O$$

According to this reaction, magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles are theoretically obtained, particularly for a synthesis under controlled atmosphere. Studies have shown that the compositions of iron oxide NPs are influenced by their sizes [16]. For sizes under 8 nm, the composition tends to be the maghemite's one, and for sizes above 12 nm the magnetite seems to be the main component. However, the surface magnetite nanoparticles can be oxidized and for intermediate sizes a gradient of oxidation can be observed from the surface to the core (the composition can be assimilated to a sub stoichiometric magnetite) [16]. The crystal lattice of magnetite is an inverse spinel structure. It turns into maghemite by the air oxidation. The result in the maghemite crystal lattice is the creation of vacancies into the inverse spinel structure with different possible states of organization [17].
NPs obtained by the reaction above are naked and tend to aggregate, which makes them loose their stability in the solvent, water for the coprecipitation process traditionally. To prevent this issue, nanoparticles can be functionalized by ligands as oleic acid [18], oleylamine [19] , polymers [20] or citric acid [5]. The choice of the ligand is determining for the further stability in the solvent. For example, the oleic acid or oleylamine are stable in organic solvent, unlike citric acid or polyacrylic acid which are stable in water. In order to perform the synthesis for potential biomedical applications and use our nanoparticles in the human body, citric acid was chosen due to its biocompatibility [21]. Indeed, it is a component of the Krebs cycle founded in every cells of our body [22]. The functionalization by the ligand can be performed after or during [18] the iron oxide nanoparticles synthesis, which enables to reduce the particle size and by extension to improve their stability.

The co-precipitation is a chemical reaction, described by the Lamer diagram in 50's [23]. It explains four different steps to form nanoparticles: inorganic polycondensation, nucleation, growth and the Ostwald ripening [24]. Various parameters inherent to the reaction impact the advancement in the nanoparticle's formation such as type of ferric salts, ratio Fe^{2+}/Fe^{3+}, temperature, pH value, ionic concentration of reactants or even the base nature.
The classical coprecipitation was adapted to microwave by the creation of a new protocol. Indeed, the microwave process is more and more used to decrease the time of the synthesis, to increase the yield since the 2000 [25]. Thanks to the microwave irradiation, the solvent is vibrated and allows to heat the solution: there is no distribution of temperature in the solution and allows to decrease the distribution size [26]. As said below, the size of NPs is dependent on the temperature of the solution: if there is a temperature distribution, the size distribution of the NPs is large. The goal of this study is to compare a synthesis of NPs obtained by a classical coprecipitation with a synthesis of NPs obtained by a microwave process.

The microwave is a heating device, that uses microwave irradiations corresponding to wavelength from 1mm to 1m. It enables a dielectric heating by two processes: dipolar polarization and ionic

conduction. The dipolar polarization mechanism reposes on the alignment of a dipole molecule, here water, with the microwave field. This way, dipoles rotate and rub themselves, which creates heat. The ionic conduction mechanism lies on ionic components, here Fe^{2+} and Fe^{3+}, that align themselves under the field and oscillate. The oscillation creates more collision between particles, that leads to the generation of heat.
The heating is more efficient, which provides more precursors to be at the good temperature in order to react. It helps to increase the quantity of germs in the nucleation state, and this way improves the yield of the reaction.

To evaluate the efficiency of the synthesis, a physicochemical and magnetic characterizations of obtained nanoparticles were conducted systematically using classical methods: Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS), Fourier Transformed InfraRed (FTIR), X-Ray diffraction (XRD) and Thermogravimetric Analysis (TGA). Magnetic measurements were performed using a SQUID VSM to determine the magnetic state and magnetic properties.

Materials and methods

Synthesis of nanoparticles by co-precipitation

A mixture of iron (II) chloride tetrahydrate $FeCl_2.4H_2O$ (5.03 mmol; CAS: 13478-10-9) and iron (III) chloride hexahydrate $FeCl_3.6H_2O$ (8.88 mmol; CAS: 10025-77-1) are dissolved in 40 mL of ultrapure water with a magnetic stirring. When the precursors are dissolved, citric acid (6.95 mmol; CAS: 77-92-9) in 5 mL of ultrapure water is added in the mixture. The mixture is heated to 80°C thanks to a water bath. Then, 10 mL of ammonium hydroxide NH_4OH (CAS: 1336-21-6) is added at the mixture to allow the precipitation of the solution. These NPs were named NPs_{CoP}@Cit.

The nanoparticle's washing consisted in centrifuging the mixture with absolute ethanol at 10 000 rpm during 5 min and to evacuate the supernatant. The next washing was realized with absolute ethanol and ultrapure water at 10 000 rpm during another 5 min. Nanoparticles obtained can finally be redispersed in ultrapure water.

Synthesis of nanoparticles by microwave assisted co-precipitation

The experimental conditions for the microwave synthesis were the same as those for coprecipitation synthesis but with smaller volumes quantities of materials. A mixture of $FeCl_2.4H_2O$ (5.03 mmol; CAS 13478-10-9), $FeCl_3.6H_2O$ (3.70 mmol; CAS 10025-77-1), citric acid (3.16 mmol; CAS 77-92-9), and ultrapure water (15 mL) were stirred until homogenization. Then 5 mL of NH_4OH (CAS 1336-21-6) were added to the mixture to precipitate the solution. This solution is turned black and was stirred again. The reactor was put in the microwave to heat at 96°C during 40 min with a magnetic stirring (ramp of temperature during 10 min to reach 96°C and 30 min at this temperature) and then cooled down to 60°C. These NPs were called NPs_{MW}@Cit.

The nanoparticle's washing was the same for coprecipitation synthesis. It consisted in centrifuging the mixture with absolute ethanol at 10 000 rpm during 5 min and to evacuate the supernatant. The next washing was realized with absolute ethanol and ultrapure water at 10 000 rpm during another 5 min. Nanoparticles obtained can finally be dispersed in ultrapure water.

Characterizations of nanoparticles

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) used for nanoparticles was a CM200 - FEI operating at 200 kW (point resolution 0.27 nm). It enabled to take picture of nanoparticles at different magnifications. The size distribution was calculated thanks to a free software ImageJ [27].

Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) was performed by the device ZETASIZER Nano ZS from Malvern instrumental. The sample of nanoparticles in water were first diluted by a hundred time and analyzed in a glass vessel. The dilution has for reason to minimize the electrostatic interactions in order to allow the Brownian motion [28]. This dilution is the same as that observed under TEM. The results can be obtained as functions of intensity, number or volume. The distribution of volume was chosen here because the possible aggregation of NPs is to be investigated as well as the determination of the hydrodynamic diameter. This diameter corresponds to the diameter of the inorganic core with the organic and the solvation sphere.

X-Ray diffraction

X-Ray diffraction (XRD) pattern was recorded at room temperature with an INEL CPS120 equipped with a monochromatic cobalt radiation (Co Kα = 0.178886 nm) at grazing angle of incidence simultaneously on 120°.

Fourier transform infrared spectroscopy

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was performed with a Nicolet 6700 (Thermo Fischer) from 400 cm^{-1} to 4 000 cm^{-1} in absorbance.

Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out on a nanoparticle's sample dried by heat chamber. The device used was a microbalance SETSYS EV 1750 TGA from the brand named Setaram. The measurement consisted of to put a defined mass of the sample in a crucible and increase the temperature from 20 to 600°C at 10°C/min under air flow. At the end, the exact mass of iron oxide in the sample was given.

Magnetic measurement

The magnetic measurement was performed on powder. Dried nanoparticles were put on a glass sample holder and recover by a specific adhesive tape (KAPTON) in order to avoid any movements. The device used was a SQUID (Superconducting Quantum Interference Device) with a VSM head (Vibrating Sample Magnetometer) from Quantum design. With this device, the magnetization saturation (M_S) at room temperature (300K) and at low temperature (5K) were determined with a magnetic cycle from + 50 000 Oe (1T = 10 000 Oe) to – 50 000 Oe and from – 50 000 Oe to + 50 000 Oe. To determine the blocking temperature T_B (the transition temperature between a blocked state and a superparamagnetic state), a Zero Field Cooled (ZFC) and a Field Cooled (FC) curves is performed. The sample was put at the beginning to the temperature of 5K without a magnetic field. A magnetic field was then applied at 200 Oe and the sample was heated from 5K to 300K. The magnetization was recorded at the same time, which corresponded to the ZFC curve. At the same magnetic field, the nanoparticle's sample was cooled down from 300k to 5K. The magnetization was also recorded and gave the FC curve. The value of T_B is assimilated to the maximum of the ZFC curve. However, this determination is not precise because there is a distribution of blocking temperature: the best method to determine T_B is to use a Monte-Carlo simulation [29]. But, for practical reasons, the maximum of the ZFC curve is used.

Results and discussion

A comparison of the TEM micrographs is performed. The TEM micrograph on figure 1.a corresponds to the sample of the conventional co-precipitation and the TEM micrograph on figure 1.b corresponds to the sample of the micro-wave synthesis.

A difference between these two samples is observable. Indeed, NPs of NPs_{CoP}@Cit have a little aggregation and they have different sizes ranging from 4 nm to 11 nm (figure 1.c). The average size of NPs_{CoP}@Cit is 6.2 ± 1.4 nm. Conversely, NPs_{MW}@Cit has NPs of similar sizes (from 3 to 7 nm) with few aggregations (figure 1.d). The average size of NPs_{MW}@Cit is 4.0 ± 0.8 nm. With the microwave process, obtained NPs are more dispersed, without aggregation and have the same size. Indeed, the standard deviation of NPs_{MW}@Cit is twice as small as with the classical process. The use of microwave allows to increase the monodispersity of NPs. To confirm that, DLS measurements are carried out.

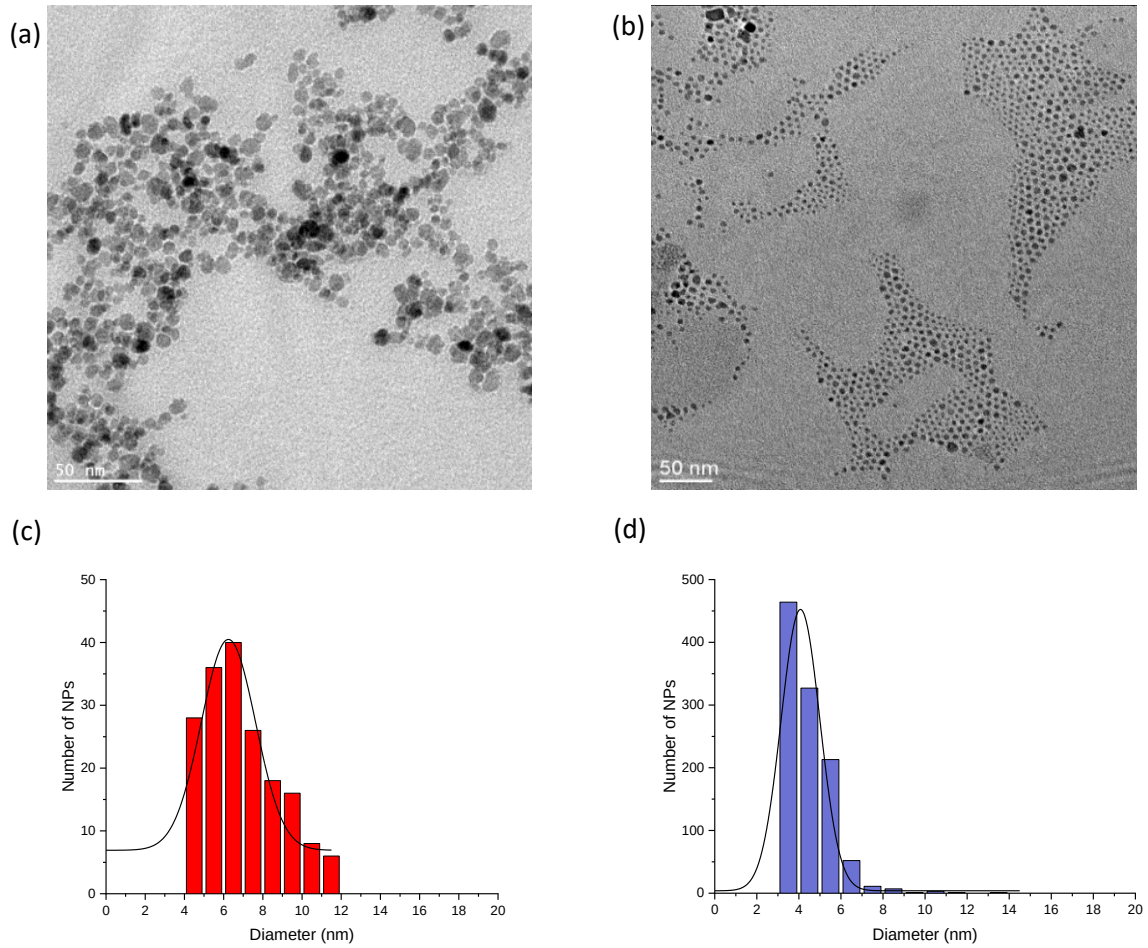


Figure 1: Micrograph TEM of NPsCoP@Cit (a) and of NPsMW@Cit (b) with their respectively size distribution histogram (c) and (d).

With the DLS measurement, the hydrodynamic diameter can be determined. For NPs_{CoP}@Cit, there are two populations of NPs with an average hydrodynamic diameter of 34 nm and 104 nm. These two different values of hydrodynamic diameter confirm the presence of an aggregation of NPs. For NPs_{MW}@Cit, the hydrodynamic diameter is equal to 22 nm: this diameter is lower than the diameter of NPs_{CoP}@Cit and can confirm either the smaller size of NPs or the absence of aggregation with one peak.

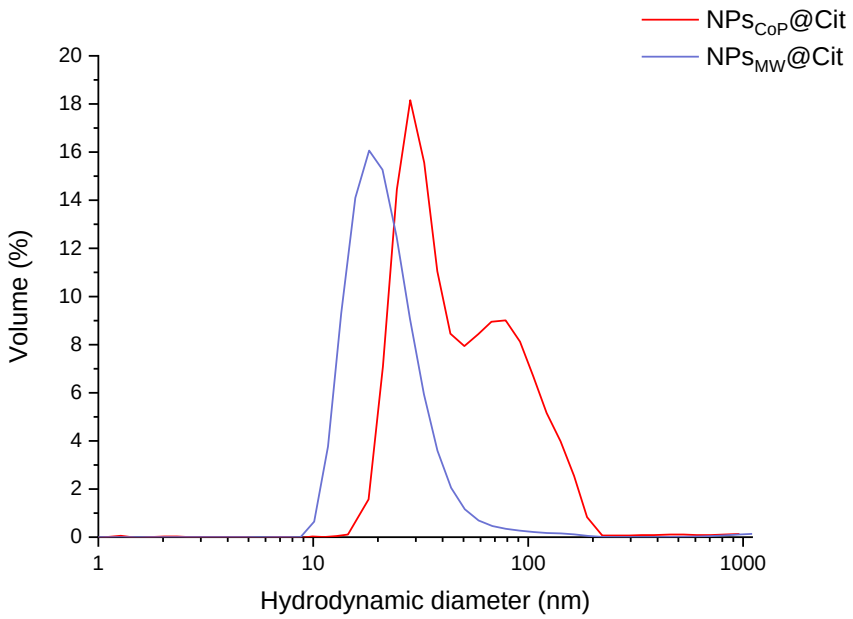


Figure 2: DLS measurements of NPs$_{CoP}$@Cit (red) and NPs$_{MW}$@Cit (blue) in function the volume of particles.

To characterize the inorganic core of theses nanoparticles, XRD measurements are realized (figure 3). A magnetite reference is compared with XRD patterns of NPs$_{CoP}$@Cit and NPs$_{MW}$@Cit in order to check if the inorganic core is magnetite or another phase of iron oxide (like hematite, maghemite, …). Magnetite crystallizes in a cubic structure: the space group is $F_{d\bar{3}m}$. However, maghemite (γ-Fe_2O_3) crystallizes too in the same space group: the only difference between magnetite and maghemite is the lattice parameter. Indeed, due to the presence of vacancies in maghemite, its lattice parameter is lower than the lattice parameter of magnetite (8.354 Å for maghemite and 8.395 Å for magnetite).
For both, the mean peaks of magnetite (indexing by the JCPDS card 04-015-8200) are present.
The lattice parameter is calculated with the average lattice parameter of each magnetite peaks. For NPs$_{CoP}$@Cit, it is equal to 8.393 ± 0.014 Å and for NPs$_{MW}$@Cit, it is equal to 8.389 ± 0.010 Å. For both, the lattice parameter is near to the lattice parameter of a bulk magnetite Fe_3O_4 (8.395 Å).
Thanks to the Debye-Scherrer formula, the crystallite size can be calculated with the most intense peak of magnetite (311). For NPs$_{CoP}$@Cit, the crystallite size is around 7.8 nm and is according with the diameter measured from TEM images (a diameter of 6.2 nm). For NPs$_{MW}$@Cit, the crystallite size is around 4.4 nm and is similar with the diameter obtained with TEM images (4.0 nm).

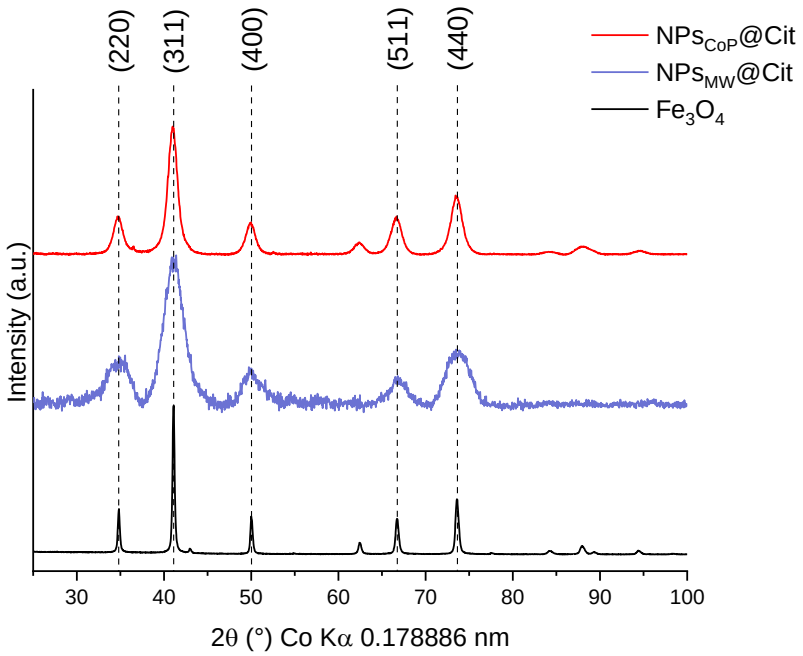


Figure 3: XRD patterns of NPs$_{CoP}$@Cit (red) NPs$_{MW}$@Cit (blue) and magnetite reference (black) with a cobalt radiation (λ = 0.1788886 nm).

The FTIR spectra of NPs$_{CoP}$@Cit and NPs$_{MW}$@Cit are shown in figure 4. This technique makes it possible to identify the composition of ligands on the surface of the NPs as well as the oxidation state of iron atoms.

Spectra of NPs$_{CoP}$@Cit and NPs$_{MW}$@Cit are identical: the two spectra have a wide band from 3500 to 3000 cm^{-1} which is poorly resolved. This band corresponds to ν(OH) of the hydroxyl group of the citrates and of the physiosorbed water. The bands at 1560 and 1385 cm^{-1} correspond respectively to the asymmetric and symmetric stretching (OCO^-) of carboxylates of the citrates. The presence of these two bands allows to confirm that citrates functionalized iron oxide nanoparticles. In addition, around 1260 cm^{-1}, a vibrational band is present and corresponding to the stretching of C-O.
Finally, iron can have different states of crystalline lattice: magnetite (Fe_3O_4), maghemite (γ-Fe_2O_3), and hematite (α-Fe_2O_3). In this study, there are no control of the reaction atmosphere to avoid oxidation. Therefore, maghemite is the more expected for iron oxide nanoparticles synthetized in the two samples considering the nanoparticle sizes determined by TEM. Indeed, the two samples have iron oxide core smaller than 8 nm and according to other studies the nanoparticle are composed of maghemite [16]. The functionalization by citrate during the synthesis could have protected nanoparticles from oxidation. It leads to the formation of very little nanoparticles composed by a mixture of maghemite and magnetite. The results seem also to pinpoint that the basis nature for the nanoparticle's precipitation have an influence on composition. If there is one band around 580 cm^{-1}, the inorganic core corresponds to the magnetite, if there are a succession of bands, the inorganic core corresponds to the maghemite (this succession is due to the presence of vacancies) [30]. For both samples, only one band is present around 580 cm^{-1} and confirm the large presence of magnetite: the functionalization by citrate allows to protect the oxidation of magnetite in maghemite.

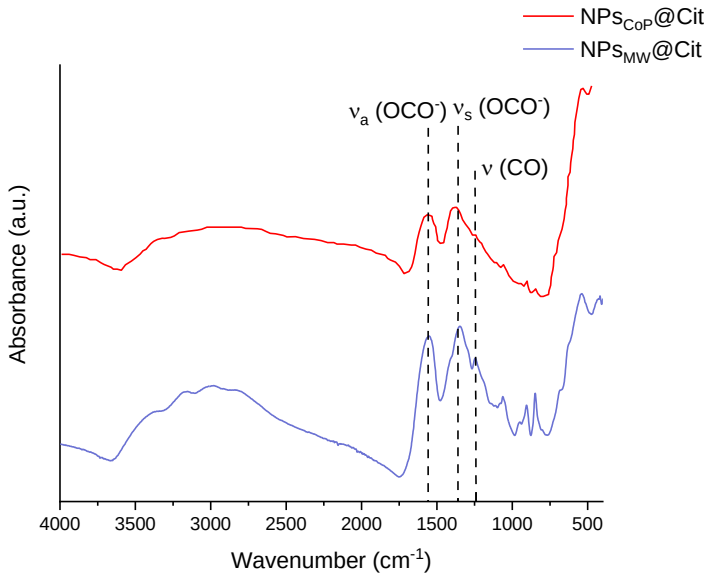


Figure 4: FTIR spectra of NPs$_{CoP}$@Cit (red) NPs$_{MW}$@Cit (blue) with the mean vibrational bands of citrate.

With these different characterizations, the NPs obtained by the classical coprecipitation and by the microwave process have the same physico-chemical properties. However, NPs from the coprecipitation are more aggregate than the NPs from the microwave process: this point is the most important for the biomedical fields. Thus, magnetic characterizations are carried with these last NPs to determine if there are good candidates for biomedical applications as contrast agent.

In first, a TGA measurement (figure 5) is carried out in order to know the quantity of iron oxide as well as the rate of ligand in NPs$_{MW}$@Cit. Indeed, the sample is heated to 600°C in order to decompose the citrate ligands. The first weight loss around 10% has occurred from 50°C to 150°C, which corresponds to the evaporation of physiosorbed water (1 on figure 5). The second stage has been at 200°C and is the most important decomposition of the ligands. Indeed, during this stage, the different carboxylate groups are decomposed with the air to form CO_2 (2 on figure 5). The last stage began at 330°C and is corresponding to the decomposition of the last remaining chains (3 on figure 5). The weight obtained at the end was used to calculate the percentage of iron in the sample, which is equal to 35 % for NPs$_{MW}$@Cit.

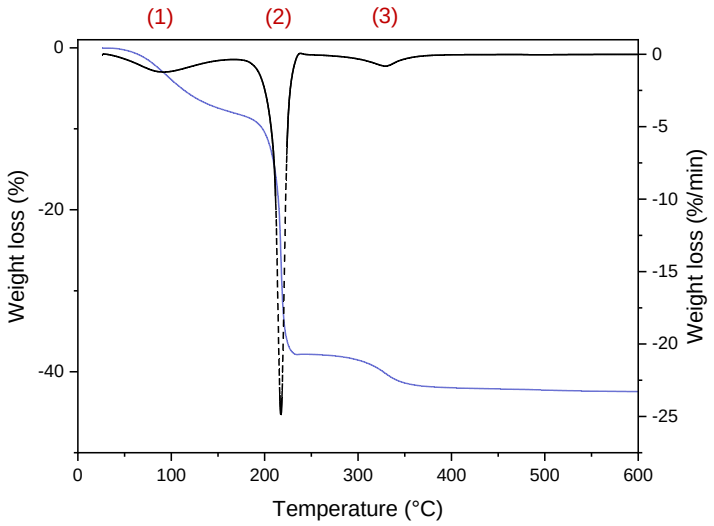


Figure 5: TGA curve (blue) and TGA derivative (black) of NPs_{MW}@Cit at the heat ramping rate of 10°C/min from room temperature to 600°C.

Iron oxides are interesting in terms of magnetism because of their crystal lattice. Unlike hematite (α-Fe_2O_3), magnetite and maghemite are ferrimagnetic above a size, which is explained respectively by the proportion of Fe^{2+} and by the vacancies in their crystal lattice. In the case of nanoparticles under a limit size of 20 nm [1], they adopt a superparamagnetic behavior, which means they have no magnetization at room temperature. Nanoparticles have an inherent energy lower than the thermal energy, which allow them to turn over spontaneously.

The magnetization curve was measured between -50 000 Oe and 50 000 Oe at 300K (figure 6.a). NPs_{MW}@Cit had no hysteresis curve which seems to describe a superparamagnetic behavior. In addition, the magnetization saturation M_S is equal to 53 emu.g^{-1}: this value is similar to the M_s obtained with a coprecipitation synthesis. If NPs are in a superparamagnetic state at room temperature, the M_S value will increase when the temperature decreases because the magnetic moment will be in a blocked state. For NPs_{MW}@Cit, this phenomenon is happening (figure 6.b): M_S increases from 53 emu.g^{-1} at 300K to 78 emu.g^{-1} at 5K.

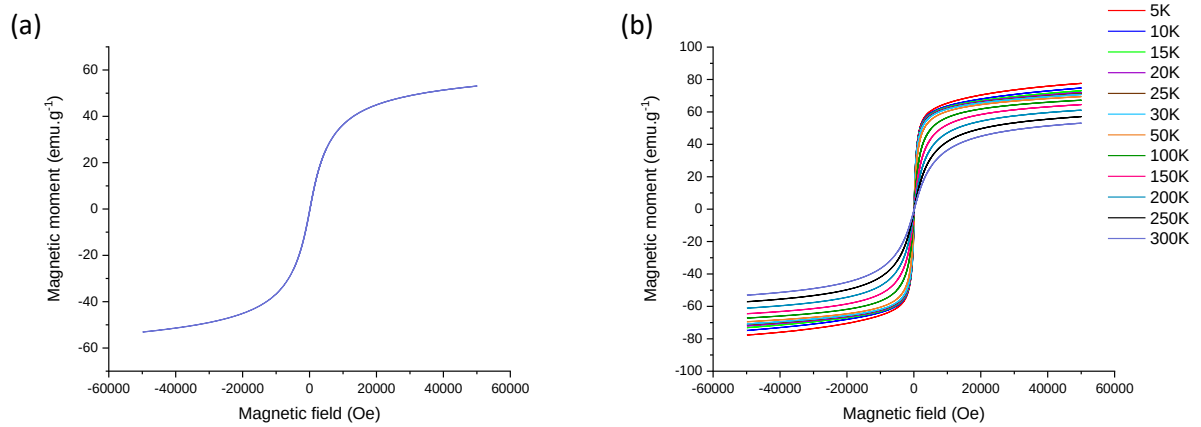


Figure 6: magnetic cycle of NPs_{MW}@Cit at room temperature (figure 6.a) and at different temperatures, from 5K to 300K (figure 6.b).

To confirm the superparamagnetic nature of NPs_{MW}@Cit, a ZFC/FC measurement is carried out (figure 7). The main information given by this measurement is the blocking temperature T_B assimilated to the maximum of ZFC curve. For NPs_{MW}@Cit, T_B is equal to 15K. This specific temperature is correlated with the size of nanoparticles. In this sample, the blocking temperature is very low in agreement with the small nanoparticles size.
For the FC curve, the magnetization increases continuously below T_B. This indicates weakly interacting or isolated nanoparticles in a sample. Consequently, citrates-functionalized nanoparticles with a microwave process are not aggregated in agreement with TEM results.

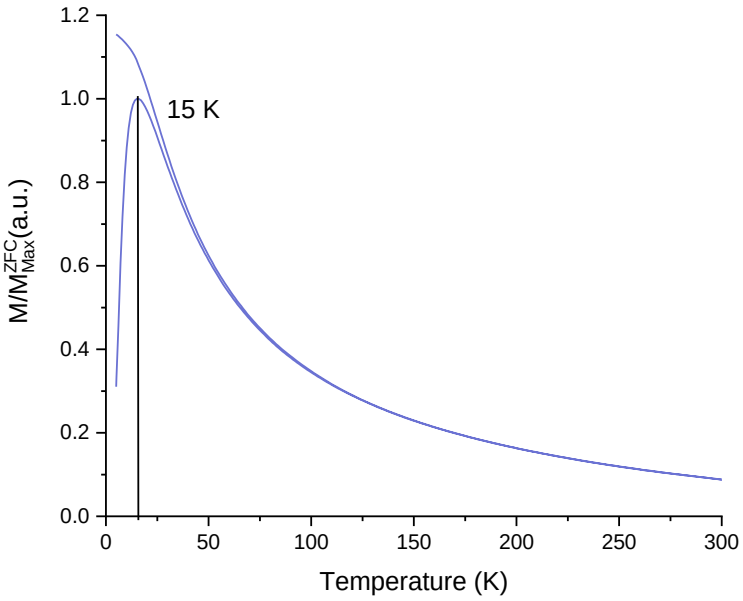


Figure 7: ZFC-FC curve of NPs_{MW}@Cit with a T_B = 15K.

Conclusion

In the present study, we have developed a new method for synthesizing iron oxide NPs functionalized by citrates using microwaves. This synthesis is done in one step and is very fast. The iron oxide NPs obtained thanks to this synthesis are monodispersed, with a good colloidal stability. In addition, these NPs were compared with NPs resulting from a conventional co-precipitation. The NPs resulting from the microwave synthesis are better dispersed than NPs resulting from the conventional coprecipitation and with a narrower size distribution. Moreover, an aggregation of the NPs is more present with the coprecipitation synthesis than with the microwave synthesis: the using of microwave makes it possible to increase the monodispersity of NPs. The using of microwaves did not affect the physico-chemical properties of NPs: thanks to this synthesis, we can therefore obtain iron oxide nanoparticles more quickly, without aggregation, with good crystallinity. Finally, we have demonstrated the superparamagnetic nature of these NPs obtained with a microwave process: these nanoparticles are so a good candidate for biomedical applications such as contrast agent for MRI.

References

[1] Teja, A.S.; Koh, P.-Y. Synthesis, Properties, and Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, **2009**, *55*, 22–45.

[2] Yang, J.; Park, S.; Yoon, H.; Huh, Y.; Haam, S. Preparation of Poly Ɛ-Caprolactone Nanoparticles Containing Magnetite for Magnetic Drug Carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, **2006**, *324*, 185–190.

[3] Zhou, L.; Yuan, J.; Yuan, W.; Sui, X.; Wu, S.; Li, Z.; Shen, D. Synthesis, Characterization, and Controllable Drug Release of PH-Sensitive Hybrid Magnetic Nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2009**, *321*, 2799–2804.

[4] Hu, F.X.; Neoh, K.G.; Kang, E.T. Synthesis and in Vitro Anti-Cancer Evaluation of Tamoxifen-Loaded Magnetite/PLLA Composite Nanoparticles. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 5725–5733.

[5] de Sousa, M.E.; Fernández van Raap, M.B.; Rivas, P.C.; Mendoza Zélis, P.; Girardin, P.; Pasquevich, G.A.; Alessandrini, J.L.; Muraca, D.; Sánchez, F.H. Stability and Relaxation Mechanisms of Citric Acid Coated Magnetite Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia. *J. Phys. Chem. C*, **2013**, *117*, 5436–5445.

[6] Xu, H.; Aguilar, Z.P.; Yang, L.; Kuang, M.; Duan, H.; Xiong, Y.; Wei, H.; Wang, A. Antibody Conjugated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cancer Cell Separation in Fresh Whole Blood. *Biomaterials*, **2011**, *32*, 9758–9765.

[7] Ma, Z.; Liu, H. Synthesis and Surface Modification of Magnetic Particles for Application in Biotechnology and Biomedicine. *China Particuology*, **2007**, *5*, 1–10.

[8] Sun, S.; Zeng, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 8204–8205.

[9] Shavel, A. Shape Control of Iron Oxide Nanoparticles. **2009**, 7.

[10] Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E. Magnetic Nanoparticle Design for Medical Diagnosis and Therapy. *J. Mater. Chem.*, **2004**, *14*, 2161.

[11] Giri, S.; Samanta, S.; Maji, S.; Ganguli, S.; Bhaumik, A. Magnetic Properties of α-Fe2O3 Nanoparticle Synthesized by a New Hydrothermal Method. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2005**, *285*, 296–302.

[12] Freire, T.M.; Dutra, L.M.U.; Queiroz, D.C.; Ricardo, N.M.P.S.; Barreto, K.; Denardin, J.C.; Wurm, F.R.; Sousa, C.P.; Correia, A.N.; de Lima-Neto, P.; Fechine, P.B.A. Fast Ultrasound Assisted Synthesis of Chitosan-Based Magnetite Nanocomposites as a Modified Electrode Sensor. *Carbohydrate Polymers*, **2016**, *151*, 760–769.

[13] Masthoff, I.-C.; Kraken, M.; Mauch, D.; Menzel, D.; Munevar, J.A.; Baggio Saitovitch, E.; Litterst, F.J.; Garnweitner, G. Study of the Growth Process of Magnetic Nanoparticles Obtained via the Non-Aqueous Sol–Gel Method. *J Mater Sci*, **2014**, *49*, 4705–4714.

[14] Woo, K.; Hong, J.; Choi, S.; Lee, H.-W.; Ahn, J.-P.; Kim, C.S.; Lee, S.W. Easy Synthesis and Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Mater.*, **2004**, *16*, 2814–2818.

[15] Petcharoen, K.; Sirivat, A. Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles via the Chemical Co-Precipitation Method. *Materials Science and Engineering: B*, **2012**, *177*, 421–427.

[16] Baaziz, W.; Pichon, B.P.; Fleutot, S.; Liu, Y.; Lefevre, C.; Greneche, J.-M.; Toumi, M.; Mhiri, T.; Begin-Colin, S. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Reproducible Tuning of the Size and Nanosized-Dependent Composition, Defects, and Spin Canting. *The Journal of Physical Chemistry C*, **2014**, *118*, 3795–3810.

[17] Teja, A.S.; Koh, P.-Y. Synthesis, Properties, and Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, **2009**, *55*, 22–45.

[18] Zhang, L.; He, R.; Gu, H.-C. Oleic Acid Coating on the Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Applied Surface Science*, **2006**, *253*, 2611–2617.

[19] Mourdikoudis, S.; Liz-Marzán, L.M. Oleylamine in Nanoparticle Synthesis. *Chem. Mater.*, **2013**, *25*, 1465–1476.

[20] Khandhar, A.P.; Keselman, P.; Kemp, S.J.; Ferguson, R.M.; Goodwill, P.W.; Conolly, S.M.; Krishnan, K.M. Evaluation of PEG-Coated Iron Oxide Nanoparticles as Blood Pool Tracers for Preclinical Magnetic Particle Imaging. *Nanoscale*, **2017**, *9*, 1299–1306.

[21] Fiume, M.M.; Heldreth, B.A.; Bergfeld, W.F.; Belsito, D.V.; Hill, R.A.; Klaassen, C.D.; Liebler, D.C.; Marks, J.G.; Shank, R.C.; Slaga, T.J.; Snyder, P.W.; Andersen, F.A. Safety Assessment of Citric Acid, Inorganic Citrate Salts, and Alkyl Citrate Esters as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol*, **2014**, *33*, 16S-46S.

[22] Krebs, H.A. The History of the Tricarboxylic Acid Cycle. *Perspectives in Biology and Medicine*, **1970**, *14*, 154–172.

[23] LaMer, V.K.; Dinegar, R.H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, *72*, 4847–4854.

[24] Zhao, B.; Shao, G.; Fan, B.; Zhao, W.; Xie, Y.; Zhang, R. Synthesis of Flower-like CuS Hollow Microspheres Based on Nanoflakes Self-Assembly and Their Microwave Absorption Properties. *J. Mater. Chem. A*, **2015**, *3*, 10345–10352.

[25] Liao, X.; Zhu, J.; Zhong, W.; Chen, H.-Y. Synthesis of Amorphous Fe2O3 Nanoparticles by Microwave Irradiation. *Materials Letters*, **2001**, *50*, 341–346.

[26] Schanche, J.-S. Microwave Synthesis Solutions from Personal Chemistry. *Mol Divers*, **2003**, *7*, 291–298.

[27] Abràmoff, D.M.D. Image Processing with ImageJ. 7.

[28] Lim, J.; Yeap, S.P.; Che, H.X.; Low, S.C. Characterization of Magnetic Nanoparticle by Dynamic Light Scattering. *Nanoscale Res Lett*, **2013**, *8*, 381.

[29] Bruvera, I.J.; Mendoza Zélis, P.; Pilar Calatayud, M.; Goya, G.F.; Sánchez, F.H. Determination of the Blocking Temperature of Magnetic Nanoparticles: The Good, the Bad, and the Ugly. *Journal of Applied Physics*, **2015**, *118*, 184304.

[30] Roushenas, P.; Yusop, Z.; Majidnia, Z.; Nasrollahpour, R. Photocatalytic Degradation of Spilled Oil in Sea Water Using Maghemite Nanoparticles. *Desalination and Water Treatment*, **2016**, *57*, 5837–5841.

Chapitre 3

Optimisation du procédé micro-ondes par un plan d'expériences

Table des matières Chapitre 3

1. La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par micro-ondes 137

2. Description et construction du plan d'expériences 138

2.1. Définitions 138

2.2. Choix des facteurs et des niveaux 138

2.3. Choix de la table 139

2.4. Déroulement des essais : reproductibilité et répétabilité 141

2.5. Choix des réponses 141

3. Caractérisation d'un essai issu du plan d'expériences pour déterminer les réponses 142

3.1. Microscopie électronique en transmission 143

3.2. Diffusion dynamique de la lumière 144

3.3. Diffraction des Rayons X 144

3.4. Spectroscopie infra-rouge 145

3.5. Analyses thermiques 146

3.6. Caractérisations magnétiques 147

4. Déroulement et statistiques permettant de déterminer les paramètres optimums du micro-ondes 149

5. Amélioration d'un dernier paramètre de synthèse : le lavage des nanoparticules 149

5.1. Préparation du plan d'expériences : choix des facteurs, des niveaux et des réponses 149

5.2. Exploitation du plan d'expériences 152

6. Conclusion générale du chapitre 3 154

7. Bibliographie Chapitre 3 156

Dans le chapitre 2, la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques a été réalisée selon deux méthodes de synthèse : une classique avec ajout de ligands pour diminuer l'agrégation via une méthode de coprécipitation et une nouvelle approche avec ce même ajout de ligands mais avec un chauffage micro-ondes. Cette dernière méthode permet d'augmenter de façon significative la monodispersité de ces nanoparticules en milieu aqueux.

La synthèse micro-ondes a été développée à partir des années 1990 pour les molécules organiques et à partir des années 2000 pour les composés inorganiques [1–3]. De nombreuses études expliquent et décrivent cette méthode de synthèse, notamment pour les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. Cependant, peu de publications traitent de l'effet des paramètres du micro-ondes sur la synthèse de nanoparticules. L'objet de ce chapitre est donc d'étudier l'influence de ces paramètres internes sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules. Afin de pouvoir étudier tous ces paramètres à différentes valeurs, un plan d'expériences a été réalisé.

Dans ce chapitre, la construction de ce plan d'expériences (PE) sera détaillée ainsi que son intérêt dans les synthèses chimiques. Puis, après avoir donné les définitions de répétabilité ainsi que de reproductibilité, une analyse complète d'une synthèse de nanoparticules issue de ce plan sera détaillée. Ensuite, le détail complet du plan d'expériences ainsi que les résultats statistiques seront décrits dans une publication (« One step superparamagnetic iron oxide nanoparticles by a microwave process: optimization of microwave parameters with an experimental design »). Enfin, suite à ces expériences, l'optimisation de l'étape de lavage des nanoparticules a fait l'objet d'un plan d'expériences également.

1. La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par micro-ondes

Le protocole de synthèse utilisé ici est le même que celui décrit dans le chapitre 2. Un mélange de chlorure ferreux $FeCl_2.4H_2O$ (5,03 mmol) et de chlorure ferrique $FeCl_3.6H_2O$ (3,70 mmol) est réalisé dans une solution d'eau ultrapure (15 mL) en présence du ligand, l'acide citrique $C_6H_8O_7$ (3,16 mmol). Une base, l'hydroxyde d'ammonium NH_4OH (5 mL), est ajouté pour atteindre le pH de précipitation des hydroxydes. La solution passe ainsi d'une couleur brune à une couleur noire, synonyme de la formation de particules d'oxyde de fer. Le milieu réactionnel est alors introduit dans le réacteur micro-ondes afin d'être chauffé. La solution est portée jusqu'à une température de consigne pour une durée définie puis est refroidie. Après refroidissement, la solution contenant les nanoparticules est collectée et est lavée afin d'éliminer un maximum de résidus de synthèse (des ligands non liés aux nanoparticules, des contre ions présents durant la synthèse). La première étape consiste en l'ajout d'éthanol absolu afin de solubiliser ces résidus de synthèse et non les nanoparticules, puis l'ensemble est centrifugé pendant cinq minutes à 10 000 tours/min. Le surnageant est éliminé et les nanoparticules sont collectées puis redispersées dans un mélange eau/éthanol pour un deuxième lavage (centrifugation similaire à la première étape). A la suite de ce deuxième lavage, le surnageant est de nouveau éliminé, les nanoparticules sont collectées et sont dispersées dans de l'eau ultrapure pour les conserver. Une partie de cette solution est prélevée et placée à l'étuve (80°C) pendant 24h afin d'évaporer un maximum de molécules d'eau pour obtenir une poudre. Cette poudre sera alors utilisée pour certaines caractérisations.

Dans ce chapitre, les paramètres propres au micro-ondes (c'est-à-dire la durée de la synthèse, la température, la puissance du micro-ondes et le moment d'agitation) sont modulés pour définir leur influence sur les paramètres physico-chimiques des nanoparticules. Avant d'expliquer le choix des différents paramètres et des différents niveaux étudiés pour chacun, quelques définitions et notions statistiques vont être développées pour comprendre la construction du plan d'expériences.

2. Description et construction du plan d'expériences

Les premiers plans d'expériences ont d'abord été utilisés dans le domaine de l'agronomie [4] puis dans d'autres domaines techniques, notamment en chimie [5,6]. Un plan d'expériences est une technique statistique qui permet d'évaluer l'influence de différents paramètres en un minimum d'essais. En effet, si le nombre de paramètres à étudier est grand, le nombre d'expériences qui en découlent augmente rapidement, notamment si ce paramètre varie selon plusieurs valeurs. Par exemple, si une étude conduit à regarder l'influence de six paramètres sur trois valeurs différentes par paramètre, il en découle 3^6 synthèses à réaliser soit 729 expériences. Le plan d'expériences va permettre de diminuer le nombre d'expériences avec des résultats représentatifs de la réalisation de toutes les expériences tout en minimisant l'influence de l'expérimentateur (L'erreur due à l'expérimentateur est diminué fortement si le nombre d'expérience diminue.). Grâce à la réduction du nombre d'expériences, la reproductibilité et la répétabilité peuvent être mis en avant.

2.1. Définitions

Pour obtenir les paramètres optimums du micro-ondes pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques, une méthode de plan d'expériences a été choisie. Pour définir ce plan, il faut tout d'abord définir les différents facteurs à différents niveaux. Puis, des essais vont être réalisés selon les modalités de départ afin d'obtenir des réponses.

- Facteurs : paramètres du système qui vont varier
- Niveaux : valeurs que vont prendre le facteur
- Essai : synthèse provenant du PE avec des facteurs et des niveaux définis
- Réponse : valeur numérique d'un paramètre caractérisant le système

2.2. Choix des facteurs et des niveaux

Comme expliqué précédemment, le but de ce plan d'expériences est d'obtenir les paramètres optimums du procédé micro-ondes pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. Pour cela, cinq paramètres internes du micro-ondes ont été pris en compte : la durée de la rampe de température (notée t_1 sur la Figure 3. 1), la température de la synthèse, la durée du plateau de température (notée t_2 sur la Figure 3. 1), la puissance du micro-ondes et le moment d'agitation. Ces cinq facteurs seront notés respectivement facteur A, B, C, D et E pour la suite

de ce chapitre. Pour la durée de la synthèse (c'est-à-dire pour le facteur A et C), une durée maximale d'une heure a été choisie afin de garder une durée raisonnable pour la synthèse. Pour cela, le facteur A varie de 5 minutes à 20 minutes et le facteur C de 10 minutes à 40 minutes. La synthèse de nanoparticules étant en solvant aqueux, des températures autour du point d'ébullition de l'eau ont été choisies allant de 80°C à 110°C. La puissance du micro-ondes est paramétrée pour être comprise entre 250 W et 850 W. Enfin, le moment d'agitation a été défini pour avoir lieu lors d'une des trois étapes de la synthèse (chauffage, palier de température ou refroidissement). Pour étudier au mieux ces facteurs, quatre niveaux par facteurs ont été définis :

- Facteur A : 5 min ; 10 min ; 15 min ; 20 min
- Facteur B : 80°C ; 90°C ; 100°C ; 110°C
- Facteur C : 10 min ; 20 min ; 30 min ; 40 min
- Facteur D : 250 W ; 450 W ; 650 W ; 850 W
- Facteur E : sans agitation ; agitation durant t_1 ; durant t_2 ; durant t_3

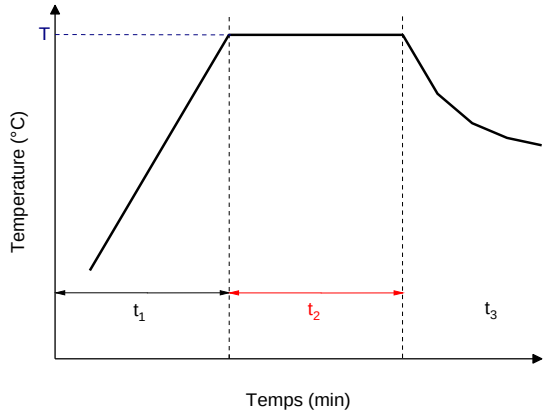


Figure 3. 1 : Schéma de la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques par voie micro-ondes.

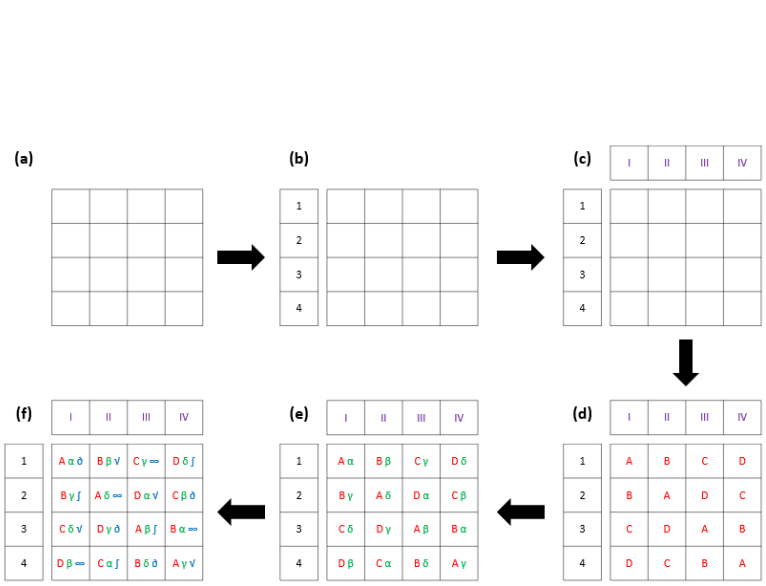
Considérant cinq facteurs avec quatre niveaux chacun, le nombre d'expériences correspond à 4^5 expériences soit 1024 synthèses de nanoparticules. Pour des raisons de praticité, une réduction du nombre d'expériences doit être envisagée en passant par un plan d'expériences.

2.3. Choix de la table

Après avoir définie le nombre de facteurs ainsi que le nombre de niveaux, un plan d'expériences compatible doit être sélectionné. Pour cela, l'utilisation des tables de Taguchi est fortement recommandée [5–7]. En effet, ces tables permettent d'avoir tous les niveaux de chaque facteur représenté de manière équitable au sein des essais tout en minimisant ce nombre d'essais. La table est alors dite orthogonale. Ainsi, pour un plan d'expériences avec cinq facteurs à quatre niveaux, la table utilisée est une table $L_{16}(4^5)$ c'est-à-dire qu'il faut donc au minimum seize essais pour étudier tous

les niveaux de tous les facteurs. Afin de construire notre plan d'expériences avec 16 essais en définissant pour chaque essai quel niveau attribuer, la procédure à effectuer est :

- Les seize essais sont disposés dans un carré de 4x4, chaque carré correspondant à un essai (Figure 3. 2.a) → Plan carré
- Chaque ligne de ce carré va correspondre à un niveau du facteur A (Figure 3. 2.b)
- Chaque colonne de ce carré va correspondre à un niveau du facteur B (Figure 3. 2.c)
- Chaque case du carré est complétée par les niveaux du facteur C (Figure 3. 2.d). Pour cela, un niveau doit être unique sur la ligne et la colonne où il se trouve → Plan carré latin
- Chaque case du carré est complétée par les niveaux du facteur D, de la même manière que le facteur C tout en évitant une redondance des couples, il ne peut y avoir deux fois la même combinaison entre les niveaux du facteur C et du facteur D (Figure 3. 2.e) → Plan carré gréco-latin
- Chaque case du carré est complétée par les niveaux du facteur E, de la même manière que le facteur C et D (Figure 3. 2.f) → Plan carré hyper gréco-latin



(g)

Essai	A (durée de la rampe de temperature en min)	B (température en °C)	C (durée du plateau de temperature en min)	D (puissance du micro-onde en W)	E (moment de l'agitation)
S1	1 (5 min)	I (80 °C)	A (10 min)	α (250 W)	∂ (sans)
S2	1 (5 min)	II (90 °C)	B (20 min)	β (450 W)	∨ (t_1)
S3	1 (5 min)	III (100 °C)	C (30 min)	γ (650 W)	∞ (t_2)
S4	1 (5 min)	IV (110 °C)	D (40 min)	δ (850 W)	∫ (t_3)
S5	2 (10 min)	I (80 °C)	B (20 min)	γ (650 W)	∫ (t_3)
S6	2 (10 min)	II (90 °C)	A (10 min)	δ (850 W)	∞ (t_2)
S7	2 (10 min)	III (100 °C)	D (40 min)	α (250 W)	∨ (t_1)
S8	2 (10 min)	IV (110 °C)	C (30 min)	β (450 W)	∂ (sans)
S9	3 (15 min)	I (80 °C)	C (30 min)	δ (850 W)	∨ (t_1)
S10	3 (15 min)	II (90 °C)	D (40 min)	γ (650 W)	∂ (sans)
S11	3 (15 min)	III (100 °C)	A (10 min)	β (450 W)	∫ (t_3)
S12	3 (15 min)	IV (110 °C)	B (20 min)	α (250 W)	∞ (t_2)
S13	4 (20 min)	I (80 °C)	D (40 min)	β (450 W)	∞ (t_2)
S14	4 (20 min)	II (90 °C)	C (30 min)	α (250 W)	∫ (t_3)
S15	4 (20 min)	III (100 °C)	B (20 min)	δ (850 W)	∂ (sans)
S16	4 (20 min)	IV (110 °C)	A (10 min)	γ (650 W)	∨ (t_1)

Figure 3. 2 : Construction d'un plan carré hyper gréco-latin de type 4^5 : création des 16 expériences (a) puis mise en place des 5 facteurs à 4 niveaux (b, c, d, e et f) et traduction des seize expériences (g).

Grâce à ce plan carré hyper gréco-latin, les seize essais ont pu être générés. Les conditions de chacun de ces essais sont décrites en Figure 3. 2.g. Dans la suite ce chapitre, les essais se nommeront SX avec X compris entre 1 et 16 et correspondant aux conditions de synthèse décrites en Figure 3. 2.g.

2.4. Déroulement des essais : reproductibilité et répétabilité

Afin que le plan d'expériences soit exploitable, tous les essais doivent se dérouler dans les mêmes conditions d'environnement. Il s'agit de minimiser le bruit, c'est-à-dire la dispersion des réponses de chaque essai. Pour ce faire, les conditions opératoires doivent être similaires pour éviter d'ajouter une influence à l'un des facteurs. Les seize essais ont donc été réalisés par le même opérateur et dans un ordre aléatoire.

Afin de s'assurer de la validité d'un essai avant de le caractériser, plusieurs points ont été vérifiés durant les synthèses comme l'obtention d'une solution noire à la fin de la synthèse (synonyme de présence de nanoparticules d'oxydes de fer), la présence d'un culot lors des étapes de lavage avec la centrifugeuse, l'obtention d'une poudre après évaporation pendant 24h à 80°C. Si un de ces critères n'était pas respecté, l'essai était réalisé de nouveau.

Pour qu'un plan d'expérience soit exploitable statistiquement, il doit être répété plusieurs fois pour permettre d'évaluer si des réponses sont identiques ou dues à une erreur humaine. Ce plan d'expériences a ainsi été réalisé en tripliqua par le même opérateur avec un intervalle d'une année entre chaque répliqua permettant d'évaluer la répétabilité du plan d'expériences. Dans la suite de ce chapitre, les essais issus du même opérateur seront nommés SX_{yA} avec X compris entre 1 et 16 (pour le numéro d'essai) et y = 1 ; 2 ; 3 pour correspondre au numéro de tripliqua de la première, deuxième ou troisième année.

Enfin, pour s'assurer de la pertinence statistique de ce plan d'expériences, un deuxième opérateur a réalisé ce plan d'expériences dans les mêmes conditions que le premier opérateur : la reproductibilité peut être ainsi vérifier. Ce deuxième opérateur était Morgane Kessler, étudiante en master 1 de chimie lorsqu'elle a réalisé ces expériences durant son stage sous l'encadrement de Thomas Girardet. Dans la suite de ce chapitre, les expériences réalisées par le deuxième expérimentateur seront nommées SX_{1B} avec X compris entre 1 et 16.

2.5. Choix des réponses

Les réponses des essais de ce plan d'expériences sont les données issues des différentes techniques de caractérisations utilisées. Pour vérifier l'influence des paramètres du micro-ondes sur la synthèse des nanoparticules, neuf réponses ont été sélectionnées et sont récapitulées dans le Tableau 3. 1. L'optimisation d'un paramètre implique que les réponses vont devoir atteindre des valeurs voulues pour l'utilisation des nanoparticules dans des applications données, notamment en tant qu'agent de contraste pour l'IRM.

Le diamètre moyen des nanoparticules obtenu grâce à la microscopie électronique en transmission est une réponse qui doit être maximisée. En effet, si la taille des nanoparticules est grande, les propriétés magnétiques seront plus importantes [8]. La taille des cristallites ainsi que le diamètre hydrodynamique doivent être maximisés.

Un des objectifs principaux de cette synthèse de nanoparticules est d'obtenir des nanoparticules monodisperses, c'est-à-dire d'obtenir des nanoparticules avec la même taille et la même forme : la déviation standard doit donc être minimisée. Pour le paramètre de maille, le but est de s'approcher de la valeur du paramètre de maille de la magnétite Fe_3O_4. En effet, la magnétite présente des moments magnétiques plus élevés que la maghémite γ-Fe_2O_3. Pour une bonne stabilité des nanoparticules au sein d'une solution aqueuse, le taux de ligands doit être aux alentours de 30%. En effet, si ce taux est inférieur à 25% environ, les nanoparticules auront tendance à sédimenter dans la solution. Si ce taux est supérieur à 35%, les nanoparticules vont être alors dans une matrice de ligands : les ligands ne sont donc pas greffés à la surface des nanoparticules et peuvent ainsi former des agrégats au cours du temps. Le taux idéal est donc compris entre 25 et 35% (soit une moyenne de 30% environ). Les aimantations à saturation à température ambiante (300K) et à 5K devront être maximisées. Enfin, la température de blocage (température de transition d'un état bloqué à un état superparamagnétique) est une réponse qui doit être minimisée. En effet, plus la température de blocage est élevée, plus le risque d'avoir une distribution de températures de blocage est importante et plus la distribution de tailles de nanoparticules est large (cf paragraphe 2.2.2 chapitre 1) [9].

Tableau 3. 1 : Tableau récapitulatif des différentes réponses pour le plan d'expériences.

Réponses	Abréviation	Valeur attendue	Technique utilisée
Diamètre moyen	d_{TEM}	Minimale	MET
Déviation standard	σ_{TEM}	Minimale	MET
Diamètre hydrodynamique	d_{DLS}	Maximale	DLS
Paramètre de maille	a_{XRD}	8,395 Å	DRX
Taille des cristallites	t_{XRD}	Maximale	DRX
Pourcentage de ligands	$\%_{lig}$	Environ 30%	ATG
Aimantation à saturation à 300K	M_S_300K	Maximale	Courbe d'aimantation M(H)
Aimantation à saturation à 5K	M_S_5K	Maximale	Courbe d'aimantation M(H)
Température de blocage	T_B	Minimale	Courbe d'aimantation M(T) (aussi appelé ZFC-FC)

Après avoir déterminé le plan d'expériences (choix des facteurs et de leurs niveaux, construction du plan d'expériences, choix des réponses, nombre de répétitions), une description des caractérisations pour un échantillon est détaillée dans la partie suivante.

3. Caractérisation d'un essai issu du plan d'expériences pour déterminer les réponses

Dans cette partie, la caractérisation multi-technique d'un échantillon pris au hasard et issu du plan d'expériences est décrite. L'échantillon en question est l'échantillon $S11_{3A}$. Les réponses issues de la caractérisation des autres essais (c'est-à-dire les 63 restants, 4*16 - 1 essai), sont présentés dans

l'article « One step superparamagnetic iron oxide nanoparticles by a microwave process: optimization of microwave parameters with an experimental design » à la fin de ce chapitre.

3.1. Microscopie électronique en transmission

Grâce à la microscopie, la présence éventuelle de nanoparticules agrégées peut être vérifiée directement. Cependant, cette agrégation peut être due lors du séchage de la grille lors du dépôt de la solution de nanoparticules. Pour l'échantillon $S11_{3A}$ (Figure 3. 3.a), les nanoparticules sont isolées les unes des autres, montrant ainsi l'absence d'agrégats. A l'aide de cette micrographie, la distribution de taille des nanoparticules peut être réalisée (Figure 3. 3.b). Les nanoparticules issues de la synthèse $S11_{3A}$ ont une distribution de taille assez étroite. Pour chaque distribution de taille, une fonction gaussienne est utilisée pour déterminer le diamètre des nanoparticules. Le diamètre moyen d'un essai est obtenu avec la moyenne des diamètres issus de trois micrographies différentes. Ainsi, pour l'essai $S11_{3A}$, le diamètre moyen est de 3,16 nm.

Pour obtenir la déviation standard d'un essai, la moyenne des trois déviations standards issus des trois micrographies de l'essai est calculée puis la déviation standard est calculée grâce à la largeur à mi-hauteur (FWHM pour Full Width at Half Maximum) de la fonction gaussienne selon l'équation 39 suivante

$$\sigma_{TEM} = \frac{FWHM}{2 \times \sqrt{2.\ln(2)}} \qquad \text{Eq.40}$$

Avec σ_{TEM} la déviation standard et FWHM la largeur à mi-hauteur de la fonction gaussienne.

Pour l'essai $S11_{3A}$, la déviation standard est de 0,92 nm. Ainsi, le diamètre moyen des nanoparticules issues des conditions de synthèse de l'essai $S11_{3A}$ est de 3,16 ± 0,92 nm.

(a) (b)

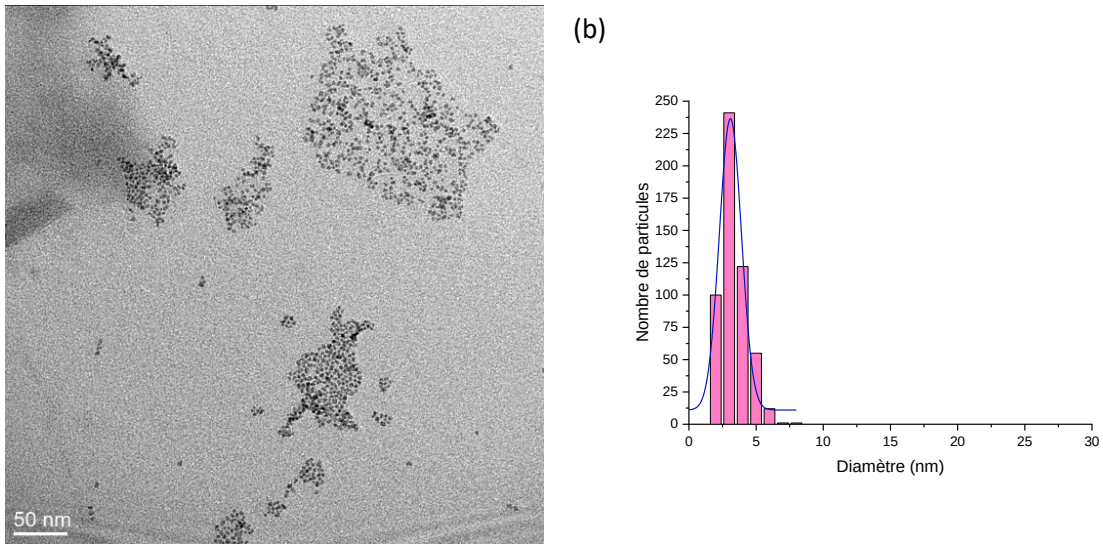


Figure 3. 3 : Micrographie MET de $S11_{3A}$ (a) et son histogramme de distribution de taille associé (b).

3.2. Diffusion dynamique de la lumière

Cette technique de caractérisation permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules : ce diamètre hydrodynamique est égal à la somme du diamètre du cœur inorganique, de la couche de ligand et de la sphère de solvatation. Ce diamètre hydrodynamique selon le nombre de nanoparticules, d_{DLS}, peut ainsi être comparé avec le diamètre obtenu par exploitation des images MET (Figure 3. 4). Sur la Figure 3. 4, d_{DLS} (symboles violet) est égal à 7,34 nm et est supérieur à d_{TEM} (3,16 nm, cette valeur est issue de la fonction gaussienne) : la présence de ligands autour des nanoparticules est ainsi confirmée. De plus, la présence que d'un seul pic pour la mesure de DLS, comme cela peut être constaté sur la Figure 3. 4, indique l'absence de phénomène d'agrégation au sein de la solution de nanoparticules.

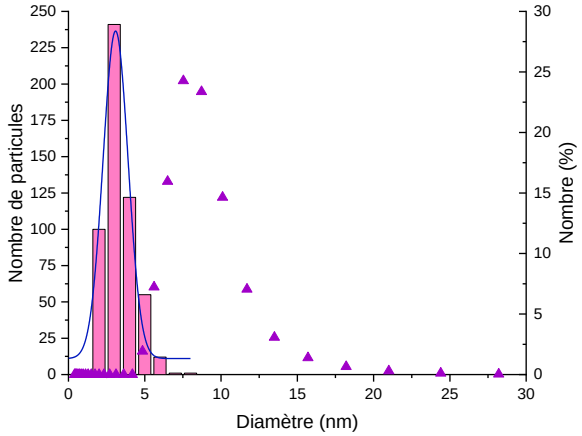


Figure 3. 4 : Histogramme de distribution de taille de $S11_{3A}$ ajusté d'une fonction gaussienne comparé avec une mesure de DLS en nombre (triangles).

3.3. Diffraction des Rayons X

Pour déterminer la structure cristalline et le paramètre de maille des différentes nanoparticules, la diffraction des rayons X est utilisée. Pour les échantillons issus du plan d'expériences et notamment $S11_{3A}$ (Figure 3. 5), les diffractogrammes présentent les cinq raies principales des oxydes de fer magnétite Fe_3O_4 et maghémite γ-Fe_2O_3. Comme cela a été montré dans le chapitre 1 (cf 1.2.1), ces deux oxydes de fer possèdent des diffractogrammes très similaires avec un léger décalage vers les hauts angles des raies principales pour la maghémite. Ce décalage est dû à la présence des lacunes dans la structure de la maghémite. Les matériaux étudiés étant à l'échelle nanométrique, les raies sont plus larges et il est impossible de différencier uniquement visuellement un diffractogramme de magnétite de celui de la maghémite ou de celui de la magnétite sous-stœchiométrique. Afin de déterminer au mieux la nature de l'oxyde de fer, un calcul du paramètre de maille, $a_{XRD,}$ est réalisé à l'aide des cinq raies principales des diffractogrammes.

Si il est égal à 8,395 Å, le cœur inorganique est composé de magnétite pure. Si il est égal à 8,354 Å, il est composée de maghémite pure. Enfin, si le paramètre de maille est compris entre ces deux valeurs,

le cœur de la nanoparticule sera de la magnétite sous-stœchiométrique. Pour l'échantillon $S11_{3A}$, le paramètre de maille est égal à 8,378 Å : le cœur est donc composé de magnétite sous stœchiométrique.

Grâce à ces diffractogrammes, il est également possible d'accéder à la taille des cristallites. En effet, les nanoparticules qui sont synthétisées ont des diamètres inférieurs à 9 nm et sont donc mono-domaine. Ainsi, une hypothèse peut être émise : la taille d'une cristallite, correspondant à la taille d'un domaine cristallographique, peut être assimilée à la taille de la nanoparticule. Cette taille de cristallite peut être calculée via la formule de Debye Scherrer :

$$t_{XRD} = \frac{k \times \lambda}{\sqrt{H^2 - s^2} \times \cos(\theta)} \qquad \text{Eq.41}$$

Avec t_{XRD} la taille des cristallites (nm), λ la longueur d'onde utilisée (ici, la longueur d'onde est celle de la cathode en cobalt et elle vaut 0,178886 nm), k un facteur de correction (0,9), H la largeur à mi-hauteur de la raie principale (311) en radian, s la largeur à mi-hauteur de la raie principale d'une référence de silicium en radian (s = 0,323°) et θ la position de la raie principale (°).

Pour l'échantillon $S11_{3A}$, la taille des cristallites vaut 3,64 nm et est en accord avec le diamètre obtenu via les micrographies (d_{TEM} = 3,16 nm).

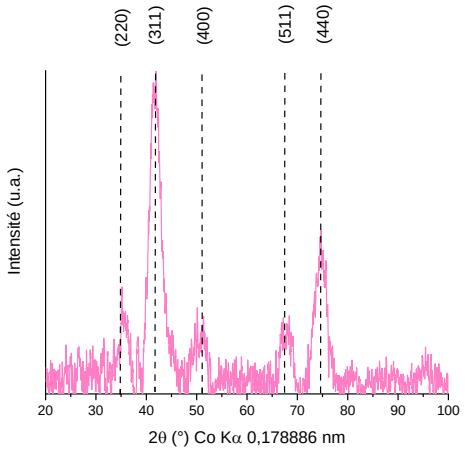


Figure 3. 5 : Diffractogramme de $S11_{3A}$ indexé avec les raies de la magnétite.

3.4. Spectroscopie infra-rouge

Pour caractériser la présence des ligands, la spectroscopie infra-rouge est utilisée. Pour la totalité des échantillons issus du plan d'expériences, notamment $S11_{3A}$ (Figure 3. 6), la présence du citrate est bien mise en évidence. En effet, les bandes caractéristiques sont présentes comme les élongations symétriques et asymétriques des groupements carboxylates à 1415 cm^{-1} et 1610 cm^{-1} respectivement.

De plus, à 1260 cm^{-1}, la bande correspondant à l'élongation de la liaison C-O du groupement carboxylate est présente. Enfin, une large bande entre 3500 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} est visible et correspond à l'élongation O-H du groupement hydroxyle du citrate et des molécules d'eau physisorbées. La présence de citrate est donc bien confirmée au sein des échantillons mais, pour le moment, rien ne prouve qu'il soit greffé à la nanoparticule. Pour déterminer cela, l'observation des bandes d'élongations symétriques et asymétriques des carboxylates est déterminante. Pour les groupements chimiques carboxylates en interaction avec le cœur inorganique, les bandes sont décalées vers les hauts nombres d'onde. Les bandes carboxylates du citrate pure se situant respectivement vers 1600 cm^{-1} et 1390 cm^{-1}, il y a bien un décalage de ces bandes vers les hauts nombres d'onde quand le citrate est couplé aux nanoparticules d'oxyde de fer [10].

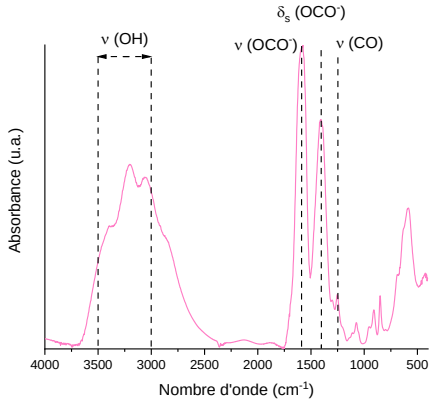


Figure 3. 6 : Spectre infra-rouge de $S11_{3A}$ avec les bandes principales caractéristiques du ligand (citrate).

3.5. Analyses thermiques

Pour déterminer la quantité de ligands dans l'échantillon et justifier la présence de citrate, des analyses thermogravimétriques sont réalisées de 20°C à 600°C, sous un flux d'air de 20 mL/min et avec une rampe de température de 10°C par minutes. Les thermogrammes enregistrés pour tous les échantillons issus du plan d'expériences présentent le même profil. Le thermogramme de l'échantillon $S11_{3A}$ est reporté en Figure 3. 7.a.

Trois étapes de décomposition apparaissent sur ce thermogramme :

- La première étape débute vers 30°C et finit vers 120°C. Cette étape correspond à l'évaporation des molécules d'eau adsorbées au sein de la poudre de l'échantillon. Pour $S11_{3A}$, la quantité d'eau est de 5% environ
- La deuxième étape et la plus importante commence vers 150°C et finit vers 230°C. Cette étape correspond à la dégradation du ligand. En effet, en comparaison avec le thermogramme de l'acide citrique (Figure 3. 7.b), cette perte de masse importante se situe dans la même gamme de température que celle observée pour l'acide citrique pure confirmant la présence de citrates autour des nanoparticules d'oxyde de fer. Lors de cette étape, une réaction de combustion entre l'air et les groupements carboxylates et hydroxyles du citrate se produit

pour former de l'eau et du dioxyde de carbone. Durant cette étape, la perte de masse est de 27% pour $S11_{3A}$

- La dernière étape commence vers 250°C et finit vers 500°C. Cette étape, identique à celle observée pour l'acide citrique, correspond à la combustion des chaînes carbonées restantes du ligand avec l'air pour former de nouveau du CO_2 et de l'eau H_2O. La masse de ces résidus carbonés correspond à 8% pour $S11_{3A}$

La quantité de ligands est donc, pour l'échantillon $S11_{3A}$, de 35% massique. Avec cette quantité de ligands, les nanoparticules sont stables en solution aqueuse et aucune sédimentation n'apparaît, même après redispersion de la poudre dans un milieu aqueux.

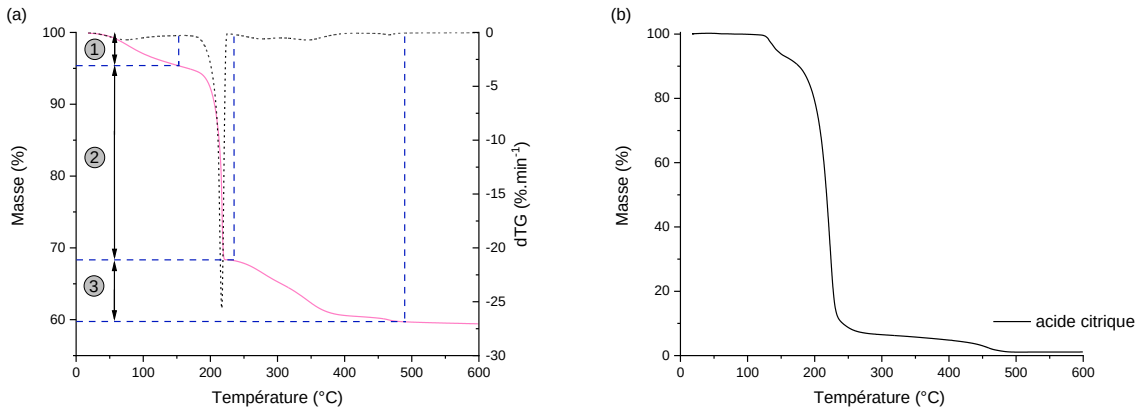


Figure 3. 7 : Courbe ATG de $S11_{3A}$ de 20°C à 600°C sous un flux d'air de 20mL/min (a) et de l'acide citrique (b).

3.6. Caractérisations magnétiques

La dernière technique pour caractériser au mieux les nanoparticules issues de ce plan d'expérience permet de déterminer le comportement magnétique des nanoparticules d'oxyde de fer. En effet, comme nous l'avons précisé dans le paragraphe 2.2.2 du chapitre 1, le caractère magnétique des nanoparticules d'oxyde de fer est dépendant de la taille. Pour les tailles des nanoparticules issues du plan d'expériences, le comportement magnétique devrait être un comportement de superparamagnétisme. En effet, le diamètre moyen des nanoparticules est compris entre 2,68 nm et 3,57 nm, soit inférieur au diamètre D_0. Pour confirmer cet état magnétique, des mesures du moment magnétique en fonction du champ magnétique appliqué (M(H)) sont réalisées à température ambiante (300K) et à très basse température (5K). A 300K, la courbe d'aimantation ne doit pas présenter d'ouverture de cycle (ou hystérèse) pour des nanoparticules dans un état de superparamagnétisme. Par contre, à 5K, le moment magnétique de chaque nanoparticule est dans un état bloqué qui peut être assimilé à un comportement de magnétisme coopératif entraînant une ouverture du cycle d'aimantation.

Pour l'échantillon $S11_{3A}$ (ainsi que pour tous les échantillons du plan d'expériences), le cycle d'aimantation ne présente aucune ouverture de cycle à température ambiante justifiant le caractère

superparamagnétique des nanoparticules (Figure 3. 8.a) et présente une ouverture à 5K (Figure 3. 8.b et Figure 3. 8.c). Avec ces courbes d'aimantation, l'aimantation à saturation peut être définie. Cette aimantation à saturation permet de connaître l'aimantation maximum de ces nanoparticules d'oxyde de fer. Cette valeur d'aimantation sera plus élevée pour un même échantillon à 5K qu'à 300K du fait de l'état bloqué des nanoparticules. Plus l'aimantation à saturation est élevée et se rapproche de 92 uem.g^{-1} à température ambiante, plus les nanoparticules se rapprochent d'une composition de magnétite Fe_3O_4 [11]. Pour l'échantillon $S11_{3A}$, l'aimantation à saturation à 300K est de 52 uem.g^{-1} (Figure 3. 8.a) et de 73 uem.g^{-1} à 5K (Figure 3. 8.b). En comparaison, les aimantations à saturation de référence de la magnétite et de la maghémite à température ambiante est de 92 uem.g^{-1} et de 74 uem.g^{-1} respectivement.

La dernière étape est de déterminer la température de transition entre cet état de superparamagnétisme et l'état bloqué des nanoparticules. Pour déterminer cela, des mesures de ZFC-FC pour Zero Field Cooled -Field Cooled sont réalisées. La température de transition, ou température de blocage T_B, est déterminée comme étant le maximum de la courbe ZFC (cf partie 2.2.2 du chapitre 1). Pour l'échantillon $S11_{3A}$, la courbe est montrée en Figure 3. 8.d. La température de blocage associée à cet échantillon est de 12K : à température ambiante, $S11_{3A}$ est donc superparamagnétique.

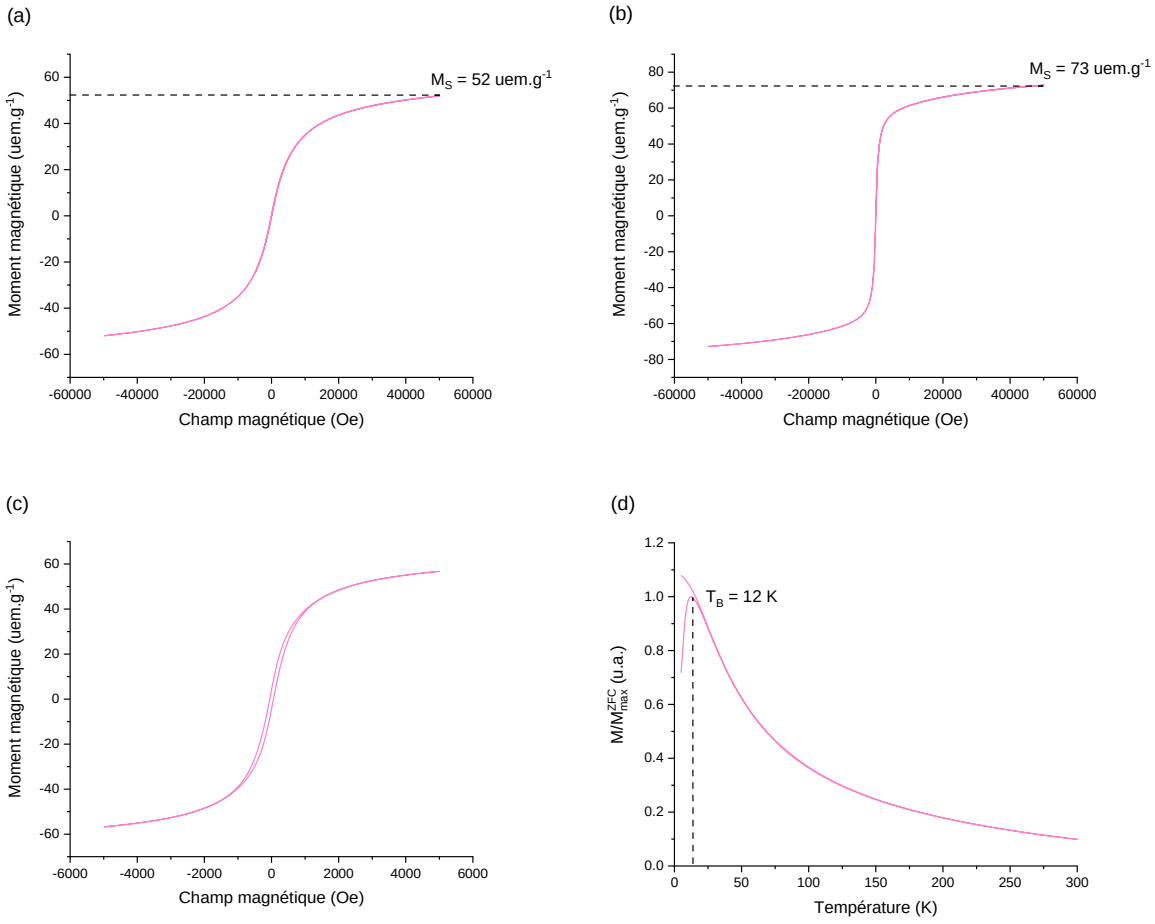


Figure 3. 8 : Courbes du moment magnétique en fonction du champ magnétique appliqué de $S11_{3A}$ à 300K (a), à 5K (b) et son agrandissement pour voir l'hystérèse (c) et courbe du moment magnétique en fonction de la température de $S11_{3A}$ (d).

Grâce à ces différentes techniques de caractérisations, nous obtenons les différentes réponses pour notre plan d'expériences. Avec ces réponses, les paramètres optimums du procédé de synthèse micro-ondes vont pouvoir être sélectionnés afin d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques optimisées pour des applications dans le domaine biomédical, notamment en tant qu'agent de contraste en IRM.

4. Déroulement et statistiques permettant de déterminer les paramètres optimums du micro-ondes

Dans cette partie, les statistiques établies par exploitation du plan d'expériences vont être décrites. Pour cela, les réponses de chaque essai vont être analysées et comparées entre elles selon le niveau du facteur afin de générer des diagrammes à effets. Ces derniers graphiques nous permettront de déterminer les paramètres voulues du micro-ondes. Avec les différentes réponses, des surfaces de réponses seront générées également pour nous permettre de visualiser les effets des paramètres du micro-ondes sur les différentes réponses.

Afin de valider d'un point de vue statistique ce plan d'expérience, des essais de validation ont été réalisés. Au total, six essais ont été sélectionnés : trois choisis de façon aléatoire et trois avec les réponses voulues (qui sont décrites dans le Tableau 3. 1).

Tous les détails statistiques et les résultats des essais issus de ce plan d'expérience se trouvent dans la publication « One step superparamagnetic iron oxide nanoparticles by a microwave process: optimization of microwave parameters with an experimental design », présente à la fin de ce chapitre.

La réalisation de ce plan d'expériences a notamment montré qu'un des paramètres clés pour contrôler les propriétés physico-chimiques des nanoparticules est le pourcentage de ligands en surface des nanoparticules. Afin de contrôler au mieux ce pourcentage, un ajustement des paramètres de lavage est possible pour moduler le pourcentage de ligands ou atteindre une valeur ciblée. Pour définir au mieux les paramètres de lavage, un nouveau plan d'expériences a été réalisé.

5. Amélioration d'un dernier paramètre de synthèse : le lavage des nanoparticules

5.1. Préparation du plan d'expériences : choix des facteurs, des niveaux et des réponses

Après avoir optimisé les paramètres du micro-ondes, une dernière étape de synthèse reste à optimiser : le lavage des nanoparticules. En effet, cette étape est un passage obligatoire après la synthèse afin d'avoir des nanoparticules les plus propres possibles. Cependant, dans la littérature, cette étape est très peu décrite alors qu'elle est très importante.

Du fait de la présence de la couche de ligands (citrates) autour des nanoparticules, toutes les méthodes de lavages ne sont pas en prendre en compte. En effet, si la méthode de lavage est inadaptée, une dénaturation de la couche de ligands peut se produire entraînant ainsi une agrégation des nanoparticules (le lavage est trop fort) ou des contre ions ainsi que des molécules parasites peuvent rester dans la solution et générer des réactions non voulues au sein de l'organisme vivant lors des applications biomédicales (le lavage est trop faible). Afin d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer les plus propres possibles sans dégradation de la couche de fonctionnalisation, un plan d'expériences a été réalisé pour déterminer les paramètres optimums du lavage. Le lavage sélectionné pour éviter toute dégradation de la couche organique est une méthode par SSP et par centrifugation : ces deux méthodes couplées vont permettre d'éliminer au mieux les résidus de synthèse présents dans les solutions.

Le lavage des nanoparticules se déroule en deux étapes. La solution provenant du réacteur micro-ondes est divisée en deux tubes de centrifugation et de l'éthanol absolu est ajouté dans ces deux tubes afin de compléter à 20 mL de solution totale. L'éthanol va jouer le rôle de « mauvais » solvant : les nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des citrates ne vont donc pas se disperser dans ce solvant. Les deux tubes sont ensuite centrifugés pendant cinq minutes à 10 000 tours/min. Lors de la centrifugation, les nanoparticules vont alors sédimenter et se coller à la paroi du tube alors que les molécules parasites vont se disperser dans l'éthanol. A la fin de la centrifugation, le surnageant est éliminé afin de conserver uniquement le culot contenant les nanoparticules. Un deuxième lavage est effectué pour permettre d'éliminer un maximum de résidus de synthèse. Pour cela, le culot contenant les nanoparticules est redispersé dans 7 mL d'eau ultrapure (l'eau joue le rôle de « bon » solvant, c'est-à-dire de solvant dans lequel les nanoparticules peuvent se disperser) et 14 mL d'éthanol absolu sont ajoutés dans les tubes. Les tubes subissent une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions que la première (soit 10 000 tours/min pendant cinq minutes). Le surnageant est de nouveau éliminé et le culot est redispersé dans de l'eau ultrapure afin d'y être conservé pour des analyses ultérieures.

Pour ce plan d'expériences, quatre facteurs ont été sélectionnés pour être optimisés lors des étapes de lavage :

- Temps de centrifugation (facteur F)
- Vitesse de centrifugation (facteur G)
- Nature du « mauvais » solvant (facteur H) → cette variable sera discrète
- Le ratio entre le « bon » et le « mauvais » solvant (facteur I)

Le nombre de centrifugations n'a pas été sélectionné comme facteur car, au-delà de deux centrifugations, une agrégation systématique des nanoparticules se produisait, synonyme d'une dégradation de la couche organique.

Pour chacun des quatre facteurs, trois niveaux ont été choisis :

- Facteur F : 5 min ; 10 min ; 15 min
- Facteur G : 5000 tours/min ; 10 000 tours/min ; 15 000 tours/min
- Facteur H : éthanol 96% ; éthanol 99% ; acétone (variable discrète)

- Facteur I : ratio de 1 volume de « bon » solvant pour 4 volumes de « mauvais » solvant ; ratio 1 pour 3 ; ratio 1 pour 2

En raison du nombre de niveaux et du nombre de facteurs, un plan $L_9(3^4)$ est envisagé : neuf essais de lavage ont donc été réalisés. Ces neuf expériences vont ainsi pouvoir simuler 81 essais, permettant donc de définir les paramètres optimums pour le lavage des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. Les synthèses préalables sont réalisées selon le protocole décrit dans le chapitre 2. Afin de minimiser les erreurs dues aux synthèses, seulement trois synthèses ont été effectuées permettant de réaliser trois essais de lavage du plan d'expériences et un témoin. Ce témoin est le lavage décrit précédemment et celui qui a été réalisé pour toutes les synthèses du plan d'expériences sur l'optimisation des paramètres du micro-ondes. Pour générer le plan d'expériences, c'est-à-dire définir les niveaux de chaque facteur pour chaque essai, un plan gréco latin a été utilisé (identique à celui pour les paramètres du micro-ondes, cf Figure 3. 2.a à Figure 3. 2.e). Un récapitulatif des différents essais en fonction des niveaux de chaque facteur est présent en Tableau 3. 2.

Tableau 3. 2 : Tableau récapitulatif des conditions de lavage pour le plan d'expériences.

Essai	F (temps de centrifugation en min)	G (vitesse de centrifugation en tours/min)	H (nature du mauvais solvant)	I (ratio bon/mauvais solvant)
L1	1 (5 min)	1 (5 000 tours/min)	1 (éthanol 96%)	1 (1/4)
L2	1 (5 min)	2 (10 000 tours/min)	2 (éthanol 99%)	2 (1/3)
L3	1 (5 min)	3 (15 000 tours/min)	3 (acétone)	3 (1/2)
L4	2 (10 min)	1 (5 000 tours/min)	2 (éthanol 99%)	3 (1/2)
L5	2 (10 min)	2 (10 000 tours/min)	3 (acétone)	1 (1/4)
L6	2 (10 min)	3 (15 000 tours/min)	1 (éthanol 96%)	2 (1/3)
L7	3 (15 min)	1 (5 000 tours/min)	3 (acétone)	2 (1/3)
L8	3 (15 min)	2 (10 000 tours/min)	1 (éthanol 96%)	3 (1/2)
L9	3 (15 min)	3 (15 000 tours/min)	2 (éthanol 99%)	1 (1/4)

Pour ce plan d'expériences, trois réponses selon les ligands ont été sélectionnées : le pourcentage de ligands obtenue grâce aux analyses thermiques, le diamètre hydrodynamique déterminé avec la DLS

et le rapport de la bande d'élongation asymétrique du groupement carboxylate COO^- à 1610 cm^{-1} et de la bande d'élongation de la liaison Fe-O à 580 cm^{-1} caractérisé en spectroscopie IR.

5.2. Exploitation du plan d'expériences

Les réponses pour ce plan d'expériences sont obtenues grâce aux mesures ATG, DLS et spectroscopie IR et sont résumées dans le Tableau 3. 3. Avant toutes choses, les réponses des témoins sont comparées afin de vérifier si les synthèses sont identiques ou non : pour toutes les réponses, les témoins présentent les mêmes valeurs justifiant ainsi que les synthèses sont identiques. Afin de déterminer les paramètres optimums, un diagramme à effets est réalisé pour chaque réponse en fonction des niveaux des différents facteurs (Figure 3. 9). Pour générer ces diagrammes à effets, les réponses de chaque niveau d'un facteur sont moyennées et sont reportées. Les variations entre les différents niveaux pour chaque réponse sont donc révélées. Par exemple, pour le pourcentage de ligands, une grande variation se produit quand le temps de centrifugation passe de 5 minutes à 10 minutes : le pourcentage de ligands passe ainsi de 35% à 24% (Figure 3. 9.a).

Tableau 3. 3 : Tableau des réponses (pourcentage de ligand, diamètre hydrodynamique et ratio des bandes infrarouges) du plan d'expériences.

Essai	Ligands (%)	Diamètre hydrodynamique (nm)	Ratio I_{1610}/I_{580}
L1	38	37,70	1,02
L2	42	10,00	1,06
L3	26	44,64	0,99
L4	25	9,56	0,96
L5	24	44,68	0,94
L6	22	43,06	0,96
L7	36	28,93	1,16
L8	35	15,80	1,25
L9	39	9,25	1,13

Le but de ce plan d'expériences est de laver au maximum les nanoparticules d'oxyde de fer sans dégrader la couche de ligands. Il faut donc maximiser le taux de ligands (Figure 3. 9.a), minimiser le diamètre hydrodynamique (Figure 3. 9.b) et posséder un rapport I_{1610}/I_{580} supérieur à 1 (Figure 3. 9.c). Ainsi, pour le pourcentage de ligands, les paramètres optimums de lavage sont des centrifugations de cinq ou de quinze minutes, à 10 000 tours/min, avec de l'éthanol 99% comme « mauvais » solvant et un ratio de 1/4 ou de 1/3. Pour le diamètre hydrodynamique, il faudrait une centrifugation de 15 min à 10 000 tours par minute, avec de l'éthanol 99% et un ratio de 1/3 ou de 1/2. Enfin, pour le rapport des intensités des bandes, le lavage doit être de 5 ou de 15 min, de préférence à 10 000 tours par minutes avec de l'éthanol 96% et avec un ratio de 1/3 ou 1/2.

En fonction de nos trois réponses de notre plan d'expériences, les paramètres optimums seraient une centrifugation de 5 minutes (préféré à 15 minutes pour une question de temps), à 10 000 tours par minutes, avec de l'éthanol 99 % comme « mauvais » solvant et avec 1 volume de bon solvant pour 2

ou 3 volumes de mauvais solvant. Ce plan d'expériences n'ayant été réalisé qu'une seule fois, il n'y a donc pas de répétabilité des essais. Cela se traduit par la présence de grandes valeurs d'écart-type donnant lieu à des aberrations. En effet, sur la Figure 3. 9.b, la valeur du diamètre hydrodynamique pour l'éthanol à 99% est de 9,61 nm ± 15,55 nm induisant l'apparition de valeurs négatives de diamètre hydrodynamiques. Ce plan d'expériences devrait être répété au minimum deux fois afin de minimiser les erreurs dues à l'expérimentation et afin de pouvoir éliminer grâce à un test de Dixon les valeurs extrêmes aberrantes.

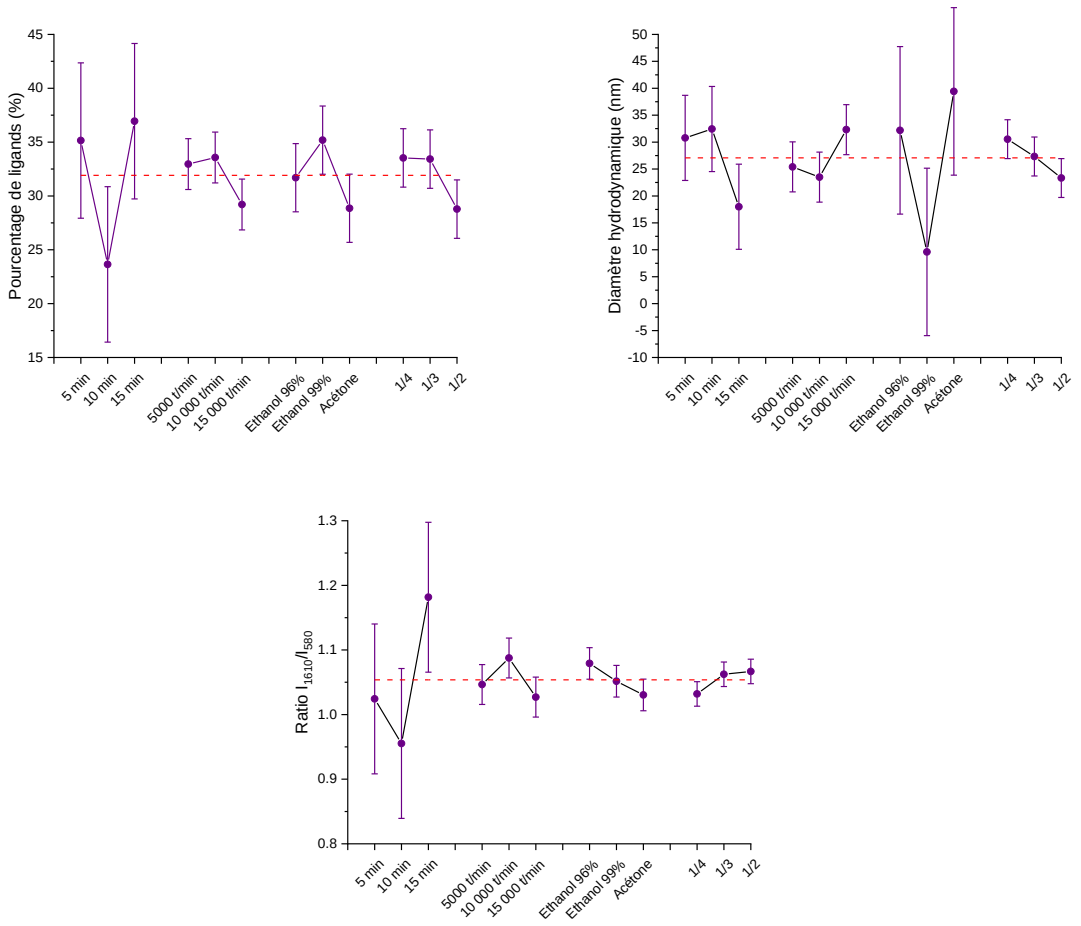


Figure 3. 9 : Diagrammes à effets des différents niveaux de chaque facteur pour le pourcentage de ligands (a), le diamètre hydrodynamique (b) et le ratio I_{1610}/I_{580} (c) avec la moyenne représentée par la ligne en pointillé rouge.

6. Conclusion générale du chapitre 3

Dans ce chapitre, la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques à l'aide du procédé micro-ondes a été détaillée, notamment l'optimisation des paramètres internes du micro-ondes. En effet, de plus en plus de synthèses au micro-ondes décrites dans la littérature détaillent l'influence des précurseurs (ici quantité de fer II, quantité de fer III, …) mais aucune ne détaille l'influence des paramètres du micro-ondes sur cette synthèse. Afin de comprendre ces influences, un plan d'expériences a été mis en œuvre. Ce plan a pour but d'identifier un maximum d'influences des différents facteurs sur les réponses des essais tout en minimisant ce nombre d'essais. Ainsi, pour vérifier l'influence de cinq facteurs avec quatre niveaux chacun, un plan hyper gréco-latin, basé sur la table de Taguchi $L_{16}(4^5)$, a permis de réduire de 1024 essais (soit 4^5) à seulement 16 essais.

Grâce à cette réduction du nombre d'essais, des répétitions du plan d'expériences ont pu être réalisées pour réduire les erreurs dues aux expériences. Ce plan d'expériences a donc été répété quatre fois : trois fois par le même expérimentateur et une fois par un deuxième expérimentateur. Ces répétitions ont permis ainsi de justifier la répétabilité ainsi que la reproductibilité de cette synthèse au micro-ondes.

Avec ce plan d'expériences, nous avons pu observer l'influence du temps de la synthèse (temps de la rampe et temps du plateau), de la température de la synthèse, de la puissance du micro-ondes et du moment d'agitation sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules synthétisées. Des réponses issues des différentes techniques de caractérisation (MET, DLS, DRX, ATG, mesures magnétiques) ont permis de générer des diagrammes à effets, mettant ainsi en avant les paramètres influençant fortement ou non les propriétés physico-chimiques des nanoparticules. Toutes les nanoparticules issues de ce plan d'expériences sont d'un diamètre moyen compris entre 2,68 nm ± 0,92 nm et 3,57 nm ± 1,02 nm, ont toutes une composition de magnétite sous-stœchiométrique $Fe_{3-\delta}O_4$, possèdent une couche de ligands (citrate) physisorbés à la surface du cœur inorganique et présentent un caractère superparamagnétique. Grâce à ces différentes réponses, une moyenne est calculée en fonction des différents niveaux de chaque facteur afin d'obtenir des diagrammes à effets : ces diagrammes nous permettent d'identifier directement les niveaux des facteurs influençant sur les nanoparticules. Ainsi, pour notre plan d'expériences, les paramètres optimums afin d'obtenir des nanoparticules pour une utilisation en tant qu'agent de contraste sont une température aux alentours de 100°C, une durée pour la rampe de 20 minutes, une durée du plateau de température de 40 minutes et une puissance du micro-ondes à 850W. Quant au moment d'agitation, les données issues du plan d'expériences préconisent l'absence d'agitation. Cependant, une agitation durant toute la synthèse est obligatoire pour permettre une augmentation de la monodispersité des nanoparticules.

Enfin, un plan d'expériences sur le lavage a été réalisé. En effet, cette étape est très importante pour obtenir des nanoparticules les plus propres possibles avec un taux de ligands contrôlé. Le lavage des nanoparticules a été réalisé par centrifugation et sélection de taille par précipitation (procédé SSP). Les facteurs à optimiser étaient le temps de centrifugation, la vitesse de centrifugation, la nature du « mauvais » solvant et le ratio entre le volume du « bon » solvant et du « mauvais » solvant. Après analyse des diagrammes à effets, le lavage optimum est de laver les nanoparticules à une vitesse de

10 000 tours par minute, pendant 5 minutes, en utilisant de l'éthanol 99% comme mauvais solvant et avec un ratio de 1/3. Cependant, ce plan d'expériences doit être réalisé à nouveau au minimum deux fois afin de minimiser les erreurs dues aux expériences.

7. Bibliographie Chapitre 3

[1] Kappe, C.O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6250–6284.

[2] Liao, X.; Zhu, J.; Zhong, W.; Chen, H.-Y. Synthesis of Amorphous Fe2O3 Nanoparticles by Microwave Irradiation. *Materials Letters*, **2001**, *50*, 341–346.

[3] Nüchter, M.; Ondruschka, B.; Bonrath, W.; Gum, A. Microwave Assisted Synthesis – a Critical Technology Overview. *Green Chem.*, **2004**, *6*, 128–141.

[4] Yates, F. The Design and Analysis of Factorial Experiments. **1937**.

[5] Kackar, R.N.; Shoemaker, A.C. Robust Design: A Cost-Effective Method for Improving Manufacturing Processes. *AT&T technical journal*, **1986**, *65*, 39–50.

[6] Kackar, R.N. Off-Line Quality Control, Parameter Design, and the Taguchi Method. *journal of Quality Technology*, **1985**, *17*, 176–188.

[7] Goupy, J. *Plans d'expériences*; Ed. Techniques Ingénieur, **2006**.

[8] Wahsner, J.; Gale, E.M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chemical reviews*, **2018**, *119*, 957–1057.

[9] Huang, J.-H.; Parab, H.J.; Liu, R.-S.; Lai, T.-C.; Hsiao, M.; Chen, C.-H.; Sheu, H.-S.; Chen, J.-M.; Tsai, D.-P.; Hwu, Y.-K. Investigation of the Growth Mechanism of Iron Oxide Nanoparticles via a Seed-Mediated Method and Its Cytotoxicity Studies. *J. Phys. Chem. C*, **2008**, *112*, 15684–15690.

[10] Granath, T.; Mandel, K.; Löbmann, P. The Significant Influence of the PH Value on Citrate Coordination upon Modification of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Part & Part Syst Charact*, **2022**, *39*, 2100279.

[11] Chikazumi, S.; Chikazumi, S.; Graham, C.D. *Physics of Ferromagnetism*; Oxford University Press, **1997**.

One step superparamagnetic iron oxide nanoparticles by a microwave process: optimization of microwave parameters with an experimental design

Thomas Girardet[1], Morgane Kessler[1], Sylvie Migot[1], Lionel Aranda[1], Sébastien Diliberto[1], Stéphane Suire[1], Tom Ferté[1], Sébastien Hupont[1], Franck Cleymand[1], Solenne Fleutot[1]

1: Institut Jean Lamour, CNRS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France

Abstract

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are nanoparticles used in a lot of applications such as batteries, biomedical, … To obtain these nanoparticles, several techniques exist but they have some advantages and disadvantages. The goal of this work is to synthesize SPIONs for biomedical applications (for example as contrast agent for the MRI): SPIONs should be stable in an aqueous media, monodisperse and have good crystallinity and magnetic properties. To achieve this result, microwave process is carried out. However, any study describes the microwave parameter on the synthesis of the nanoparticles. This work offers to determine the best conditions of the microwave to obtain ideal SPIONs for MRI. For this, an experimental design is realized to determine these parameters thanks to different techniques of characterization (Transmission Electronic Microscopy, Dynamic Light Scattering, X-Ray Diffraction, Thermogravimetric Analysis, magnetic characterizations). With the different results of these characterizations, the best conditions of the microwave are determined and a simulation of all experiments is realised with a surface response.

Keywords: iron oxide nanoparticles, experimental design, superparamagnetism, microwave process

Introduction

The use of nanoparticles is becoming more and more common in various applications such as data storage[1], batteries[2], biomedical. Indeed, thanks to the high ratio between surface and volume, the nanoparticles are good candidates for these applications. For biomedical applications, nanoparticles are used for the diagnosis (medical imaging such as Magnetic Resonance Imaging MRI, Positron Emission Tomography PET)[3–5], for therapy (e.g. hyperthermia for the cancer treatment)[6,7] or both with the vectorization of an active substance with nanoparticles directly to damaged cells[8,9]. For this purpose, different nanoparticles can be used according to their properties, their biocompatibility and their no-toxicity. The most commonly used nanoparticles are silver, gold, gadolinium, iron[10–13].

In addition, thanks to the magnetic properties of certain elements, the possibility of used these nanoparticles in different fields is increasing. For example, magnetic nanoparticles are used as contrast agent (CA) for the MRI imaging to increase the contrast and to reduce the time of analysis. Gadolinium (Gd^{3+}) and iron oxide (Fe_3O_4) are the most important nanoparticles for this application[12,14,15]. Indeed, due to the strong magnetization, Gd^{3+} is one of the best contrast agents for MRI: the longitudinal relaxation time (called T_1) is shortened and so the signal strength is increasing. The main disadvantages is the toxicity of this paramagnetic centre in particular with the brain[16,17]. To avoid this toxicity, an

organic layer is grafted around the gadolinium core[18]. Another strategy consists to use iron oxide as CA for MRI imaging: this inorganic compound has a good magnetization[19,20]. They are different types of iron oxide but magnetite (Fe_3O_4) and maghemite (γ-Fe_2O_3) are often used due to their high magnetization. In addition, in function the size of the iron oxide nanoparticles, different magnetic behaviours are present. If the size is greater than 20 nm, iron oxide nanoparticles are in a ferrimagnetic state[21]. If the size is below than 20 nm, a superparamagnetic behaviour is present: the magnetization is zero when the applied magnetic field is equal to 0 Tesla. These nanoparticles with this magnetic state are used in MRI as CA: the transverse relaxation time (called T_2) is shorten and the signal strength is reduced[22]. These superparamagnetic iron oxide nanoparticles are good candidates as CA but several disadvantages remain such as the stability in a physiological media.

Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) can be synthesized by different methods such as coprecipitation[23–25], thermal decomposition[26,27], hydrothermal[28,29], sol-gel process[30] but each synthesis has its advantages and disadvantages and can modify the physico-chemical properties and therefore the desired applications. Indeed, SPIONs obtained by thermal decomposition have a narrow size distribution, a good crystallinity and the control of the size and the shape is easy[31,32]. However, SPIONs are stable in an organic media due to the ligands present around the inorganic core (generally fatty acid such as oleic acid, ….)[33,34].

For the biomedical applications, SPIONs must be stable in an aqueous media. The coprecipitation synthesis allows to obtain SPIONs stable in water. Indeed, this synthesis is one of the more used synthesis to obtain iron oxide nanoparticles because it is easy and quickly to obtain these nanoparticles[23–25]. A mixture of iron salts (usually a mixture of iron chloride II and iron chloride III) with a base is realised. But, with these conditions, SPIONs obtained by this technique are aggregate and without a control of the shape and the size. To overcome these problems, an addition of a ligand (polyvinyl alcohol PVA, polyethylene glycol PEG, citric acid, …) is necessary[35–37]. However, the control is not total with this addition and the distribution of size is still large. To decrease this size distribution, a new synthesis directly in water is developed since a few years: the microwave synthesis[38,39]. Thanks to the microwave irradiations, a control of the temperature within the reactor is carried out: this temperature control allows to obtain monodisperse SPIONs[40]. More and more publications about the synthesis of inorganic nanoparticles are published since 2000' but just a few publications talk about the microwave parameters and their influence on the synthesis and the physico-chemical properties of SPIONs[41]. Indeed, these parameters as time of the synthesis, the temperature, the power of the microwave and the stirring can modify several parameters of SPIONs (mean diameter, lattice parameter, saturation magnetization).

For MRI, SPIONs must have certain properties and therefore we must to control the parameter of the microwave. In this study, we want to investigate and predict the best parameters of the microwave on a synthesis of SPIONs. For this, a statistical approach is carried out with an experimental design[42–45]. The chemical conditions of the synthesis were reported previously and remained fixed for this study: only the microwave parameters were modified in this study[46]. All synthesis were operated in the same conditions. To predict the best conditions of microwave parameters, different characterization techniques are carried out. Then, with the answer of these techniques, a prediction of these answers was analysed to determine how SPIONs must be synthesized for MRI applications.

Materials and methods

Materials

Ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) and ferrous chloride ($FeCl_2.4H_2O$) were purchased from Alfa Aeser, citric acid ($C_6H_8O_7$), absolute ethanol and ammonium hydroxide (NH_4OH) were purchased from Sigma Aldrich. In all experiments, ultrapure water (resistivity = 18.2 MΩ.cm) was used.

Synthesis

For all experiment, the chemical conditions were fixed in order to see the influence of microwave parameters on the SPIONs synthesis. A solution of ferrous chloride ($FeCl_2.4H_2O$, 5.03 mmol), ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$, 3.70 mmol) and citric acid ($C_6H_8O_7$, 3.16 mmol) were mixed in ultrapure water in a Pirex reactor for microwave. Then, 5 mL of ammonium hydroxide (NH_4OH) is added to generate the precipitation of iron ions: the solution turns brown to black. The reactor is placed directly in the microwave. The microwave is a single mode microwave from Anton Paar (Monowave 400) which operates at a frequency of 2.45 GHz and with a maximum power of 850 W.

After heating, the solution is collected and washed several times to remove parasitic ions. For this, a first washing step is carried out with a mixture of absolute ethanol and nanoparticle solution. This mixture is centrifugated during 5 min at 10 000 rpm. After the centrifugation, SPIONs are collected and redispersed in a few volumes of ultrapure water. After an adding of absolute ethanol, the mixture is centrifugated another time at 10 000 rpm during 5 min. Finally, after this second stage, SPIONs are collected and a part is dried in an oven at 80°C and another part is dispersed in water. The powder obtain after the drying is used for certain techniques and the SPIONs in the liquid state allow to see the stability of the nanoparticles in an aqueous media and for certain techniques too.

Characterizations techniques

Transmission Electron Microscopy

Transmission Electron Microscopy (TEM) is carried out to determine the size, the size distribution and the shape of nanoparticles. TEM is a CM200-FEI working at 200 kV (point resolution 0.27 nm). To visualize SPIONs, a drop of the solution is placed on a copper grid with a carbon film and dried to remove the solvent. After the analysis, the size distribution as well as the mean diameter of SPIONs is calculated using free software ImageJ.

Dynamic Light Scattering

Dynamic Light Scattering (DLS) was performed by the ZETASIZER Nano ZS device from Malvern Instrumental. The SPIONs solution was diluted to obtain a mass concentration of 0.2 $mg.mL^{-1}$. With this characterization, the stability as well as the hydrodynamic diameter are determined. DLS measurements are performed three times and the average of these three measurements will be

presented in this study. In addition, the number measure was kept to allow a comparison between the hydrodynamic diameter and the diameter obtain by TEM measurement[47].

X-Ray Diffraction

X-Ray Diffraction (XRD) patterns were recorded at room temperature with an INEL CPS120 equipped with a monochromatic cobalt radiation (Co Kα = 0.17886 nm) at grazing angle of incidence simultaneously at 120°.

Fourier Transform Infra-Red

Fourier Transform Infra-Red spectroscopy (FTIR) was performed with a Nicolet 6700 from Thermo-Fischer between 400 and 4 000 cm^{-1}.

Thermogravimetric measurements

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed to determine the mass percentage of ligands (citrate) and of iron oxide. A SETSSYS EV 1750 TGA microbalance from Setaram. Experiments are carried out in the temperature range of 20 to 600°C under air flow (20 $mL.min^{-1}$) at a heating rate of 10°C/min.

Magnetic measurements

A Superconducting Quantum Interference Device (SQUID equipped with a Vibrating Sample Magnetometer (VSM) are performed to determine the magnetic state, the magnetization saturation (M_S); The magnetic field applied for these characterizations is sweeping from +50 000 to -50 000 Tesla and then -50 000 Oe to +50 000 Oe. Then, to determine the blocking temperature (T_B), a Zero Field Cooled – Field Cooled (ZFC-FC) curve is carried out. The sample was cooled to 5K without a magnetic field. At 5K, a low magnetic field (200 Oe) is applied and the temperature is increased to 300K (ZFC curve). Finally, the sample is cooled another time to 5K but with an applied magnetic field, the same during the heating from 5K to 300K: this curve is the FC curve.

Experimental Design (ED)

The goal of this work is to determine the influence of microwave parameters on the SPIONs synthesis. The SPIONs synthesis is composed of three steps: the first is a temperature ramp (called t_1), the second a temperature tray (called t_2) and finally a decrease of the temperature to room temperature (called t_3). Five parameters have been chosen to see their influence on the SPIONs physico-chemical parameters: the time of the ramp (called A), the temperature of the synthesis (called B), the time of the stage (called C), the microwave power (called D) and the moment of stirring (called E). For each microwave parameters, four levels (from 1 to 4) have been defined and are summarized on table 1.

Table 1: Factor levels of each microwave parameters.

Variable parameters	Level			
	1	2	3	4
A: ramp time	5 min	10 min	15 min	20 min
B: temperature	80°C	90°C	100°C	110°C
C: stage time	10 min	20 min	30 min	40 min
D: microwave power	250 W	450 W	650 W	850 W
E: moment of stirring	Without	t_1	t_2	t_3

There are therefore five parameters with four levels: the number of experiments is equal to 4^5 experiments or 1024 experiments. In order to examine all microwaves parameters and their influences on the SPIONs synthesis, a reduction of the synthesis number is mandatory. For this, statistical tables established by Tagushi during the middle of 20th century are used. It exists several tables with different number of factors and levels[48]. For our study, a table where all levels of each parameter are equally represented has been choose: the table is a $L_{16}(4^5)$. The construction of the table is described on figure S1. The number of experiments is reduced from 1024 to 16. For the next of this study, each simple will name S1 to S16. The microwave parameters of each sample are described on table S1.

To show the influence of these parameters, a study of the response and after a simulation of these results are carried out: surface responses are realized to determine the best conditions for microwave parameters to synthesize and to use SPIONs as CA. The different responses are the mean diameter (d_{TEM}), the standard deviation of the diameter (σ_{TEM}), the hydrodynamic diameter (d_{DLS}), the lattice parameter (a_{XRD}), the crystallite size (t_{XRD}), the percentage of ligands ($\%_{lig}$), the magnetization saturation at 300K (M_{s_300K}) and at 5K (M_{s_5K}) and the blocking temperature (T_B). The ED has been carried out four times to show the reproducibility and the repeatability. For the repeatability, the ED has reproduced three times by the same operator in the same conditions. The samples from this ED are named SX_{yA} with X the number of the sample from the ED (from 1 to 16), y the number of the repetition of the DE (y = 1;2;3) and A the operator. For the reproducibility, the ED has realized by another operator in the same conditions. The sample from this ED are named SX_{1B} with X the number of the sample from the ED and B the second operator. A total of 64 experiments for this study are therefore realized and the average of responses of the same experiments are allowed to simulate the 1024 experiments. The 64 samples are summarized on table S2.

Finally, with this simulation, a surface response in function of the microwave parameters is obtained. To validate the ED, three randomly experiments within the range of the factors and three selected experiments are shown on the surface response.

Results and discussions

SPIONs has been synthesized according to the parameters described on table S1. For the rest of this work, an example of a sample ($S6_{3A}$) and its characterizations are presented and the other sample with their characterizations are summarized on table S2.

A TEM micrograph of $S6_{3A}$ is presented on figure 1.a with its histogram of size distribution (figure 1.b). SPIONs obtained by microwave synthesis are monodispersed, with no or a little aggregation thanks to the organic layer around the inorganic core (another micrograph is present on figure S2). The mean

diameter of $S6_{3A}$ obtained by the size distribution is equal to 2.97 ± 0.91 nm. From all samples, the size is between 2.68 nm and 3.57 nm (figure 1.c). This diameter is an important response of the ED. Given the diameter of each SPION, this parameter should be maximised in order to achieve a higher chance of good crystallinity and of high magnetization saturation. In addition, with the TEM characterization, another response can be obtained: the standard deviation. One objective of this work is to obtain isolated iron oxide nanoparticles stable in aqueous solution and with the same size: the standard deviation σ_{TEM} should be minimized. For all samples, σ_{TEM} is between 0.83 nm to 1.32 nm (figure 1.d).

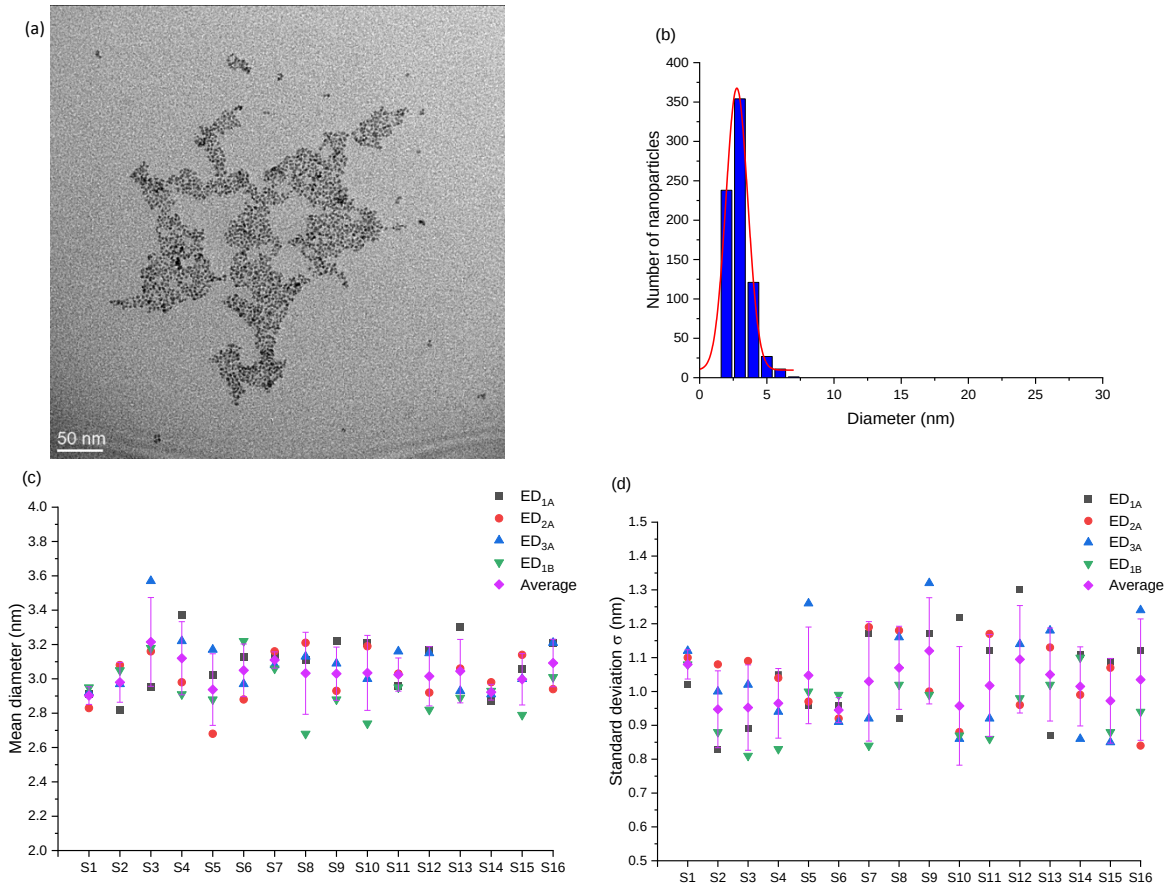


Figure 1: TEM image of $S6_{3A}$ (a) and its size distribution (b). To obtain the mean diameter, a gaussian fit (red line) was carried out and the size was 2.97 ± 0.91 nm. A distribution of each mean diameter d_{TEM} (c) and of standard deviation σ_{TEM} (d) of all samples of ED are represented with the average (pink) and the corresponding standard deviation.

Then, to determine the stability of iron oxide nanoparticles in an aqueous solution and the hydrodynamic diameter (i.e., the diameter of the inorganic core plus the organic layer and the solvation sphere), DLS measurements were carried out. A comparison between the diameter of the inorganic core and the hydrodynamic diameter of $S6_{3A}$ is described on figure 2.a. The hydrodynamic diameter of these SPIONs is equal to 8.5 ± 2.3 nm. Compared to the mean diameter of the inorganic core, the hydrodynamic diameter is higher. This increase of the size is due to the presence of ligands around the inorganic core or an aggregation of SPIONs. However, with the TEM micrograph (figure 1.a), no aggregation is visible: the increasing of diameter is due to the organic layer. For other samples of the ED, the hydrodynamic diameter is between 5.6 nm and 26.5 nm and are shown on figure 2.b. For the biomedical applications and especially for CA, the hydrodynamic diameter d_{DLS} should be as large as possible but without aggregation to avoid blocking the blood vessels: this parameter should be

maximised in the ED. Indeed, the efficacity of SPIONs as CA is dependent on the hydrodynamic diameter: as the hydrodynamic diameter increases, the efficiency increases too[49,50].

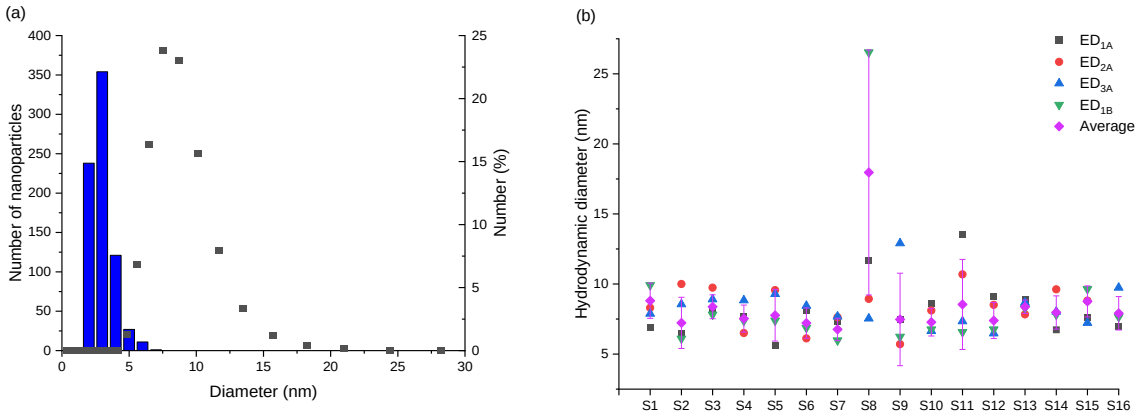


Figure 2: Size distribution with the hydrodynamic diameter (8.5 ± 2.3 nm) in function of the number of $S6_{3A}$ (a) and the distribution of each hydrodynamic diameter d_{DLS} of all samples of ED with the average (pink) and their corresponding standard deviation (b).

To verify the crystallographic structure of the inorganic core, XRD patterns measurements were carried out. The principal iron oxide, magnetite Fe_3O_4 and maghemite γ-Fe_2O_3, crystallize in the same cubic crystal structure ($F_{d\bar{3}m}$): this structure is an inverse spinel. The XRD pattern of $S6_{3A}$ is shown on figure 3.a. The main peaks of iron oxide are indexed according to the spinel structure. To determine if SPIONs are magnetite, maghemite or sub-stoichiometric magnetite ($Fe_{3-\delta}O_4$ with δ the stoichiometric deviation), the lattice parameter a_{XRD} was calculated with the main peaks. For almost the samples, the lattice parameter a_{XRD} is between 8.395 Å (lattice parameter of pure Fe_3O_4) and 8.354 Å (lattice parameter of pure γ-Fe_2O_3) (figure S3). For $S6_{3A}$, the lattice parameter is equal to 8.357 ± 0.005 Å. For the other samples, a_{XRD} is between 8.353 Å and 8.432 Å (figure 3.b). For the ED, a_{XRD} should be near to the lattice parameter of magnetite (i.e., 8.395 Å) because magnetite has a higher magnetization than to maghemite.

In addition, with XRD measurements, the crystallite size can be calculated. Indeed, each nanoparticle can be assimilated to one crystal because a nanoparticle is composed of a single domain. Thanks to the Debye-Scherrer equation and the position of the mean peak of the patterns (the 311 plane), the crystal size t_{XRD} can be calculated. For $S6_{3A}$, t_{XRD} is equal to 3.51 nm. For the other samples, t_{XRD} is between 3.02 nm and 4.01 nm (figure 3.c). For the ED, this parameter should be maximised to increase the magnetization saturation.

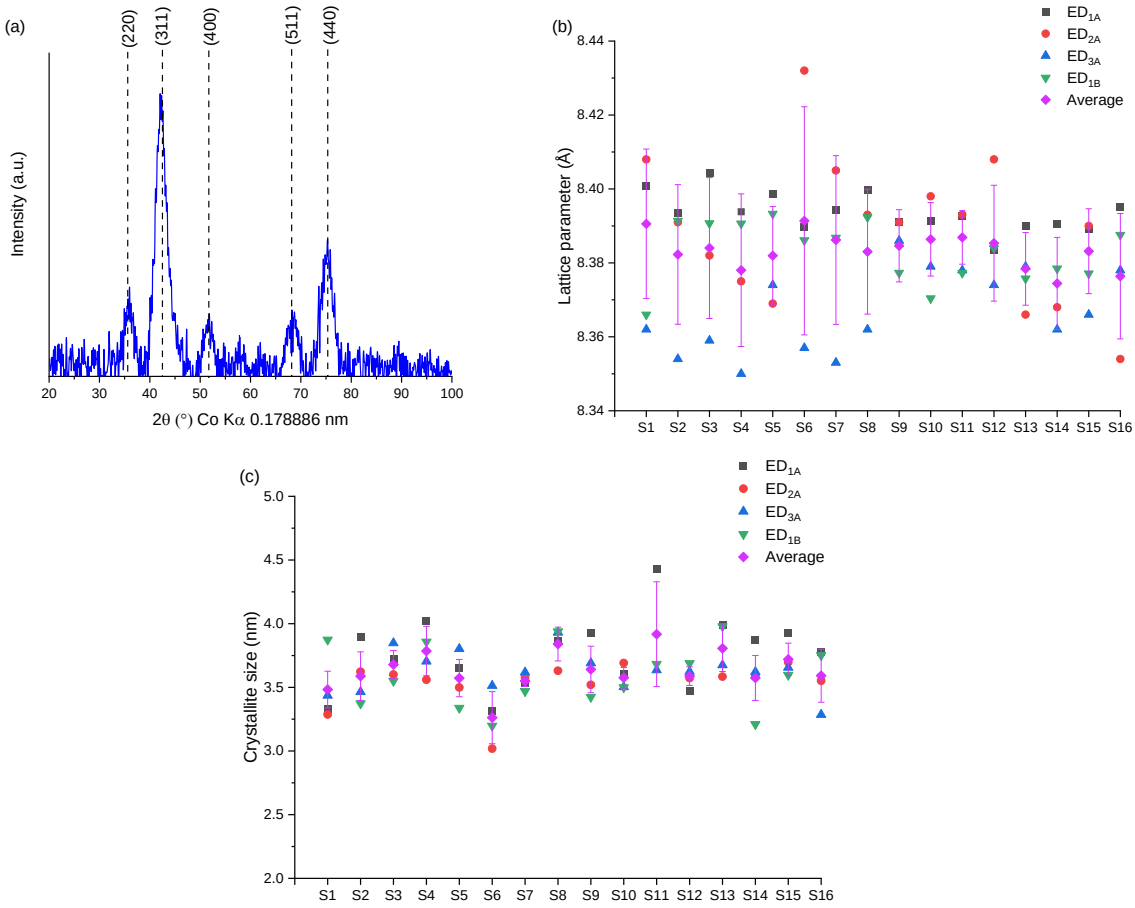


Figure 3: XRD spectra of $S6_{3A}$ (a) and the distribution of lattice parameter a_{XRD} (b) and of crystallite size t_{XRD} (c) of each sample of the ED with the average (pink) and their corresponding standard deviation.

To justify the presence of an assumed organic layer with DLS measurements, a thermogravimetric analysis (TGA) measurements were carried out. An example of TGA (of $S6_{3A}$) curve is present on figure 4.a and other TGA curves are on figure S4: all TGA curves are the same behaviour as a function of the temperature. During the heating of the sample, three steps were present. The first began at room temperature and finished around 150°C and corresponded to the evaporation of water. The second step, and the more important, is between 180°C and 250°C and corresponded to the decomposition of the citrate. Indeed, with a comparison with a TGA curve of citric acid (figure S5), the weight loss is similar. Finally, the last stage around 300°C is considered to be decomposition of the last remaining chains. The percentage of ligand $\%_{lig}$ of $S6_{3A}$ is equal to 35%. The percentage of the other samples of ED are between 16% and 39% of ligands (figure 4.b). This parameter should be around 30%/35% to obtain a good stability of SPIONs in an aqueous solution.

Another technique of characterization to confirm the presence of citrate around the iron oxide core is the FTIR, shown on figure S6 for the sample $S6_{3A}$. For all samples of ED, the same vibrational bands are observed. At high wavenumber, a large band from 3500 to 3000 cm^{-1} corresponds to the stretching vibration of O-H of the hydroxyl group in citrate and absorbed water. At 1610 cm^{-1} and at 1415 cm^{-1}, two intensive bands are present and corresponded respectively to the asymmetric and symmetric stretching of carboxylate groups. In addition, these two bands were offset by 30 cm^{-1} due to the chemisorption of citrate on the surface of SPIONs[51]. The presence of these carboxylate groups is confirmed by the stretching of C-O at 1260 cm^{-1}. At the low wavenumber, the type of iron oxide nanoparticles can be determined. Indeed, if there is only one intense peak around 580 cm^{-1}, the major

phase is magnetite and if there are few peaks from 400 to 800 cm^{-1}, the major phase is maghemite[52,53]. For all samples of the ED, there are an intense peak at 580 cm^{-1} thus confirming the presence of magnetite but other peaks are present: in this case, the major phase of the inorganic core is magnetite with a slight oxidation which corresponds to sub stoichiometric magnetite $Fe_{3-\delta}O_4$.

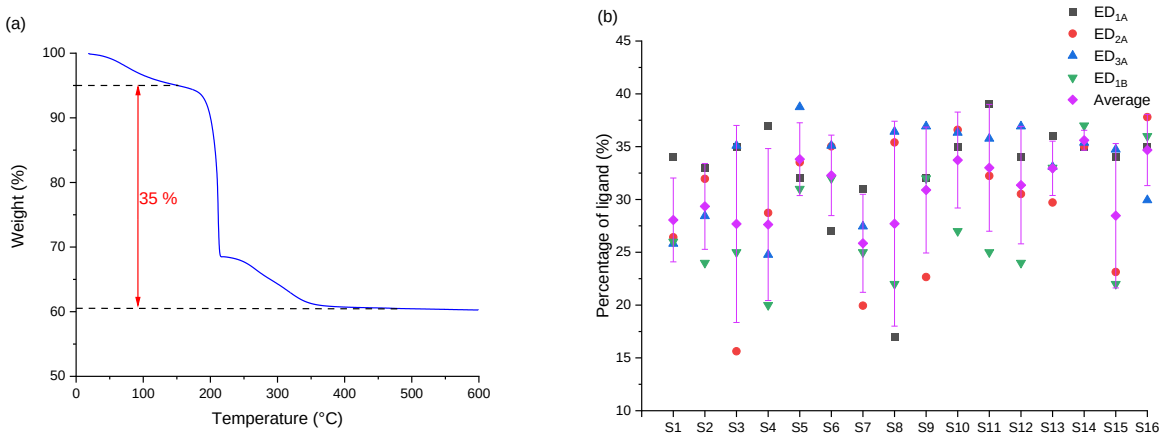


Figure 4: Thermogravimetric analysis from 20°C to 600°C of $S6_{3A}$ (a) and the distribution of percentage of ligands $\%_{lig}$ of each sample of the ED with the average (pink) and their corresponding standard deviation (b).

The last essential characterization of our SPIONs is the magnetic characterizations. Indeed, the magnetic state is an important parameter for the use of these nanoparticles as CA. The first measurement is a magnetization cycle at room temperature: a magnetic field is applied from 50 000 Oe (1 Tesla = 10 000 Oe) to -50 000 Oe and from -50 000 Oe to 50 000 Oe. If the magnetic state is a cooperative magnetism, when the magnetic field changes, a coercive field will then appear: a hysteresis loop is generated. If the magnetic state is a no cooperative magnetism such as superparamagnetism, any hysteresis is generated: when the applied magnetic field is zero, the magnetic moment is also zero. In our case and for all samples of the ED, any hysteresis is present on the magnetic cycle at room temperature: all samples are in a superparamagnetic state at 300K (figure 5.a and figure S7). The second information given by these curves is the magnetization saturation M_S (i.e the maximum of the magnetic moment). The M_S of a bulk of maghemite γ-Fe_2O_3 is 74 $emu.g^{-1}$ and for a bulk of magnetite Fe_3O_4 is 92 $emu.g^{-1}$. The goal is to maximise the value of M_S to improve the efficacity of SPIONs as CA. The magnetic cycle of $S6_{3A}$ is shown of figure 5.a. The M_S of samples of the ED are between 18 $emu.g^{-1}$ and 65 $emu.g^{-1}$ (figure 5.b). To confirm the superparamagnetic state, magnetic cycles are carried out at 5K (figure 5.c). Indeed, at this temperature, the magnetic moment is blocked: the magnetic behaviour is similar to a cooperative magnetism; a hysteresis is therefore present when the applied magnetic field is changed. The insert on figure 5.c showed this hysteresis for $S6_{3A}$ and was present for all samples of the ED. As the magnetic moment is blocked, the M_S value is therefore higher as shown the distribution of M_S at 5K (figure 5.d): the M_S values are between 43 $emu.g^{-1}$ to 95 $emu.g^{-1}$. As for the M_S value at 300K, the M_S at 5K should be maximise for a use as CA.

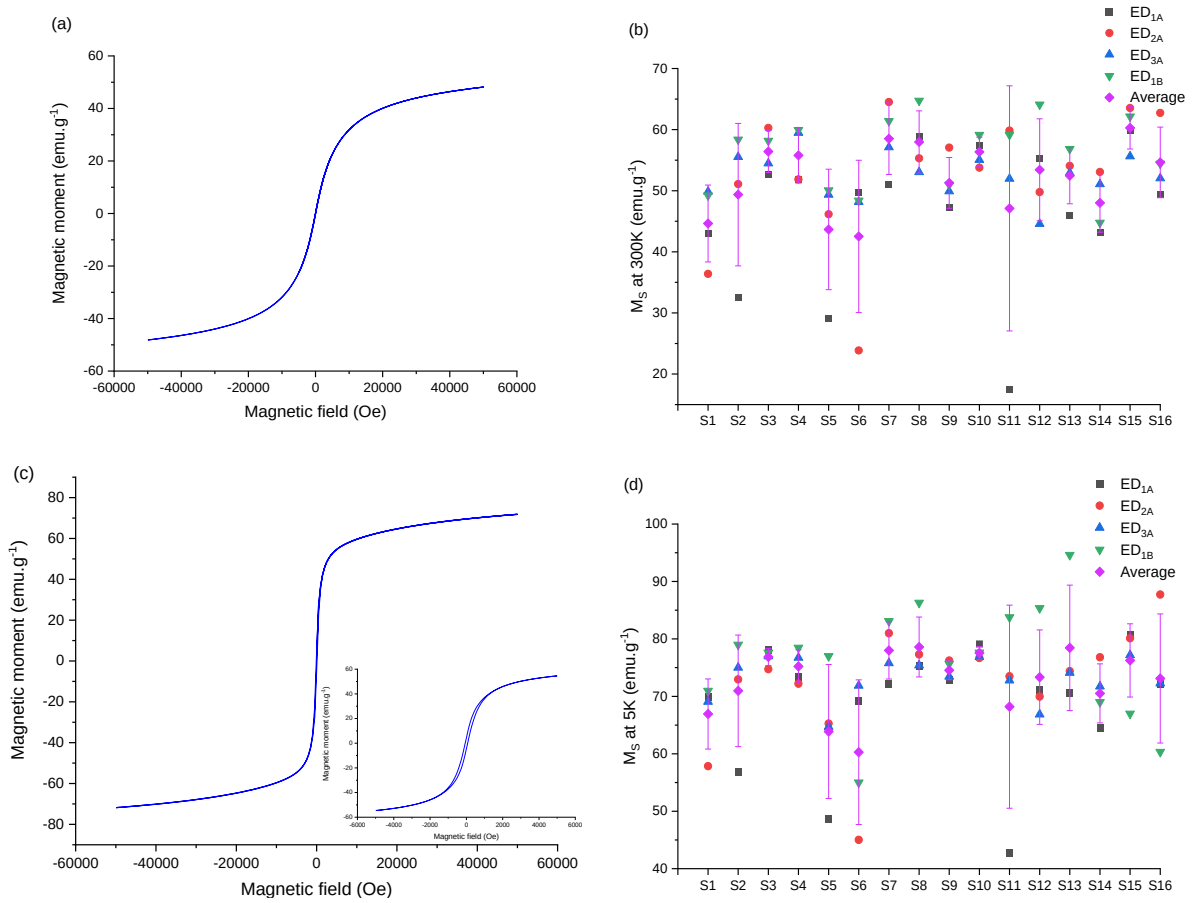


Figure 5: Magnetic cycle of S6$_{3A}$ at 300K (a), the distribution of M_S values at 300K of each sample of the ED with the average (pink) with their corresponding standard deviation (b), magnetic cycle of S6$_{3A}$ at 5K and in insert a zoom to see the hysteresis (c) and the distribution of M_S at 5K of each sample of the ED with the average (pink) with their corresponding standard deviation (d).

At 300K, all nanoparticles studied in this work are in a superparamagnetic state and are in a blocked magnetic state at 5K. However, the transition temperature between these two states is not known. To determine this temperature, called blocking temperature T_B, ZFC-FC curves are carried out. Generally, T_B is assimilated to the maximum of the ZFC curve (i.e., the curve from 5K to 300K). However, this value is not the exact value because we assume that all SPIONs have the same size. There is a distribution of size of SPIONs, so there is a blocking temperature distribution too: a blocking region should be considered. The exactly T_B is thus determined by means of Monte-Carlo simulations[54]. For ease of reference, we therefore consider T_B to be the maximum of the ZFC curve. The ZFC-FC curve of S6$_{3A}$ is shown on figure 6.a and other examples are present on figure S8. The value of T_B is equal to 13K. For the other samples, T_B is between 11K and 46K (figure 5.b). In addition, as mentioned above, the ZFC-FC curve corresponds to a distribution of T_B. This distribution can be to compare with the size distribution obtained with TEM images: if the size distribution is large, the distribution of T_B must be large. For S6$_{3A}$, the size distribution is narrow like the distribution of T_B.

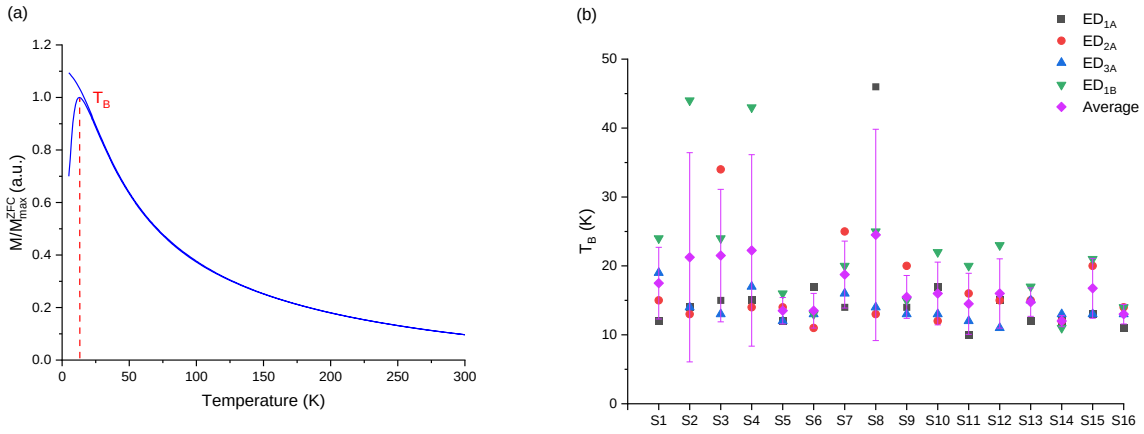


Figure 6: ZFC-FC curve of S6$_{3A}$ with a T_B = 13K (a) and the distribution of T_B of each sample of the ED with the average (pink) and their corresponding standard deviation (b).

Thanks all these characterizations, the different responses (the mean diameter d_{TEM}, the standard deviation in TEM σ_{TEM}, the hydrodynamic diameter d_{DLS}, the lattice parameter a_{XRD}, the crystallite size t_{XRD}, the percentage of ligands $\%_{lig}$, the magnetization saturation at 300K M_S_300K and at 5K M_s_5K and the blocking temperature T_B) for our ED have been obtained and will allow us to determine the best microwave parameters to synthesize iron oxide nanoparticles for a use as CA. However, in view of the number of results for each response, a search of outliers is carried out thanks a Dixon's test (described on SI). This test allows to discriminate the extreme values. With a threshold of 0.01 ($r_{4;0.99}$ = 0.889), a few values are removed: these values are crossed out on table S2.

To prove the repeatability, as mentioned above, the ED was repeated three times by the same operator. After this repeatability, an ANOVA (Analysis of Variances) is carried out to check if the different average of the different repeatability (ED_{1A}, ED_{2A} and ED_{3A}) are similar or not. If the average of each repeatability is similar, the ED is repeatable. The different ANOVA of each response are present on Table S3 with a threshold of 0.01. The averages are similar if $F_{cal} < F_{theo}$ (F_{theo} = 5.110 with v_1 = 45, v_2 = 2 and α = 0.01) or if p value is higher than α. For almost responses, F_{cal} is lower to F_{theo}: the ED is repeatable.

For the reproducibility, the same operation is realised but with the average of two different operators (i.e., with the average of ED_{yA} y = 1;2;3 and with ED_{1B}). The results of ANOVA are present on Table S4. For more than half of the responses, the different averages are similar and allow to conclude on the reproducibility of the ED. However, for this study, only one other operator realized this ED. For the future, different operators should realize this ED to enable confirmation of the reproducibility of the ED.

After to prove the repeatability and the reproducibility of the ED, the determination of the best microwave parameters for an application as CA is realized. For this, the average of each level of each factor is calculated. Thus, thanks to an effects diagram, the variations between the different levels of a factor become visual. For example, for the microwave power (factor D) at 650 W (level 3), the value is equal to the average of the response of S3, S5, S10 and S16. All averages of each response are summarised on Table S5. The different effects diagrams are shown on figure 7.

After determining how the responses should be (maximised, minimised or close to a value), an optimisation of the microwave parameters is obtained according to this response. Thus, the mean diameter d_{TEM} should be maximised (in view of the sizes obtained) (figure 7.a), the standard deviation

σ_{TEM} should be minimized (figure 7.b), the hydrodynamic diameter d_{DLS} should be maximised (figure 7.c), the lattice parameter a_{XRD} should be near to 8.395 Å (the lattice parameter of magnetite Fe_3O_4) because magnetite has a higher magnetization and therefore allows to increase the efficiency as CA (figure 7.d). Then, in accordance with the mean diameter d_{TEM}, the crystallite size should be maximised (in view of the sizes obtained) (figure 7.e). For a good stability in an aqueous media, the percentage of ligands $\%_{lig}$ should be near to 30/32% (figure 7.f). Finally, for the magnetic properties, the magnetisation saturation M_s at 300K (figure 7.g) and at 5K (figure 7.h) should be maximised due to the potential application as CA. For the blocking temperature T_B, this parameter should be minimised because generally when T_B is high, aggregates can appear (figure 7.i).

For example, one goal of this study is to obtain monodisperse SPIONs: the size distribution should be narrow. So, to validate this criterion, the standard deviation σ_{TEM} should be minimised. With the effects diagram of σ_{TEM} (figure 7.b), a minimum of the standard deviation is obtained when the ramp time is 5 min (factor A, level 1), the temperature is 90°C (factor B, level 1), the stage time is 40 min (factor C, level 4), the microwave power is 650 W (factor D, level 3) and without a stirring during the synthesis (factor E, level 1). However, in order to obtain reproducible and repeatable synthesis, the variance must also be minimised for all responses. The different variances of each response in function of the factor are shown on figure S10.

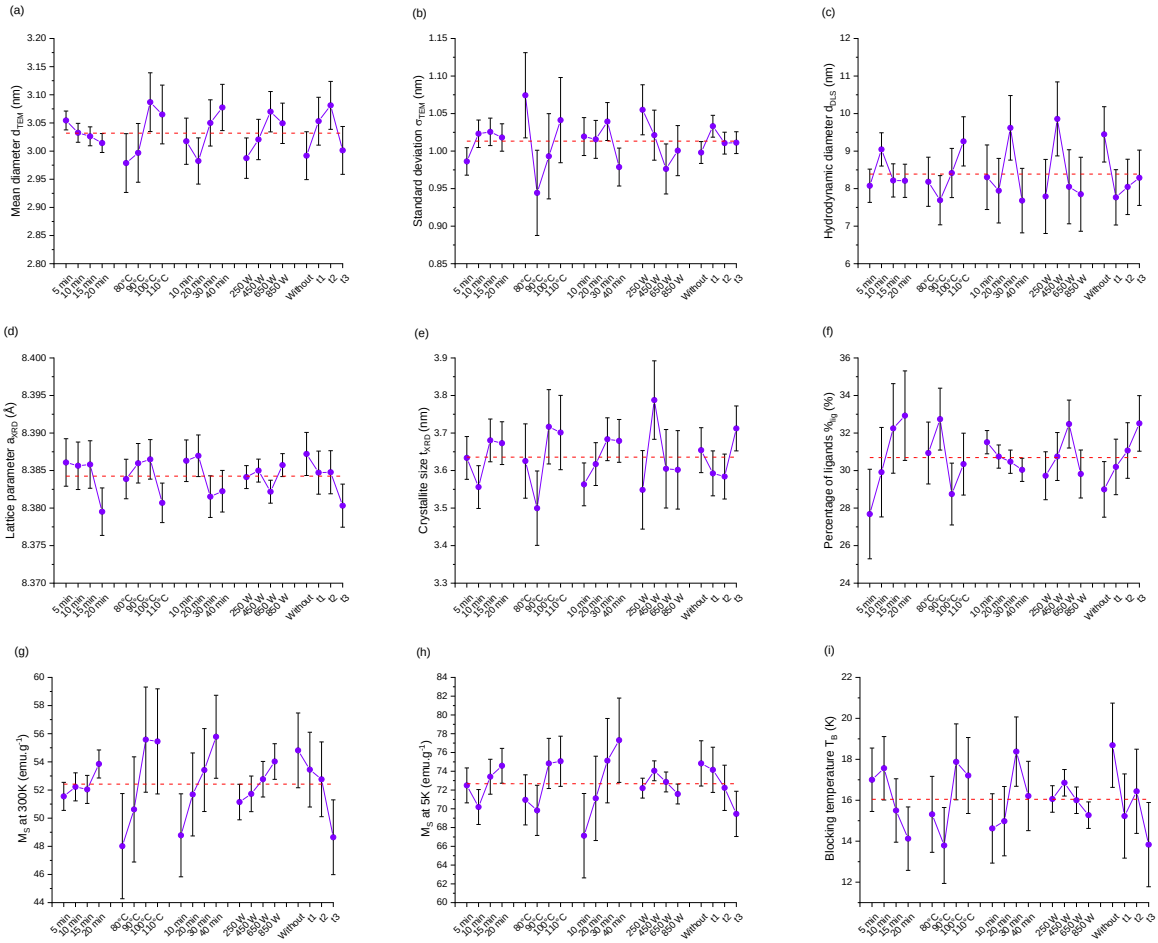


Figure 7: Effect diagrams of the different responses of the ED: mean diameter d_{TEM} (a), standard deviation σ_{TEM} (b), hydrodynamic diameter d_{DLS} (c), lattice parameter a_{XRD} (d), crystallite size t_{XRD} (e), percentage of ligands $\%_{lig}$ (f), the magnetization saturation at 300K M_S_300K (g), the magnetization saturation at 5K M_S_5K (h) and the blocking temperature T_B (i) with their average (red dash).

Taking into account the variance and the responses, the optimized microwave parameters for each response can be determined and are summarized on table 2. Several parameters are similar between the different responses as for the factor E: the best condition is to realize the synthesis without a stirring. For the factor D, the level which is optimal for almost responses is at 850 W. For the other factors, a trend can be identified. Indeed, with a ramp time of 20 minutes (factor A, level 4) at 100°C or 110°C (factor B, level 3 or 4) and a stage time of 40 minutes, SPIONs synthesised with these parameters will be optimized for an application as CA.

However, a certain hindsight must be considered based on the statistical results. Indeed, in according to the ED, any stirring allows to obtain better SPIONs for the application as CA: the absence of stirring will generate an aggregation of SPIONs. If there is an aggregation of these nanoparticles, the magnetization saturation will be increases because there will be a set of magnetic nanoparticles generating more magnetism.

Table 2: Table of the best microwave conditions for each response.

Factor	d_{TEM}	σ_{TEM}	d_{DLS}	a_{XRD}	t_{XRD}	$\%_{lig}$	M_S 300K	M_S 5K	T_B
A	10 min (2)	5 min (1)	10 min (2)	15 min (3)	20 min (4)	10 or 15 min (2 or 3)	20 min (4)	20 min (4)	20 min (4)
B	100°C (3)	90°C (2)	100°C or 110°C (3 or 4)	100°C (3)	110°C (4)	80°C (1)	110°C (4)	110°C (4)	90°C (3)
C	30 or 40 min (3 or 4)	40 min (4)	30 min (3)	20 min (2)	40 min (4)	40 min (4)	40 min (4)	30 or 40 min (3 or 4)	10 or 20 min (1 or 2)
D	850 W (4)	650 or 850 W (3 or 4)	450 W (2)	450 W (2)	650 W (3)	250 W (1)	850 W (4)	250 or 650 W (1 or 3)	850 W (4)
E	t_1 (2)	without (1)	without (1)	without (1)	without (1)	t_1 (2)	without (1)	without (1)	t_3 (4)

Thanks to these averages of each response (which are constructed the different effects diagrams), a simulation of the 1024 experiments (i.e., all experiments with all levels for each factor) is realized using the law of additivity of responses. This law consists of adding the mean of different factors at a specific level with the main average and the whole is divided by the number of factors and the main average. For the experiment with the following conditions (ramp time of 15 minutes, temperature at 80°C, stage time of 20 minutes, microwave power at 850 W and without stirring i.e. A = 3, B = 1, C = 2, D = 4 and E = 1), the calculated response of the mean diameter d_{TEM} is equal to (1):

$$d_{TEM}(3;1;2;4;1) = \frac{\bar{x}_{A=3} + \bar{x}_{B=1} + \bar{x}_{C=2} + \bar{x}_{D=4} + \bar{x}_{E=1} + \bar{x}_{d_{TEM}}}{6} \quad (1)$$

With $\bar{x}_{A=3}$ the average of d_{TEM} when the factor A is equal to 3 (i.e., when the ramp time is 15 minutes, the average is equal to d_{TEM} of S1, S2, S3 and S4. For $\bar{x}_{B=1}$, the average is equal to the average of d_{TEM} of S1, S5, S9 and S13. For $\bar{x}_{C=2}$, the average is equal to the average of d_{TEM} of S2, S5, S12 and S15. For $\bar{x}_{D=4}$, the average is equal to the average of d_{TEM} of S4, S6, S9 and S15. For $\bar{x}_{D=1}$, the average is equal to the average of d_{TEM} of S1, S8, S10 and S15. Finally, $\bar{x}_{d_{TEM}}$ is the total average of each value of d_{TEM} from the ED.

Thanks this different calculated values, the simulation of each response as a function of the level of each factor is carried out and surface responses are obtained (figure 8). With these surface responses, the last step for an experimental design can be carried out: the validation of the ED with other experiments. Indeed, three randomised experiments and three choose experiments are realised. The conditions are summarized on table S6. Then, the values of the responses are reported on the surface response and the difference between the theoretical response and the experimental response is observed. All the values of each response of these last experiments are reported on table S7. In general, the responses of the different experiment are near to the theoretical values. However, of the six randomised experiments, two have outliers: these differences are due to the percentage of ligand. Indeed, if the percentage of ligand is high, a matrix of this ligand appeared: the mean size is low, the hydrodynamic diameter increases, the magnetic properties decrease. In addition, an oxidation phenomenon occurs. This phenomenon is visible thanks to the magnetic characterization: the hysteresis is higher than the other synthetised nanoparticles and when a magnetic field is applied (4 Tesla) for a magnetic cycle at 5K, the left coercive field is higher than the left coercive field without a magnetic field. This increasing corresponds to the presence of another magnetic state: for our case, this other magnetic state is due to the presence of maghemite. Finally, when the percentage of ligands is low, the magnetic properties decrease too. For the other samples, the percentage of ligands is between 32% and 35%: the different other responses are near to their theoretical values obtained with the ED.

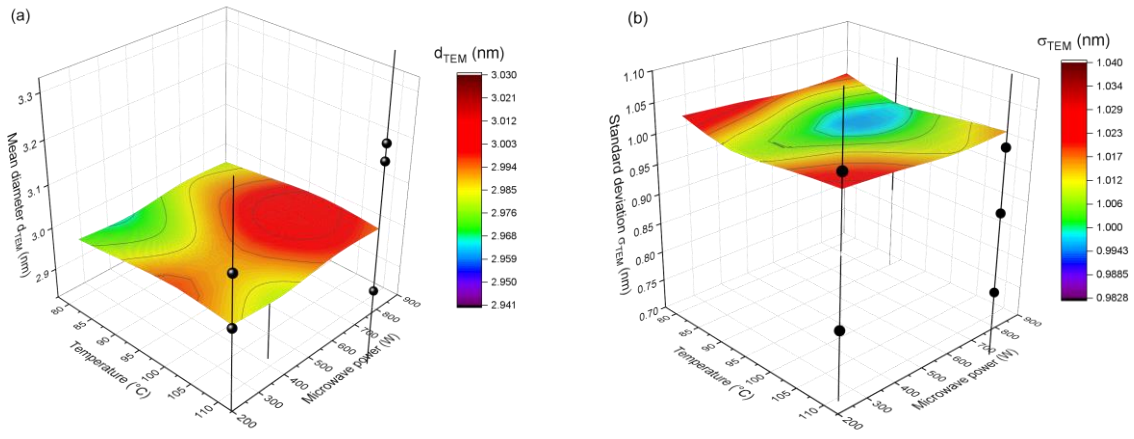


Figure 8: Surface response plot of the ED for the effect of the temperature (factor B) and for the microwave power (factor D) on the mean diameter d_{TEM} (a) and on the standard deviation σ_{TEM} (b) with the experiments (spherical) to validate the ED.

Conclusion

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were synthesized by a derivate coprecipitation method with a microwave process. However, this method is not well developed, an experimental design was therefore carried out to determine the best microwave parameters to synthesise SPIONs. Indeed, without an experimental design, many experiments should have been synthesised: different factors (ramp time, temperature, stage time, microwave power and moment of stirring) has been choose at different values (levels) in order to obtain responses from the characterizations. Thus, a number of 1024 experiments has been reduced to 16 experiments.

In general, the size of these SPIONs is between 2.68 nm and 3.57 nm with a standard deviation between 0.83 nm to 1.32 nm. The other responses confirm that the inorganic core is magnetite with a slight oxidation (sub stoichiometric magnetite $Fe_{3-\delta}O_4$) with a superparamagnetic behaviour. Then, thanks to the repetition of this experimental design three times by a same operator and one time by another operator, the reproducibility and the repeatability have been confirmed with the statistical tests (ANOVA). Finally, a simulation of this experimental design is carried out and allowed to obtain the responses of the 1024 experiments: a surface response is obtained with the different factor for each response. To validate this experimental design, some experiments (selected for their responses and randomly selected) are carried out and the different responses are near to the theoretical values. However, when the percentage of ligands is not between 30% and 35%, a wide fluctuation in values is observed. To avoid these variations, a better control of the washing should be achieved to obtain superparamagnetic iron oxide nanoparticles with the best properties for MRI applications.

References

1 J. Peng, W. Zhang, L. Chen, T. Wu, M. Zheng, H. Dong, H. Hu, Y. Xiao, Y. Liu and Y. Liang, *Chemical Engineering Journal*, 2021, **404**, 126461.

2 M. Valvo, C. Floraki, E. Paillard, K. Edström and D. Vernardou, *Nanomaterials*, 2022, **12**, 1436.

3 M. G. Montiel Schneider, M. J. Martín, J. Otarola, E. Vakarelska, V. Simeonov, V. Lassalle and M. Nedyalkova, *Pharmaceutics*, 2022, **14**, 204.

4 R. Jin, B. Lin, D. Li and H. Ai, *Current Opinion in Pharmacology*, 2014, **18**, 18–27.

5 E. A. Vermeij, M. I. Koenders, M. B. Bennink, L. A. Crowe, L. Maurizi, J.-P. Vallée, H. Hofmann, W. B. van den Berg, P. L. E. M. van Lent and F. A. J. van de Loo, *PLoS ONE*, 2015, **10**, e0126687.

6 Z. Nemati, J. Alonso, I. Rodrigo, R. Das, E. Garaio, J. Á. García, I. Orue, M.-H. Phan and H. Srikanth, *J. Phys. Chem. C*, 2018, **122**, 2367–2381.

7 E. C. Abenojar, S. Wickramasinghe, J. Bas-Concepcion and A. C. S. Samia, *Progress in Natural Science: Materials International*, 2016, **26**, 440–448.

8 M. Soleymani, M. Velashjerdi, Z. Shaterabadi and A. Barati, *Carbohydrate polymers*, 2020, **237**, 116130.

9 L. Chen, Y. Wu, H. Wu, J. Li, J. Xie, F. Zang, M. Ma, N. Gu and Y. Zhang, *Acta Biomaterialia*, 2019, **96**, 491–504.

10 A. Nicolae-Maranciuc, D. Chicea and L. M. Chicea, *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23**, 5778.

11 W.-C. Ko, S.-J. Wang, C.-Y. Hsiao, C.-T. Hung, Y.-J. Hsu, D.-C. Chang and C.-F. Hung, *Molecules*, 2022, **27**, 1551.

12 J. H. Jin, H. Um, J. H. Oh, Y. Huh, Y. Jung and D. Kim, *Materials Chemistry and Physics*, 2022, **287**, 126345.

13 S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2064–2110.

14 H. Shokrollahi, *Materials Science and Engineering: C*, 2013, **33**, 4485–4497.

15 M.-A. Fortin, in *Magnetic Characterization Techniques for Nanomaterials*, ed. C. S. S. R. Kumar, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2017, pp. 511–555.

16 C. H. Evans, *Biochemistry of the Lanthanides*, Springer Science & Business Media, 2013, vol. 8.

17 J. B. Lansman, *The Journal of general physiology*, 1990, **95**, 679–696.

18 L. Zhang, R. Liu, H. Peng, P. Li, Z. Xu and A. K. Whittaker, *Nanoscale*, 2016, **8**, 10491–10510.

19 G. Wang, X. Zhang, A. Skallberg, Y. Liu, Z. Hu, X. Mei and K. Uvdal, *Nanoscale*, 2014, **6**, 2953.

20 S. Laurent, L. V. Elst and R. N. Muller, in *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, eds. A. Merbach, L. Helm and É. Tóth, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2013, pp. 427–447.

21 J. L. Dormann, *Advances in Chemical Physics*, 1997, **98**, 283–494.

22 C. Chen, J. Ge, Y. Gao, L. Chen, J. Cui, J. Zeng and M. Gao, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*.

23 N. Saxena and M. Singh, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2017, **429**, 166–176.

24 S. Slimani, C. Meneghini, M. Abdolrahimi, A. Talone, J. P. M. Murillo, G. Barucca, N. Yaacoub, P. Imperatori, E. Illés, M. Smari, E. Dhahri and D. Peddis, *Applied Sciences*, 2021, **11**, 5433.

25 M. O. Besenhard, L. Panariello, C. Kiefer, A. P. LaGrow, L. Storozhuk, F. Perton, S. Begin, D. Mertz, N. T. K. Thanh and A. Gavriilidis, *Nanoscale*, 2021, **13**, 8795–8805.

26 P. Cheah, T. Cowan, R. Zhang, A. Fatemi-Ardekani, Y. Liu, J. Zheng, F. Han, Y. Li, D. Cao and Y. Zhao, *Nanoscale*, 2020, **12**, 9272–9283.

27 Y. Bao, J. A. Sherwood and Z. Sun, *J. Mater. Chem. C*, 2018, **6**, 1280–1290.

28 G. Thomas, F. Demoisson, J. Boudon and N. Millot, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 10821–10829.

29 H. Kahil, A. Faramawy, H. El-Sayed and A. Abdel-Sattar, *Crystals*, 2021, **11**, 1153.

30 I.-C. Masthoff, M. Kraken, D. Mauch, D. Menzel, J. A. Munevar, E. Baggio Saitovitch, F. J. Litterst and G. Garnweitner, *J Mater Sci*, 2014, **49**, 4705–4714.

31 Q. Wang, X. Ma, H. Liao, Z. Liang, F. Li, J. Tian and D. Ling, *ACS Nano*, 2020, **14**, 2053–2062.

32 C. Xu and S. Sun, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, **65**, 732–743.

33 S. Masur, B. Zingsem, T. Marzi, R. Meckenstock and M. Farle, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2016, **415**, 8–12.

34 C. Goroncy, P. E. J. Saloga, M. Gruner, M. Schmudde, J. Vonnemann, E. Otero, R. Haag and C. Graf, *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 2018, **232**, 819–844.

35 R. K. Kottana, L. Maurizi, B. Schnoor, K. Morris, J. A. Webb, M. A. Massiah, N. Millot and A. Papa, *Small*, 2021, **17**, 2004945.

36 K. Jani, N. Kaushal, M. Sadoqi, G. Long, Z.-S. Chen and E. Squillante, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2021, **533**, 167970.

37 F. M. E. Segers, A. V. Ruder, M. M. Westra, T. Lammers, S. M. Dadfar, K. Roemhild, T. S. Lam, M. E. Kooi, K. B. J. M. Cleutjens, F. K. Verheyen, G. W. H. Schurink, G. R. Haenen, T. J. C. van Berkel, I. Bot, B. Halvorsen, J. C. Sluimer and E. A. L. Biessen, *Cardiovascular Research*, 2022, cvac032.

38 A. Sathya, S. Kalyani, S. Ranoo and J. Philip, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2017, **439**, 107–113.

39 Y.-J. Liang, Y. Zhang, Z. Guo, J. Xie, T. Bai, J. Zou and N. Gu, *Chem. Eur. J.*, 2016, **22**, 11807–11815.

40 J.-S. Schanche, *Mol Divers*, 2003, **7**, 291–298.

41 M. E. F. Brollo, S. Veintemillas-Verdaguer, C. M. Salván and M. del P. Morales, *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2017, **2017**, 1–13.

42 H.-C. Roth, S. P. Schwaminger, M. Schindler, F. E. Wagner and S. Berensmeier, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2015, **377**, 81–89.

43 T. M. Laid, K. Abdelhamid, L. S. Eddine and B. Abderrhmane, *Journal of Molecular Structure*, 2021, **1229**, 129497.

44 B. H. Hui and M. N. Salimi, *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, 2020, **743**, 012036.

45 M. Mahmoudi, A. Simchi, M. Imani, A. S. Milani and P. Stroeve, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 14470–14481.
46 T. Girardet, A. Cherraj, A. Pinzano, C. Henrionnet, F. Cleymand and S. Fleutot, *Pure and Applied Chemistry*, 2021, **93**, 1265–1273.
47 J. Lim, S. P. Yeap, H. X. Che and S. C. Low, *Nanoscale Res Lett*, 2013, **8**, 381.
48 A. A. Dar and N. Anuradha, *International Journal of Services, Economics and Management*, 2020, **11**, 1–20.
49 N. Ohannesian, C. T. De Leo and K. S. Martirosyan, *Materials Today: Proceedings*, 2019, **13**, 397–403.
50 A. M. Predescu, E. Matei, A. C. Berbecaru, C. Pantilimon, C. Drăgan, R. Vidu, C. Predescu and V. Kuncser, *R. Soc. open sci.*, 2018, **5**, 171525.
51 Y. Sahoo, A. Goodarzi, M. T. Swihart, T. Y. Ohulchanskyy, N. Kaur, E. P. Furlani and P. N. Prasad, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 3879–3885.
52 F. Malega, I. P. T. Indrayana and E. Suharyadi, *JIPFAlBiruni*, 2018, **7**, 129–138.
53 P. Roushenas, Z. Yusop, Z. Majidnia and R. Nasrollahpour, *Desalination and Water Treatment*, 2016, **57**, 5837–5841.
54 I. J. Bruvera, P. Mendoza Zélis, M. Pilar Calatayud, G. F. Goya and F. H. Sánchez, *Journal of Applied Physics*, 2015, **118**, 184304.

Supplementary information of

One step superparamagnetic iron oxide nanoparticles by a microwave process: optimization of microwave parameters with an experimental design

Thomas Girardet[1], Morgane Kessler[1], Sylvie Migot[1], Lionel Aranda[1], Sébastien Diliberto[1], Stéphane Suire[1], Tom Ferté[1], Sébastien Hupont[1], Franck Cleymand[1], Solenne Fleutot[1]

1: Institut Jean Lamour, CNRS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France

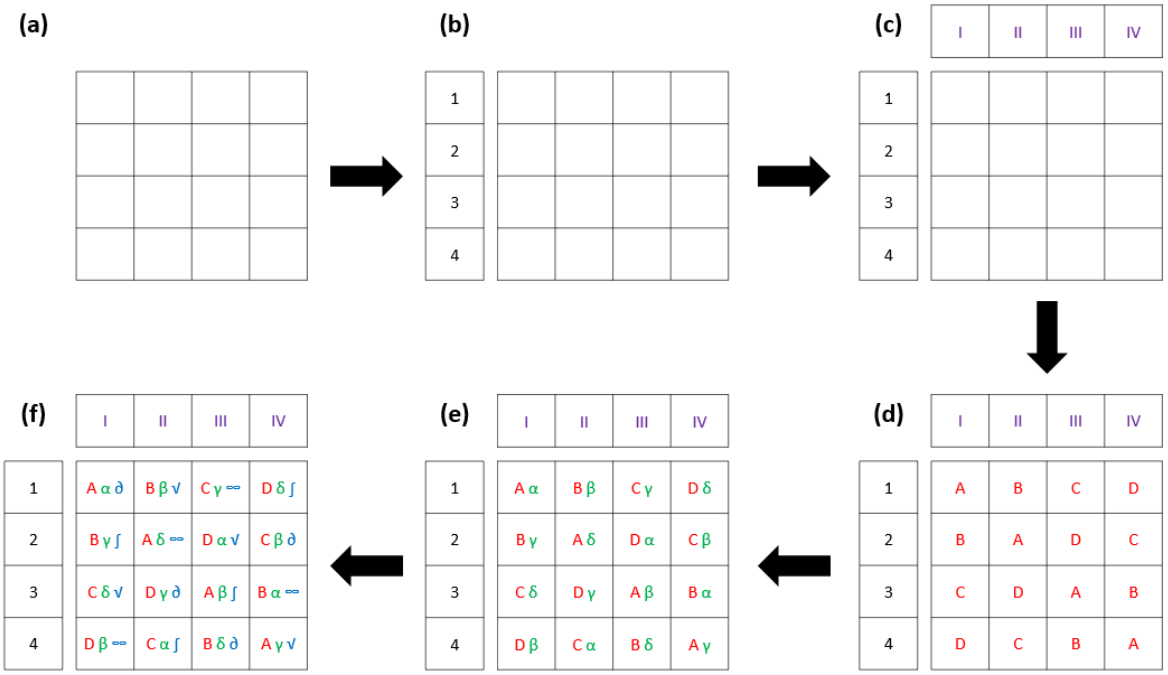


Figure S1: Steps on the construction of the experimental design. One square corresponds to an experiment (a). Each line correspond to a level of the factor A (b) and each column corresponds to a level of the factor B (c). Then, for factors C, D and E (respectively (d), (e) and (f)), each level is present on one column and one line.

Table S1: Table of the microwave parameters for the different samples. The highlighted parameters are the synthesis described on the publication.

Sample	A (time of the ramp in min)	B (temperature in °C)	C (time of the stage in min)	D (microwave power in W)	E (moment of the stirring)
S1	1 (5 min)	1 (80 °C)	1 (10 min)	1 (250 W)	1 (without)
S2	1 (5 min)	2 (90 °C)	2 (20 min)	2 (450 W)	2 (t_1)
S3	1 (5 min)	3 (100 °C)	3 (30 min)	3 (650 W)	3 (t_2)
S4	1 (5 min)	4 (110 °C)	4 (40 min)	4 (850 W)	4 (t_3)
S5	2 (10 min)	1 (80 °C)	2 (20 min)	3 (650 W)	4 (t_3)
S6	2 (10 min)	2 (90 °C)	1 (10 min)	4 (850 W)	3 (t_2)
S7	2 (10 min)	3 (100 °C)	4 (40 min)	1 (250 W)	2 (t_1)
S8	2 (10 min)	4 (110 °C)	3 (30 min)	2 (450 W)	1 (without)
S9	3 (15 min)	1 (80 °C)	3 (30 min)	4 (850 W)	2 (t_1)
S10	3 (15 min)	2 (90 °C)	4 (40 min)	3 (650 W)	1 (without)
S11	3 (15 min)	3 (100 °C)	1 (10 min)	2 (450 W)	4 (t_3)
S12	3 (15 min)	4 (110 °C)	2 (20 min)	1 (250 W)	3 (t_2)
S13	4 (20 min)	1 (80 °C)	4 (40 min)	2 (450 W)	3 (t_2)
S14	4 (20 min)	2 (90 °C)	3 (30 min)	1 (250 W)	4 (t_3)
S15	4 (20 min)	3 (100 °C)	2 (20 min)	4 (850 W)	1 (without)
S16	4 (20 min)	4 (110 °C)	1 (10 min)	3 (650 W)	2 (t_1)

Table S2: Summarize of all samples of the experimental design. The values in bold are described on the supplementary information. The values crossed out are removed on the simulation due to the Dixon's test. The value highlighted is described on the publication.

Sample	d_{TEM} (nm)	σ_{TEM} (nm)	d_{hydro} (nm)	a_{XRD} (Å)	t_{XRD} (nm)	$\%_{lig}$ (%)	M_s 300K (emu.g^{-1})	M_s 5K (emu.g^{-1})	T_B (K)
$S1_{1A}$	2.91	1.02	6.91	8.401	3.33	~~34~~	43.08	69.85	12
$S1_{2A}$	2.83	1.10	8.30	8.408	3.29	26	36.39	57.85	15
$S1_{3A}$	2.92	1.12	7.88	8.362	3.44	26	49.85	69.07	19
$S1_{1B}$	2.95	1.08	9.92	8.391	3.87	26	49.24	70.96	24
$S2_{1A}$	2.82	0.83	6.50	8.393	3.89	33	32.47	56.89	14
$S2_{2A}$	3.08	1.08	10.00	8.391	3.62	32	51.09	72.95	13
$S2_{3A}$	2.97	1.00	8.56	~~8.354~~	3.46	28	55.52	75.01	14
$S2_{1B}$	3.05	0.88	6.10	8.391	3.37	24	58.37	78.99	~~44~~
$S3_{1A}$	2.95	0.89	8.17	8.404	3.72	35	52.71	78.11	15
$S3_{2A}$	3.16	1.09	9.74	8.382	3.60	16	60.28	74.74	34
$S3_{3A}$	3.57	1.02	8.91	8.359	3.85	35	54.47	77.00	13
$S3_{1B}$	3.18	0.81	7.82	8.391	3.55	25	58.18	77.60	24
$S4_{1A}$	3.37	1.05	7.71	8.394	4.02	37	51.87	73.45	15
$S4_{2A}$	2.98	1.04	6.50	8.375	3.56	29	51.86	72.20	14
$S4_{3A}$	3.22	0.94	8.84	8.350	3.70	25	59.48	76.74	17
$S4_{1B}$	**2.91**	**0.83**	**7.38**	**8.393**	**3.86**	**20**	**59.95**	**78.46**	~~**43**~~
$S5_{1A}$	3.02	0.96	5.61	8.399	3.65	32	29.09	48.58	12
$S5_{2A}$	2.68	0.97	9.56	8.369	3.50	34	46.16	65.26	14
$S5_{3A}$	3.17	1.26	9.29	8.374	3.80	39	49.35	64.71	12
$S5_{1B}$	2.88	1.00	7.39	8.386	3.34	31	50.06	76.99	16
$S6_{1A}$	3.13	0.96	8.11	8.390	3.32	27	49.69	69.25	17
$S6_{2A}$	2.88	0.92	6.12	8.432	3.02	35	~~23.86~~	45.01	11
$S6_{3A}$	2.97	0.91	8.45	8.357	3.51	35	48.15	71.87	13
$S6_{1B}$	3.22	0.99	6.87	8.387	3.20	32	48.39	55.00	13
$S7_{1A}$	**3.14**	**1.17**	**7.32**	**8.394**	**3.54**	**31**	**51.01**	**72.13**	**14**
$S7_{2A}$	3.16	1.19	7.63	8.405	3.58	20	64.52	80.99	25
$S7_{3A}$	3.08	0.92	7.68	8.353	3.62	27	57.12	75.78	16
$S7_{1B}$	3.06	0.84	5.98	8.392	3.47	25	61.40	83.10	20
$S8_{1A}$	3.11	0.92	11.70	8.400	3.86	17	58.81	75.38	46
$S8_{2A}$	3.21	1.18	8.94	8.393	3.63	35	55.31	77.30	13
$S8_{3A}$	3.13	1.16	7.54	8.362	3.93	36	53.04	75.40	14
$S8_{1B}$	2.68	1.02	26.53	8.377	3.94	22	64.73	86.30	25
$S9_{1A}$	3.22	1.17	7.50	8.391	3.93	32	47.20	72.83	14
$S9_{2A}$	2.93	1.00	5.71	8.391	3.52	23	57.05	76.23	20
$S9_{3A}$	3.09	1.32	12.91	8.386	3.69	37	49.90	73.44	13
$S9_{1B}$	2.88	0.99	6.24	8.370	3.42	32	50.97	75.66	15
$S10_{1A}$	3.21	~~1.22~~	8.63	8.391	3.61	35	57.48	79.13	17
$S10_{2A}$	3.19	0.88	8.11	8.398	3.69	37	53.78	76.68	12
$S10_{3A}$	3.00	0.86	6.65	8.379	3.50	36	55.04	76.86	13
$S10_{1B}$	2.74	0.87	6.76	8.377	3.50	27	59.14	77.61	22
$S11_{1A}$	2.96	1.12	13.54	8.393	4.43	39	17.49	42.77	10
$S11_{2A}$	3.03	1.17	10.69	8.393	-----	32	59.85	73.50	16
$S11_{3A}$	3.16	0.92	7.34	8.378	3.64	36	51.96	72.78	12
$S11_{1B}$	2.95	0.86	6.57	8.384	3.68	25	59.14	83.76	20

$S12_{1A}$	3.17	1.30	9.10	8.384	3.47	34	55.23	71.19	15
$S12_{2A}$	2.92	0.96	8.51	8.408	3.57	31	49.78	69.96	15
$S12_{3A}$	3.15	1.14	6.48	8.374	3.62	37	44.57	66.86	11
$S12_{1B}$	2.82	0.98	6.76	8.376	3.69	24	64.11	85.36	23
$S13_{1A}$	3.30	0.87	8.93	8.390	3.99	36	46.02	70.66	12
$S13_{2A}$	3.06	1.13	7.83	8.366	3.58	30	54.07	74.38	15
$S13_{3A}$	2.93	1.18	8.68	8.379	3.67	33	52.93	74.11	15
$S13_{1B}$	2.89	1.02	8.27	8.378	3.98	33	56.84	94.62	17
$S14_{1A}$	2.87	1.11	6.74	8.391	3.88	35	43.12	64.52	12
$S14_{2A}$	**2.98**	**0.99**	**9.62**	**8.368**	**3.59**	**35**	**53.07**	**76.81**	**12**
$S14_{3A}$	2.91	0.86	8.03	8.362	3.62	35	51.07	71.73	13
$S14_{1B}$	2.93	1.10	7.81	8.377	3.21	37	44.77	69.00	11
$S15_{1A}$	3.06	1.09	7.59	8.389	3.93	34	59.84	80.76	13
$S15_{2A}$	3.14	1.07	8.81	8.390	3.70	23	63.54	80.11	20
$S15_{3A}$	3.00	0.85	7.23	~~8.366~~	3.66	35	55.62	77.18	13
$S15_{1B}$	2.79	0.88	9.64	8.388	3.60	22	62.15	66.98	21
$S16_{1A}$	3.21	1.12	6.95	8.395	3.78	35	49.35	72.12	11
$S16_{2A}$	2.94	0.84	7.82	8.354	3.55	38	62.73	87.73	14
$S16_{3A}$	3.21	1.24	9.74	8.378	3.28	30	52.03	72.27	13
$S16_{1B}$	3.01	0.94	7.65	8.378	3.75	36	54.43	60.33	14

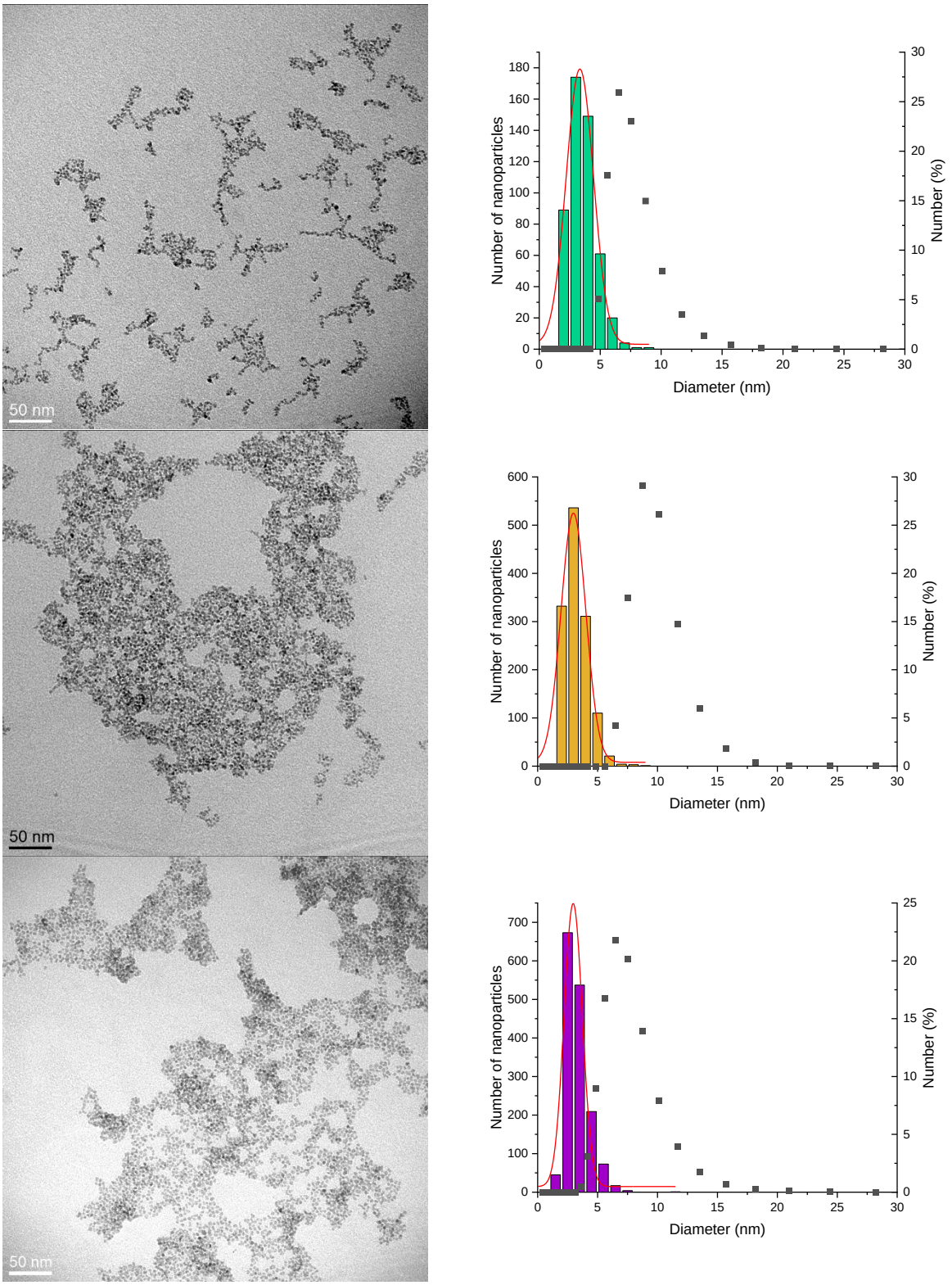


Figure S2: TEM images of $S7_{1A}$ (a), $S14_{2A}$ (c) and $S4_{1B}$ (e) with their respectively size distributions (b), (d) and (f). The main diameter of $S7_{1A}$ is 3.14 ± 1.17 nm of $S14_{2A}$ is 2.98 ± 0.99 nm and of 2.91 ± 0.83 nm. In each graph, the DLS measurements (symbols) is represented to determine the hydrodynamic diameter. This value is equal to 7.32 nm (b), 9.62 nm (d) and 7.38 nm (f) respectively for $S7_{1A}$, $S14_{2A}$ and $S4_{1B}$.

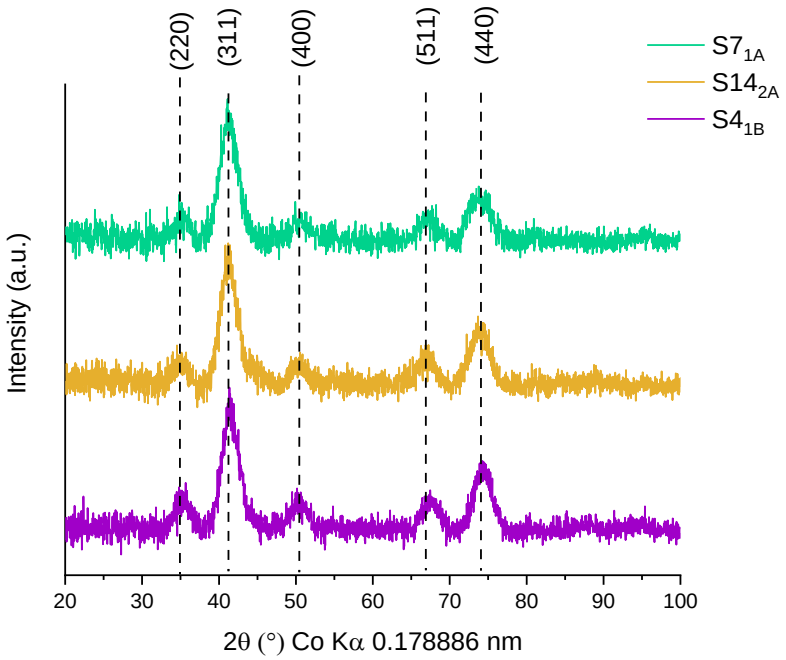


Figure S2: XRD patterns of S7$_{1A}$ (green), S14$_{2A}$ (orange) and S4$_{1B}$ (purple) with the plans of the spinel structure of magnetite Fe$_3$O$_4$.

Debye-Scherrer equation:

$$t = \frac{k \times \lambda}{\sqrt{H^2 - s^2} \times \cos(\theta)}$$

With t the crystallite size (nm), λ the wavelength (λ= 0.178886 nm), k a correction factor (0.9), H the FWHM of the main peak (311) in radian, s the FWHM of a main peak of a Si reference (s = 0.323°) and θ the position of the main peak (°).

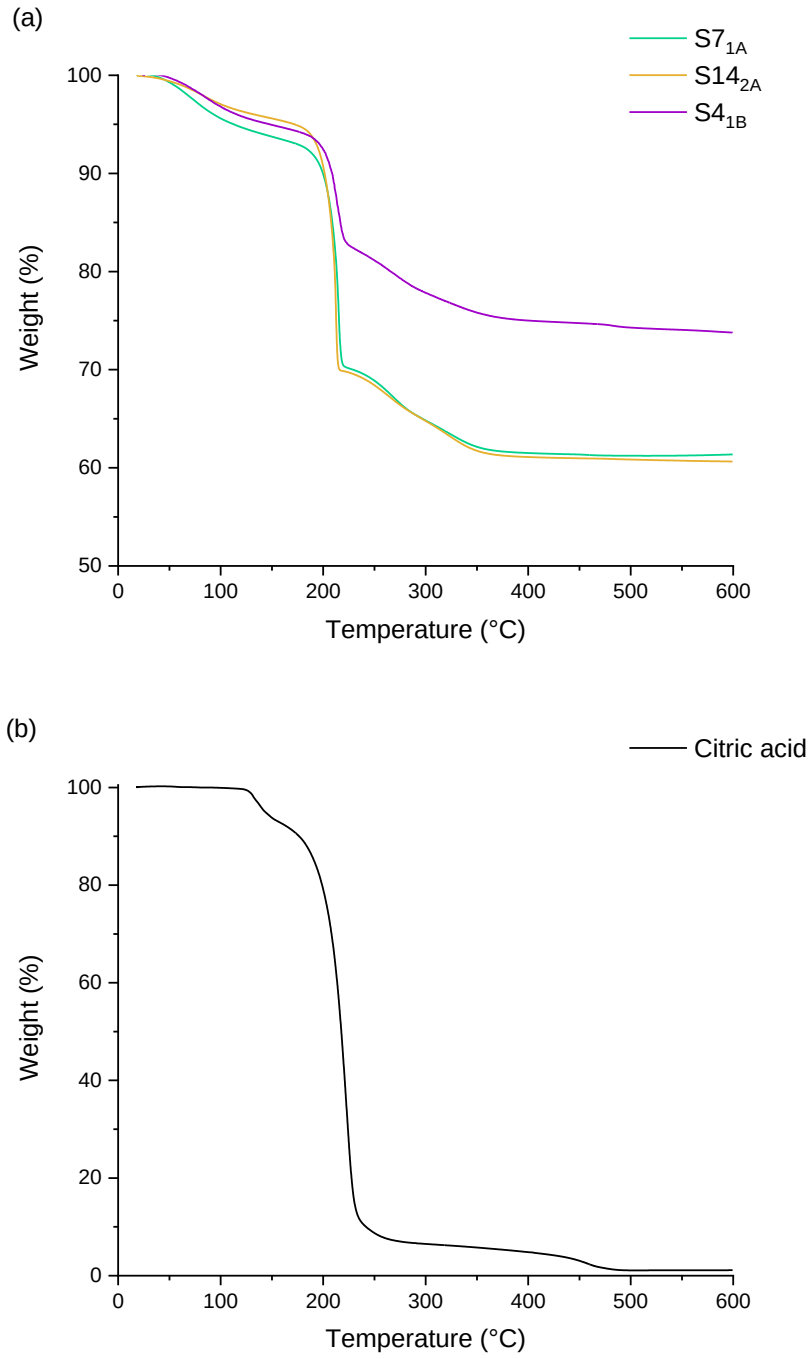


Figure S5: TGA curves of $S7_{1A}$ (green), $S14_{2A}$ (orange) and $S4_{1B}$ (purple) from 20°C to 600°C (a) and of pure citric acid (b).

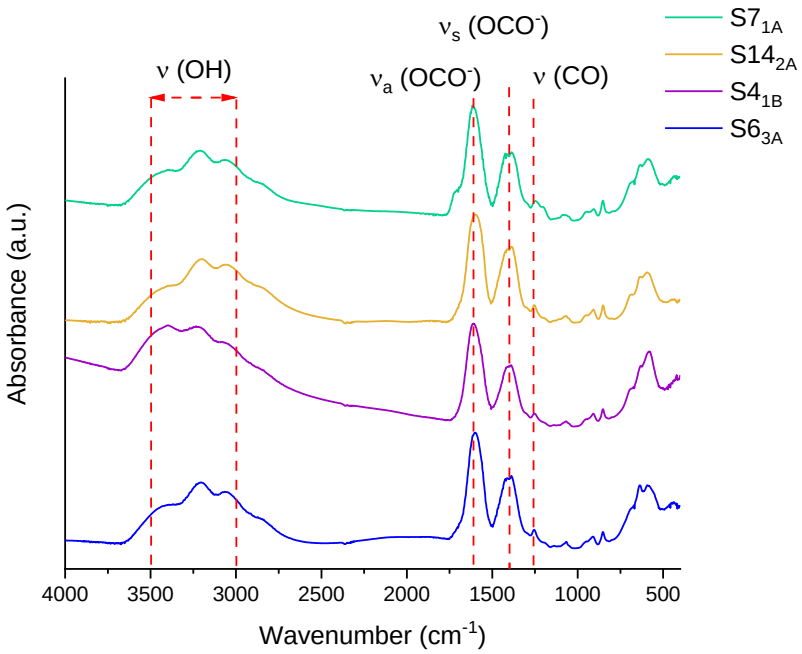


Figure S6: FTIR spectra of S7$_{1A}$ (green), S14$_{2A}$ (orange), S4$_{1B}$ (purple) and S6$_{3A}$ (blue) with the vibrational bands of citrate to confirm this ligand around the iron oxide core.

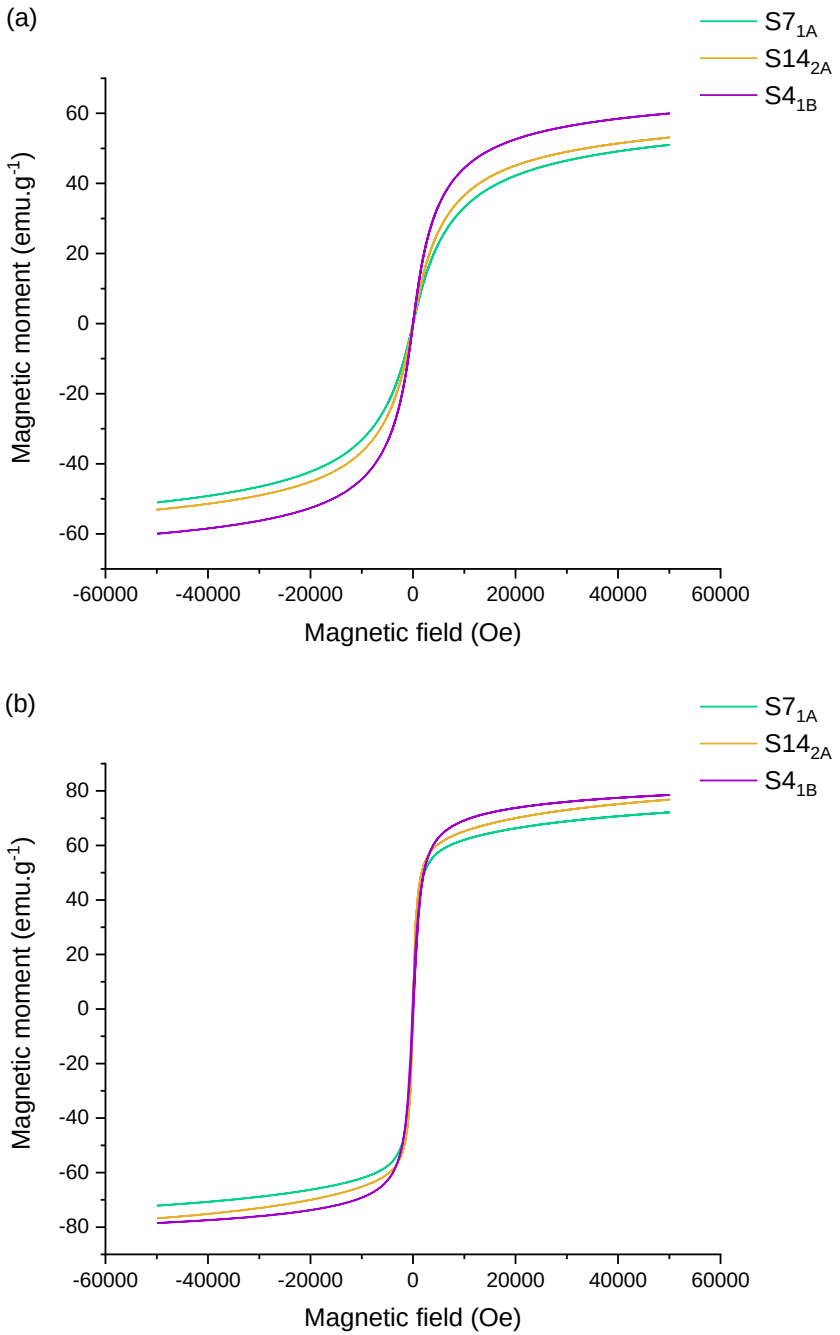


Figure S7: Magnetic cycles of $S7_{1A}$ (green), $S14_{2A}$ (orange) and $S4_{1B}$ (purple) at 300K (a) and at 5K (b).

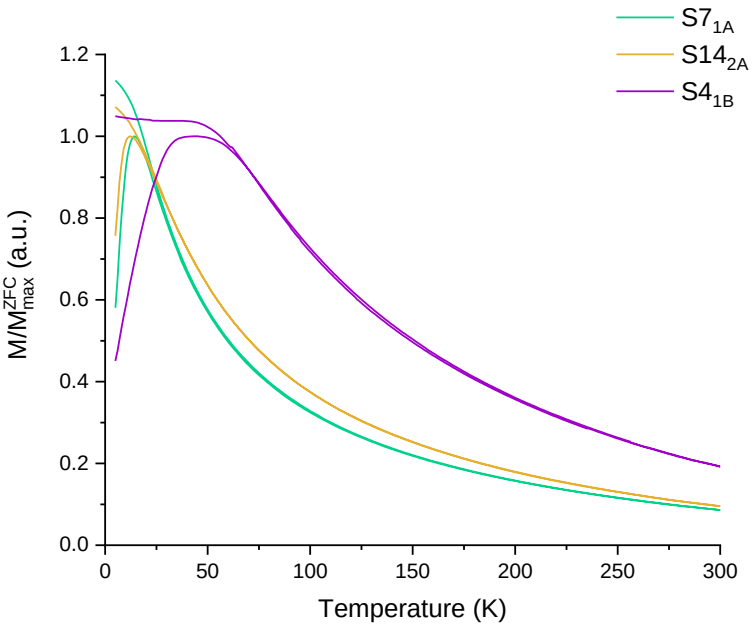


Figure S8: ZFC-FC curve of $S7_{1A}$ (green), $S14_{2A}$ (orange) and $S4_{1B}$ (purple) with a blocking temperature equals to 14K, 12K and 43K respectively for $S7_{1A}$, $S14_{2A}$ and $S4_{1B}$.

S9: Dixon's test

For a Dixon's test to discriminate the extreme values, the values should be arranged in ascending order. Then, a formula is used in function of the number of the values. For our study, there are four values, the formula used are:

For a minimum

$$x_{min} = \frac{x_2 - x_1}{x_4 - x_1}$$

For a maximum

$$x_{max} = \frac{x_4 - x_3}{x_4 - x_1}$$

If x_{min} or x_{max} is less than $r_{4;0.99}$ (value of the Dixon's table with 4 values and with a threshold of 0.01), the values are not discriminate. If the opposite is true, the extreme value (x_{min} or x_{max}) is removed.

For the ED, the different values which are removed are crossed out on the table S2. For example, the blocking temperature T_B of $S4_{1B}$ is removed compared to the other T_B values of the other samples S4.

Table S3: ANOVA values of the experiments from the ED of the same operator (ED_{1A}, ED_{2A} and ED_{3A}) to see the repeatability of the ED ($\alpha = 0.01$). The values on red are significantly different.

	d_{TEM} (nm)	σ_{TEM} (nm)	d_{hydro} (nm)	a_{XRD} (Å)	t_{XRD} (nm)	$\%_{lig}$ (%)	M_s 300K ($emu.g^{-1}$)	M_s 5K ($emu.g^{-1}$)	T_B (K)
Degree of freedom	47	46	47	45	46	46	46	47	47
F_{cal}	1.4212	0.0085	0.0706	14.8010	4.8702	2.0361	4.1019	1.3254	0.7870
p value	0.2520	0.9915	0.9320	0.0000	0.0123	0.1427	0.0233	0.2759	0.4614

Table S4: ANOVA values of the experiments from the ED to see the reproducibility of the ED ($\alpha = 0.01$). The values on red are significantly different.

	d_{TEM} (nm)	σ_{TEM} (nm)	d_{hydro} (nm)	a_{XRD} (Å)	t_{XRD} (nm)	$\%_{lig}$ (%)	M_s 300K ($emu.g^{-1}$)	M_s 5K ($emu.g^{-1}$)	T_B (K)
Degree of freedom	31	31	31	31	31	31	31	31	29
F_{cal}	8.8201	9.9501	0.0547	0.1425	0.7093	7.4991	6.6515	2.6868	6.4801
p value	0.0058	0.0036	0.8167	0.7085	0.4063	0.0103	0.0151	0.1116	0.0167

Table S5: Average of the different responses of the ED for each level of each factor.

Factor with the level	d_{TEM} (nm)	σ_{TEM} (nm)	d_{hydro} (nm)	a_{XRD} (Å)	t_{XRD} (nm)	$\%_{lig}$ (%)	M_s 300K (emu.g^{-1})	M_s 5K (emu.g^{-1})	T_B (K)
A1	3.05	0.99	8.08	8.386	3.63	28	51.55	72.49	17
A2	3.03	1.02	9.05	8.386	3.56	30	52.22	70.19	18
A3	3.03	1.03	8.22	8.386	3.68	32	52.04	73.41	16
A4	3.01	1.02	8.21	8.380	3.67	33	53.85	74.58	14
B1	2.98	1.07	8.18	8.384	3.63	31	48.01	70.95	15
B2	3.00	0.94	7.69	8.386	3.50	33	50.62	69.83	14
B3	3.09	0.99	8.42	8.386	3.72	29	55.58	74.83	18
B4	3.07	1.04	9.26	8.381	3.70	30	55.46	75.07	17
C1	3.02	1.02	8.30	8.386	3.56	32	48.78	67.13	15
C2	2.98	1.02	7.95	8.387	3.62	31	51.68	71.11	15
C3	3.05	1.04	9.62	8.382	3.68	30	53.42	75.13	18
C4	3.08	0.98	7.68	8.382	3.68	30	55.78	77.31	16
D1	2.99	1.06	7.79	8.384	3.55	30	51.15	72.20	16
D2	3.02	1.02	9.86	8.385	3.79	31	51.73	74.05	17
D3	3.07	0.98	8.05	8.382	3.60	32	52.77	72.86	16
D4	3.05	1.00	7.85	8.386	3.60	30	54.03	71.57	15
E1	2.99	1.00	9.45	8.387	3.65	29	54.82	74.84	19
E2	3.05	1.03	7.77	8.385	3.59	30	53.45	74.15	15
E3	3.08	1.01	8.05	8.385	3.58	31	52.76	72.23	16
E4	3.00	1.01	8.29	8.380	3.71	33	48.64	69.45	14

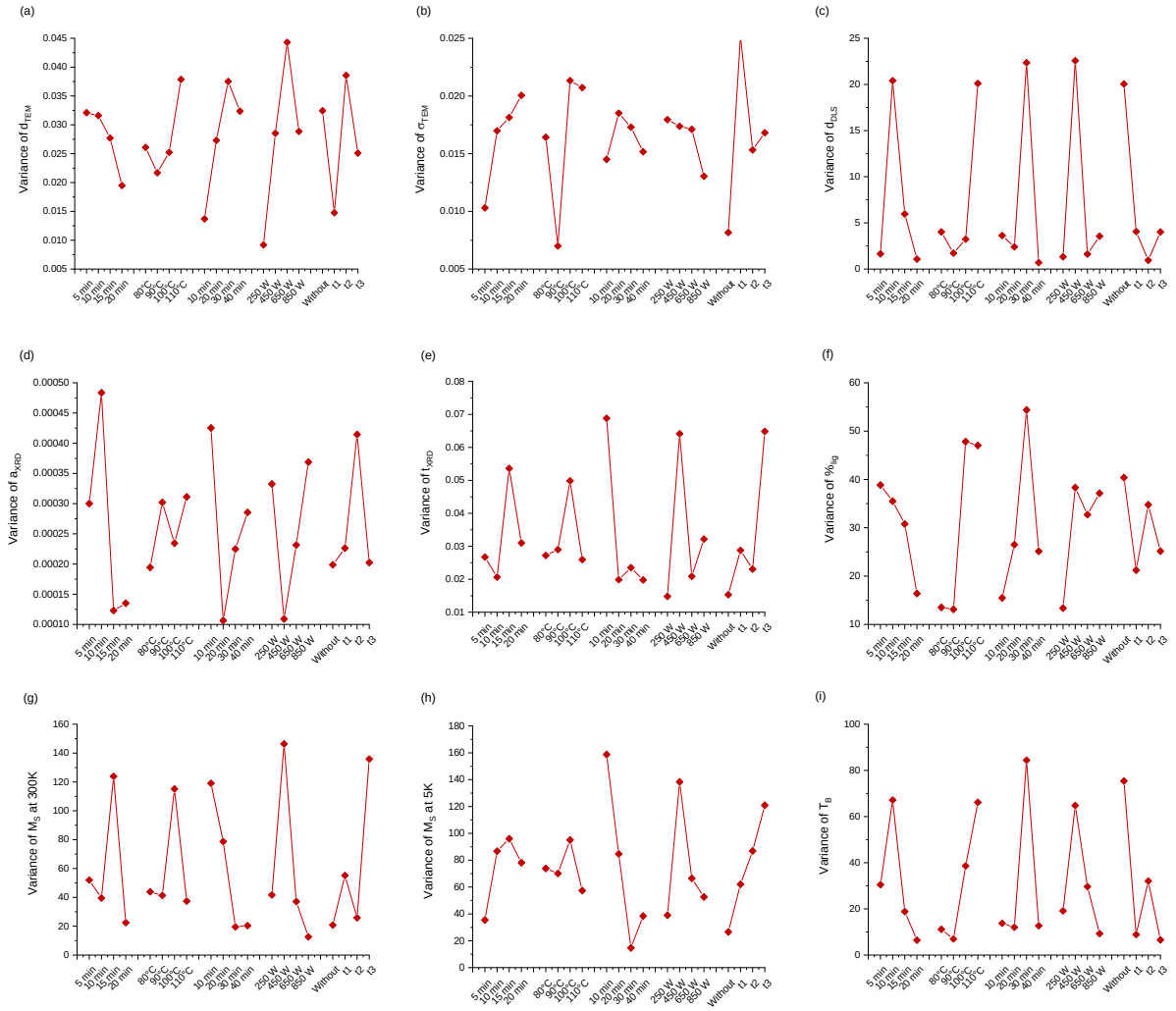


Figure S10: Variance diagrams of each response of the ED in function the level of each factor (the mean diameter d_{TEM} (a), the standard deviation σ_{TEM} (b), the hydrodynamic diameter d_{DLS} (c), the lattice parameter a_{XRD} (d), the crystallite size d_{XRD} (e), the percentage of ligands $\%_{lig}$ (f), the magnetization saturation at 300K M_S_300K (g), at 5K M_S_5K (h) and the blocking temperature T_B (i)).

Table S6: Table of the microwave parameters of experiments to validate the ED. The first three were chosen at random. The last three were chosen for their optimised responses.

Samples	A	B	C	D	E
S_{50}	1	1	4	1	2
S_{477}	2	4	2	4	1
S_{753}	3	4	4	1	1
S_{893}	4	2	4	4	1
S_{957}	4	3	4	4	1
S_{1021}	4	4	4	4	1

Table S7: Summarize of the different responses (theoretical in red and experimental in black) of the experiments to validate the ED.

Sample	d_{TEM} (nm)	σ_{TEM} (nm)	d_{hydro} (nm)	a_{XRD} (Å)	t_{XRD} (nm)	$\%_{lig}$ (%)	M_s 300K (emu.g^{-1})	M_s 5K (emu.g^{-1})	T_B (K)
$S_{50\ theo}$	3.03	1.02	7.98	8.3842	3.62	30	52.06	73.29	16
$S_{50\ exp}$	2.98	1.05	8.57	8.3789	3.17	34	52.11	74.42	14
$S_{477\ theo}$	3.03	1.02	8.66	8.3851	3.63	30	53.44	72.57	17
$S_{477\ exp}$	2.69	0.96	57.28	8.3785	2.48	40	12.08	37.56	11
$S_{753\ theo}$	3.03	1.02	8.46	8.3841	3.65	30	53.61	74.25	17
$S_{753\ exp}$	3.10	0.81	7.90	8.3946	3.66	35	60.83	81.93	15
$S_{893\ theo}$	3.03	0.99	8.21	8.3842	3.62	31	53.58	73.47	16
$S_{893\ exp}$	2.84	0.88	8.46	8.3818	3.40	32	59.30	80.37	13
$S_{957\ theo}$	3.04	1.00	8.33	8.3842	3.66	30	54.41	74.30	16
$S_{957\ exp}$	3.19	0.74	9.03	8.3729	3.49	32	53.83	74.30	14
$S_{1021\ theo}$	3.04	1.01	8.47	8.3833	3.66	30	54.39	74.34	16
$S_{1021\ exp}$	3.15	0.99	5.83	8.3852	3.34	26	38.59	57.67	16

Chapitre 4

Relation nanostructure/composition/propriétés magnétiques dans les nanoparticules d'oxyde de fer

Table des matières Chapitre 4

1. Une première approche pour distinguer la magnétite et la maghémite _____ 193

1.1. La diffraction des Rayons X _____ 195

1.2. La spectroscopie infra-rouge _____ 196

2. Utilisation de techniques plus performantes pour déterminer la quantité de magnétite et de maghémite _____ 197

2.1. La microscopie électronique en transmission à haute résolution _____ 197

2.2. La spectroscopie Mössbauer _____ 200

2.3. La spectroscopie Raman _____ 201

3. Détermination d'un système homogène ou cœur@coquille par des mesures magnétiques _____ 203

4. Conclusion générale du Chapitre 4 _____ 205

5. Bibliographie Chapitre 4 _____ 206

Les chapitres précédents ont montré la faisabilité de la synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer de type magnétite Fe_3O_4 par voie micro-ondes. La synthèse de ces nanoparticules réalisée dans l'eau peut favoriser une oxydation partielle de la surface de la magnétite. En effet, les ions Fe^{2+} présents dans la structure cristalline de la magnétite peuvent s'oxyder en Fe^{3+} à cause des molécules de O_2 présentes dans l'air ou des molécules d'eau de la solution. Cette oxydation va engendrer une baisse de l'aimantation à saturation et donc une baisse d'efficacité des nanoparticules en tant qu'agent de contraste en IRM. Le contrôle de la stœchiométrie constitue donc un paramètre clé afin d'obtenir des nanoparticules de magnétite les moins oxydées possible et les plus efficaces pour l'application visée. En effet, l'aimantation à saturation M_S d'un massif de magnétite Fe_3O_4 est vaut environ 92 $emu.g^{-1}$ alors que celle de la maghémite massive est aux alentours de 74 $emu.g^{-1}$ [1,2].

Au cours de la synthèse, l'introduction au milieu réactionnel des ligands citrates, en plus d'assurer la stabilisation électro-stérique entre les nanoparticules et leur dispersion dans le milieu aqueux, doit limiter l'oxydation de surface des nanoparticules. Cependant, ces ligands ne couvrent pas intégralement la surface des nanoparticules et une oxydation est toujours possible. Le but de ce chapitre est d'accéder à la composition précise des nanoparticules d'oxydes de fer synthétisées de formule $Fe_{3-\delta}O_4$ en déterminant la valeur de l'écart à la stœchiométrie δ. En complément de différentes techniques de caractérisation classiquement utilisées pour caractériser les nanoparticules inorganiques (diffraction des rayons X, la spectroscopie infra-rouge et la microscopie électronique en transmission à haute résolution (METHR)), des mesures en spectroscopie Mössbauer sont comparées dans à des résultats issus la spectroscopie Raman afin de déterminer exactement cet écart à la stœchiométrie.

1. Une première approche pour distinguer la magnétite et la maghémite

Pour déterminer au mieux la stœchiométrie de nos nanoparticules, trois échantillons issus des synthèses précédemment décrites ont été sélectionnés : l'échantillon de référence décrit dans le chapitre 2 (NPs_{MW}@Cit) et deux provenant du plan d'expérience du chapitre 3 (S3 et S8). Pour des raisons de simplicité et de compréhension, ces trois échantillons ont été renommés SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 et SPIONs_CA3 respectivement dans la suite de ce manuscrit.

Les images de microscopie électronique en transmission des échantillons sélectionnés sont reportées en Figure 4. 1 (respectivement 1.a, 1.c et 1.e pour SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 et SPIONs_CA3). Pour ces trois échantillons, les nanoparticules sont isolées et sphériques. Les distributions de taille issues des micrographies permettent de déterminer le diamètre moyen des nanoparticules. Ainsi, SPIONs_CA1 a un diamètre de 2,52 ± 0,78 nm (Figure 4. 1.b), SPIONs_CA2 a un diamètre de 3,20 ± 0,87 nm (Figure 4. 1.d) et SPIONs_CA3 a un diamètre de 3,48 ± 1,02 nm (Figure 4. 1.f).

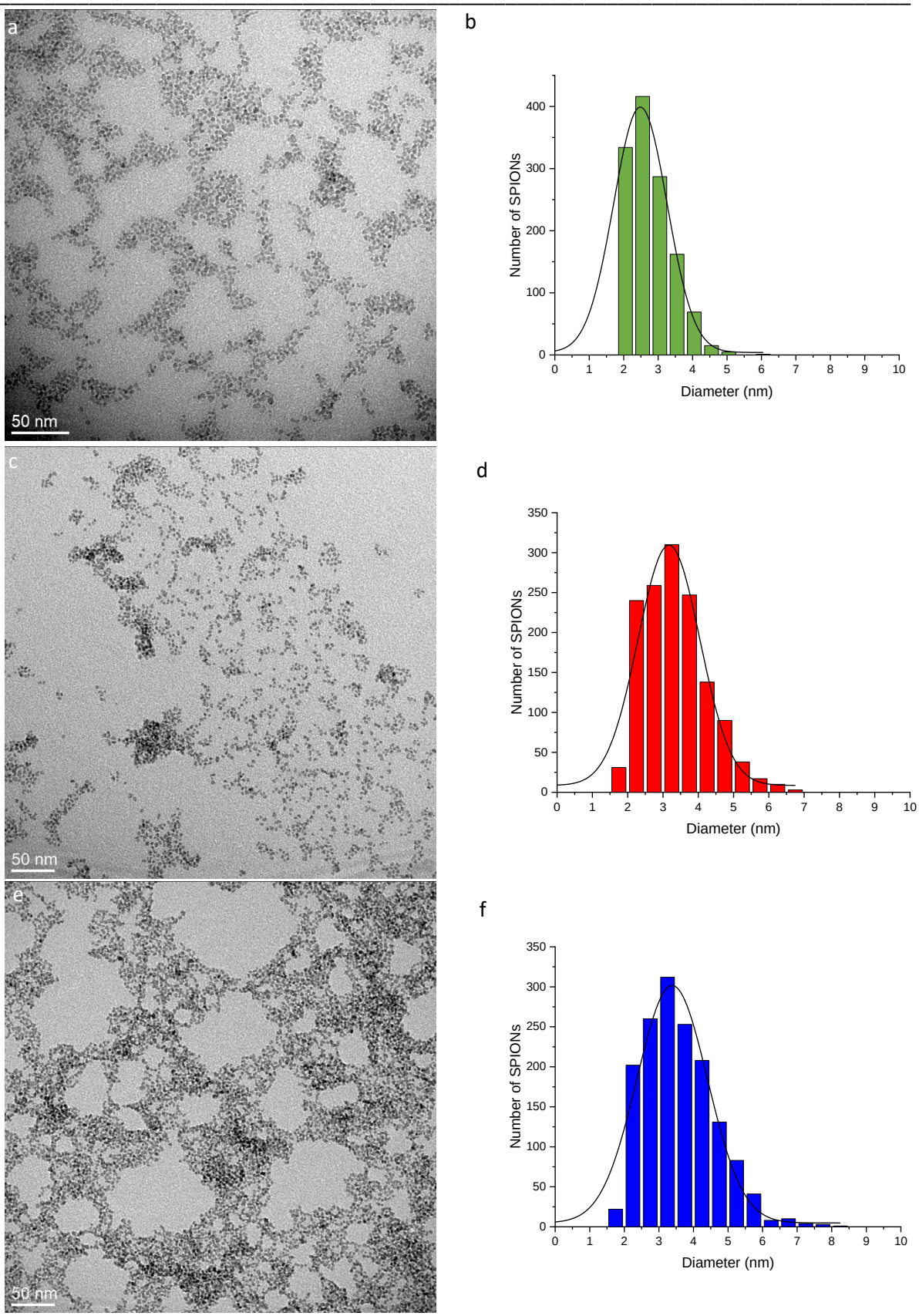


Figure 4. 1 : Micrographies MET de SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (c) et SPIONs_CA3 (e) avec leur histogramme de distribution de taille ajusté d'une fonction gaussienne (respectivement b, d et f).

Afin de connaître au mieux la quantité de magnétite et de maghémite dans ces échantillons (et donc de déterminer l'écart à la stœchiométrie recherché dans ce chapitre), une première analyse réalisée est une mesure par diffraction des rayons X.

1.1. La diffraction des Rayons X

La diffraction des Rayons X (DRX) est une technique qui permet de déterminer la structure cristalline des matériaux. Cependant, la structure cristalline de la magnétite et de la maghémite sont similaires : ces deux structures cristallisent dans une structure cubique de type $\mathrm{F_{d\bar{3}m}}$. La différence entre ces deux structures est la valeur du paramètre de maille (8,395 Å pour Fe_3O_4 et 8,354 Å pour γ-Fe_2O_3) [3,4] impliquant expérimentalement un décalage du diffractogramme de la maghémite vers les hauts angles en comparaison avec un diffractogramme de la magnétite.

Certains auteurs ont déterminé un pourcentage de magnétite au sein de leurs échantillons grâce aux DRX dans la littérature [5]. En effet, Kim et al ont montré que selon la composition en magnétite de leur échantillon, la raie (511) ne se situait pas aux mêmes valeurs d'angles et que son intensité variait (Figure 4. 2). Ils ont développé, dans leurs travaux, une relation linéaire entre le pourcentage de magnétite et le rapport d'intensité des raies de la (511) entre la magnétite et la maghémite.

D'autres auteurs ont utilisé un procédé similaire mais sur des raies différentes. Schwaminger et al ont ainsi exploité la raie (440) [6].

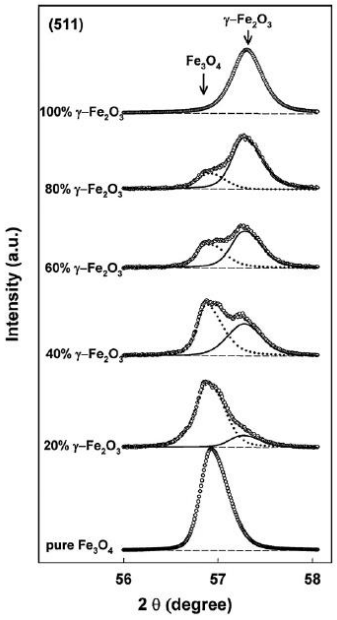


Figure 4. 2 : Diffractogramme de la raie (511) permettant de différencier la magnétite Fe_3O_4 de la maghémite γ-Fe_2O_3 d'après Kim et al [5].

Pour ces deux cas, la taille des nanoparticules était supérieure à 10 nm avec une cristallinité des nanoparticules élevée rendant possible une étude par DRX. Pour nos échantillons de nanoparticules,

les raies principales de la structure spinelle de la magnétite ou de la maghémite sont visibles (fiche JCPDS 04-013-7114 et 04-016-4344) (Figure 4. 3.a). Cependant, comme le diamètre du cœur inorganique est inférieur à 10nm, il est difficile de visualiser le décalage des raies (511) et (440) afin de déterminer la proportion de Fe_3O_4 ou de γ-Fe_2O_3 (Figure 4. 3.b) en raison de la largeur des raies de diffraction. Afin d'avoir une meilleure évaluation de la proportion de magnétite et de maghémite dans nos échantillons, la spectroscopie infra-rouge peut être envisagée.

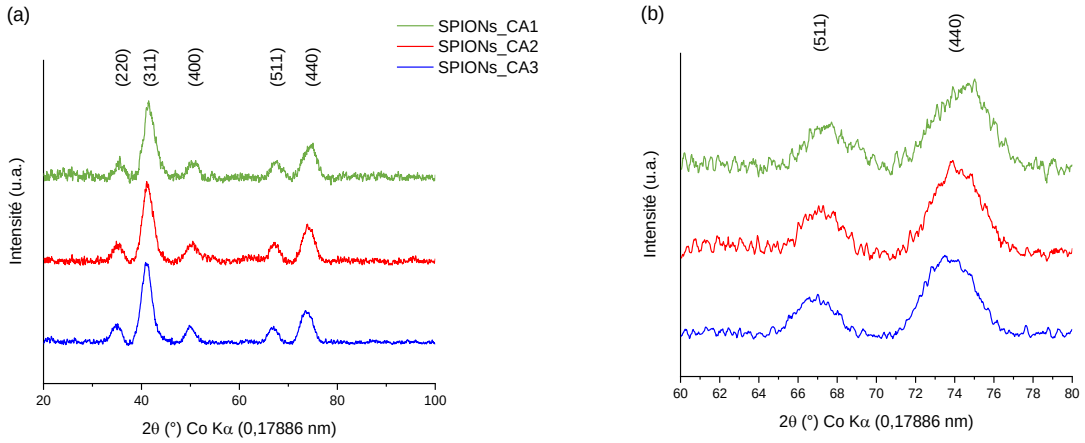


Figure 4. 3 : Diffractogrammes de SPIONs_CA1 (vert), SPIONs_CA2 (rouge) et SPIONs_CA3 (bleu) de 20 à 100° (a) et avec un agrandissement sur les raies (511) et (440) (b).

1.2. La spectroscopie infra-rouge

Comme nous l'avons montré dans le chapitre 1, le spectre infra-rouge d'une poudre de magnétite ne comporte qu'une seule bande de vibration correspondant à l'élongation symétrique de la liaison Fe-O entre 580 et 590 cm^{-1} [7]. Quant à la poudre de maghémite, son spectre infra-rouge comporte une succession de bandes de vibration entre 500 cm^{-1} et 800 cm^{-1}. Grâce à cette technique de caractérisation, une estimation qualitative de la proportion de magnétite et de maghémite dans nos échantillons peut être réalisée. En effet, dans le cas de magnétite légèrement oxydée, les bandes de vibrations de la maghémite apparaissent. Plus la magnétite s'est oxydée en maghémite, plus les bandes de vibration de la maghémite sont intenses. Sur la Figure 4. 4, les trois échantillons sélectionnés présentent à la fois la bande de vibration correspondant à la magnétite (580 cm^{-1}) et les bandes de la maghémite (640 cm^{-1} et 690 cm^{-1}). Cependant, la bande à 640 cm^{-1} est plus intense pour SPIONs_CA1 et SPIONs_CA3 et celle à 690 cm^{-1} apparaît plus intense pour SPIONs_CA2. Cette observation rend impossible de définir visuellement quel échantillon possède la plus grande proportion de magnétite.

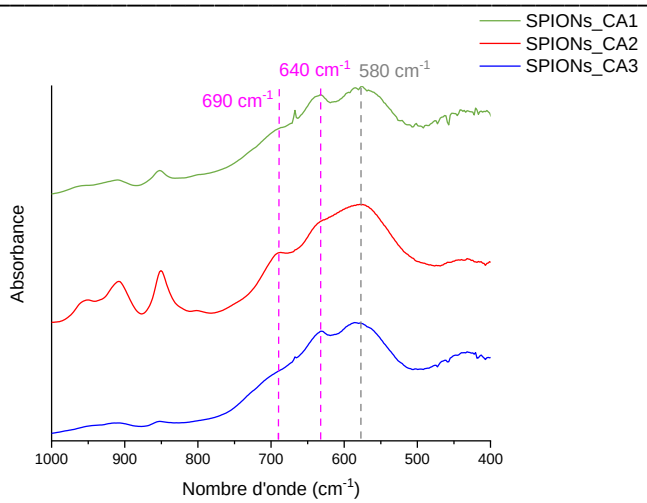


Figure 4. 4 : Spectre infrarouge de de SPIONs_CA1 (vert), SPIONs_CA2 (rouge) et SPIONs_CA3 (bleu) centré sur les bandes de vibration de la magnétite et de la maghémite (entre 400 et 1000 cm^{-1}).

Les résultats obtenus par cette technique ne nous permettent donc pas de quantifier exactement la proportion de magnétite et de maghémite dans l'échantillon et donc elle ne nous permet pas de déterminer la valeur de cet écart à la stœchiométrie.

2. Utilisation de techniques plus performantes pour déterminer la quantité de magnétite et de maghémite

2.1. La microscopie électronique en transmission à haute résolution

Une autre technique de caractérisation qui peut permettre de distinguer la magnétite de la maghémite dans nos échantillons est la Microscopie Electronique en Transmission à Haute Résolution (METHR). En effet, grâce à cette technique, les différents plans du réseau cristallin peuvent être visualisés : il est donc possible de déterminer la distance interplanaire et donc de déterminer le paramètre de maille. Or, le paramètre de maille de la magnétite est différent de celui de la maghémite : plus la magnétite est oxydée, plus son paramètre de maille diminue pour se rapprocher de celui de la maghémite pure. Les images à haute résolution ont été prises pour nos trois échantillons sélectionnés selon deux modes : en mode champ sombre annulaire ou mode ADF (Figure 4. 5.a, 5.c et 5.e pour SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 et SPIONs_CA3 respectivement) et en mode champ clair ou mode BF (Figure 4. 5.b, 5.d et 5.f). Sur les clichés en mode ADF, les atomes de fer sont visibles dans les différentes nanoparticules (points blancs). Les clichés en mode BF confirment bien la présence de ces atomes de fer et permettent de mieux visualiser les différents plans. Le paramètre de maille peut ainsi être calculé en mesurant la distance entre ces plans. Pour SPIONs_CA1, la distance entre deux plans est de 0,296 nm, ce qui correspond à la distance entre deux plans (220) : le paramètre de maille est donc égal à 8,372 Å. Pour SPIONs_CA2, la distance est de 0,295 nm, ce qui correspond à un paramètre de maille de 8,343 Å. Enfin, pour SPIONs_CA3, la distance est de 0,296 nm correspondant à un paramètre de maille de 8,372 Å. Les paramètres de maille de SPIONs_CA1 et SPIONs_CA3 sont compris entre celui de la magnétite et celui de la maghémite (pour rappel : 8,395 Å pour Fe_3O_4 et 8,354 Å pour γ-Fe_2O_3) [3,4] : ces deux

échantillons sont de la magnétite sous stœchiométrique. Le paramètre de maille déterminé pour SPIONs_CA2 est inférieur à celui de la maghémite. Une erreur sur la lecture de la distance dû au logiciel entre les deux plans est probable.

Cette technique permet de visualiser au plus proche les nanoparticules d'oxyde de fer pour déterminer le paramètre de maille. Cependant, la précision de mesure de la distance entre deux plans étant difficile, la valeur obtenue du paramètre de maille est indicative mais ne permet pas de déterminer strictement si nos échantillons contiennent plus de magnétite que de maghémite.

Pour déterminer avec une plus grande précision la proportion de magnétite et de maghémite dans nos échantillons, la spectroscopie Mössbauer peut être utilisée.

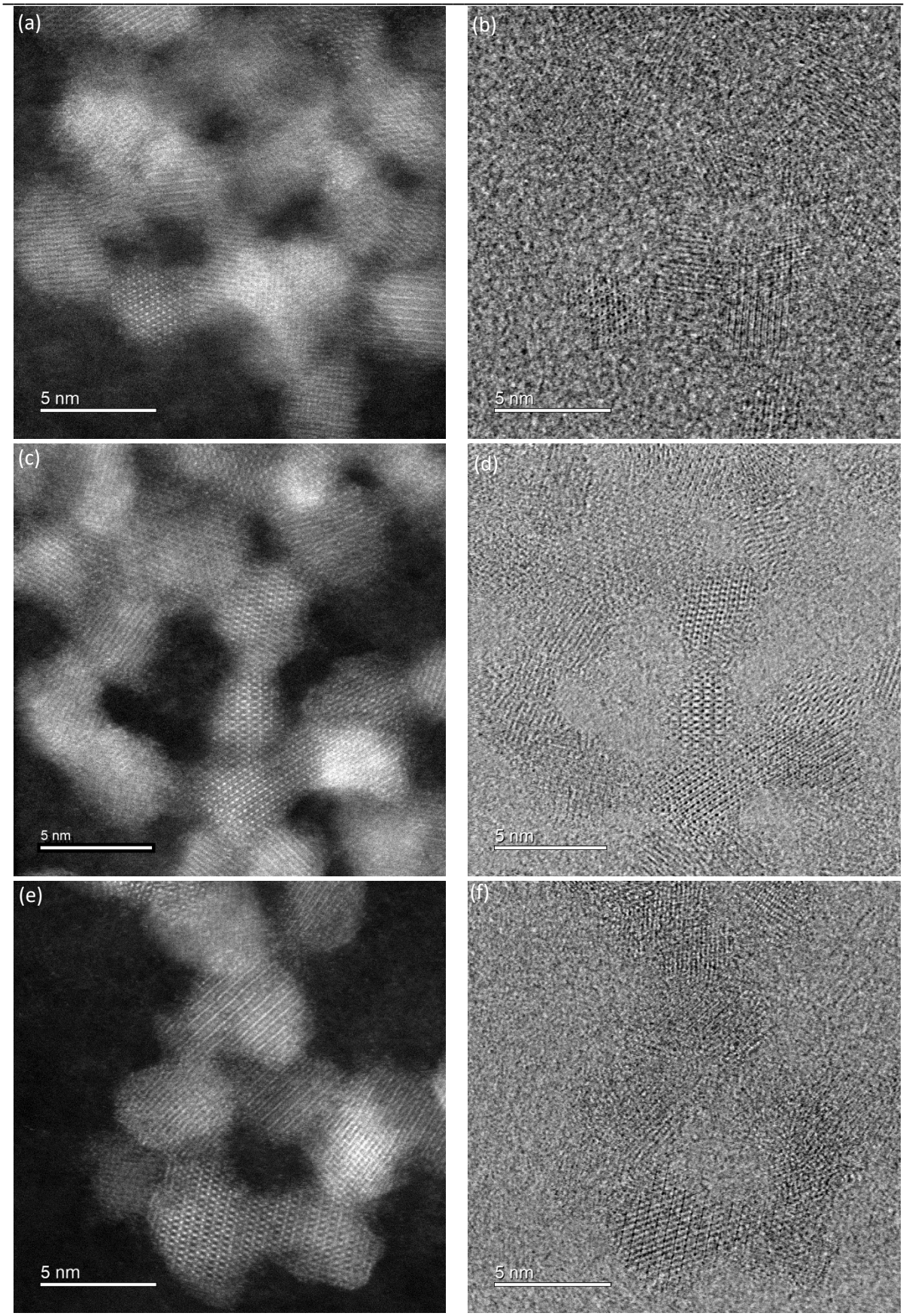


Figure 4. 5 : Micrographies MET de SPIONs_CA1 (a et b), SPIONs_CA2 (c et d) et de SPIONs_CA3 (e et f) en mode champ sombre (a, c et e) et en mode champ clair (b, d et f).

2.2. La spectroscopie Mössbauer

La spectroscopie Mössbauer est une technique basée sur l'absorption des rayons gamma par des noyaux atomiques, notamment le fer. Cette technique de sonde locale permet de déterminer la quantité de magnétite dans les échantillons. En effet, elle est très sensible au degré d'oxydation des atomes de fer et à leur environnement chimique, cristallographique et magnétique.

Les spectres Mössbauer ^{57}Fe ont été réalisés à 300K et à 4K. En effet, les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées sont superparamagnétiques à température ambiante et dans un état bloqué en dessous de leur température de blocage (de l'ordre de 10/15K) : l'environnement magnétique est donc différent à 300K et à 5K.

Pour les trois échantillons SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 et SPIONs_CA3, les spectres Mössbauer enregistrés à température ambiante présentent un doublet confirmant l'état superparamagnétique (Figure 4. 6).

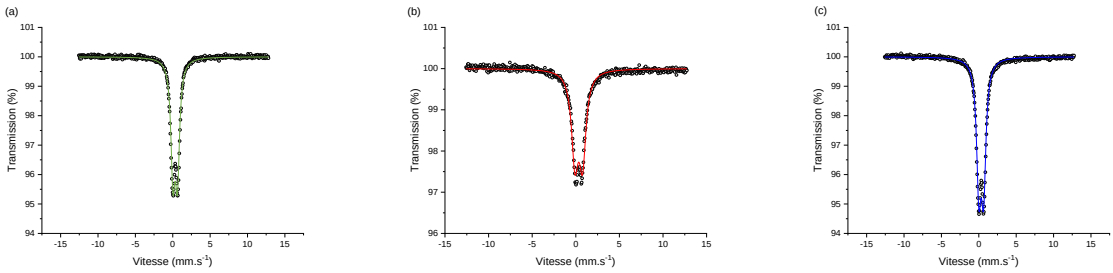


Figure 4. 6 : Spectres Mössbauer à 300K de SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (b) et SPIONs_CA3 (c).

Cependant, à cette température et à cause de la présence de ce doublet superparamagnétique, il n'est pas possible de déterminer et donc de quantifier les oxydes de fer présents dans les échantillons. Quelques auteurs ont néanmoins montré que pour de la magnétite pure conservée sous atmosphère inerte, le spectre Mössbauer à température ambiante présente une seule raie large (Figure 4. 7.a) [8]. D'autres auteurs ont montré que pour de la maghémite pure, le spectre Mössbauer associé à ce composé présente un doublet (Figure 4. 7.c) [9]. Dans notre cas, les spectres en Figure 4. 6 présentent bien ce doublet synonyme de la présence de maghémite mais ils sont moins larges que de la maghémite pure : il y a donc un mélange de magnétite et de maghémite dans nos échantillons, confirmant les mesures précédentes. Ces résultats sont aussi confirmés par différents auteurs, notamment par Thakur et al (Figure 4. 7.b) [10].

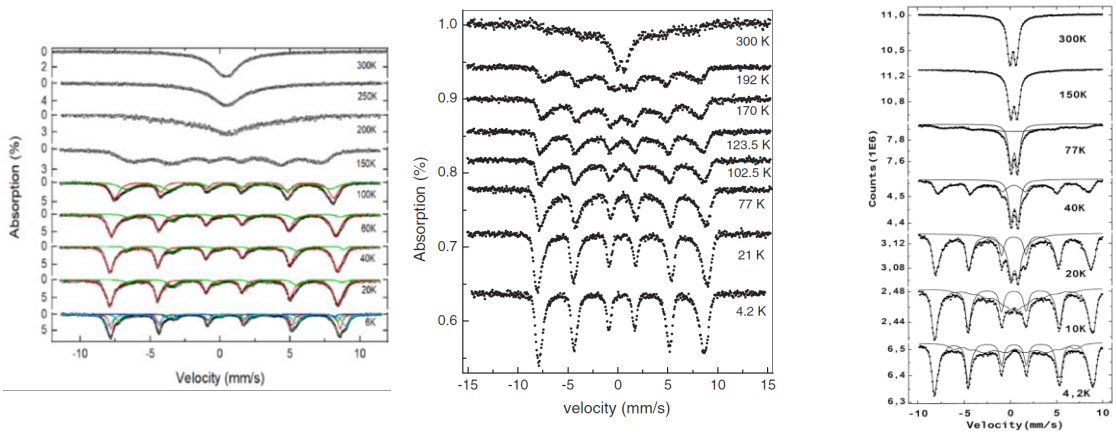


Figure 4. 7 : Spectres Mössbauer de magnétite pure Fe_3O_4 à différentes températures d'après Hah et al (a) [8], de magnétite sous-stœchiométrique $Fe_{3-\delta}O_4$ à différentes températures d'après Thakur et al (b) [10] et de maghémite γ-Fe_2O_3 à différentes températures d'après Tronc et al (c) [9].

L'état superparamagnétique des nanoparticules à température ambiante rendant difficile la détermination de la quantité de magnétite présente, une mesure à très basse température (4K) a été réalisée afin de faire abstraction de cet état magnétique en étant dans un état bloqué. Les résultats de ces mesures à 4K sont détaillés dans la publication «Determination of the percentage of magnetite in iron oxide nanoparticles: a comparison between Mossbauer spectroscopy and Raman spectroscopy. » à la fin de ce chapitre.

La spectroscopie Mössbauer est une des techniques les plus précises pour déterminer la proportion d'ions ferreux et ferriques dans un échantillon et pour connaître la stœchiométrie exacte de l'oxyde de fer. Le pourcentage de magnétite déterminée par des mesures à 4K pour SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 et SPIONs_CA3 est respectivement de 64%, 65% et 54%. Cependant, les mesures permettant l'obtention de ces résultats sont longues et peu d'équipements sont disponibles pour effectuer des mesures de routine. Une alternative a donc été envisagée avec des analyses de spectroscopie Raman.

2.3. La spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique vibrationnelle qui permet de déterminer la composition chimique des échantillons. Un faisceau laser est focalisé sur l'échantillon afin d'étudier la lumière diffusée. Pour la magnétite et la maghémite, les spectres Raman sont différents et permettent d'identifier le type d'oxyde présent dans les produits de synthèses (voir paragraphe 1.2.4 du chapitre 1).

En effet, du fait de la présence de lacunes cationiques dans sa structure cristallographique, la maghémite (de formule $(Fe^{3+})_{tétra}(Fe^{3+}_{5/3}\square_{1/3})_{octa}(O^{2-})_4$) ne possède pas le même ordre structural que la magnétite conduisant à un décalage des bandes de vibrations de la maghémite par rapport à celle de la magnétite.

Pour une structure spinelle comme la magnétite et la maghémite, la symétrie est de type O_h donnant ainsi comme représentation irréductible les modes de vibrations suivants :

$$\Gamma_{vib} = A_{1g} \oplus E_g \oplus T_{1g} \oplus 3T_{2g} \oplus 2A_{2u} \oplus 2E_u \oplus 4T_{1u} \oplus 2T_{2u} \qquad \text{Eq.42}$$

Pour la magnétite, d'après la théorie des groupes, cinq de ces modes de vibrations sont actifs, à savoir A_{1g} + E_g + $3T_{2g}$, et observables à 193 cm^{-1} (T_{2g}), 306 cm^{-1} (E_g), 450 cm^{-1} (T_{2g}), 538 cm^{-1} (T_{2g}) et 670 cm^{-1} (A_{1g}). Cependant, pour des échantillons à l'échelle nanométrique, seules les bandes à 306 cm^{-1}, 538 cm^{-1} et 670 cm^{-1} (la plus intense) sont présentes.

Pour la maghémite, le nombre de bandes présentes sur un spectre Raman doit être similaire à celui de la magnétite d'après la théorie des groupes mais avec un décalage dû à l'organisation des lacunes cationiques. Par exemple, la bande la plus intense (A_{1g}) ne se situe plus à 670 cm^{-1} mais à 720 cm^{-1} [11,12]. La translation de cette bande vers les hauts nombres d'onde est caractéristique de l'oxydation des ions Fe^{2+} en Fe^{3+} dans la structure (Figure 4. 8).

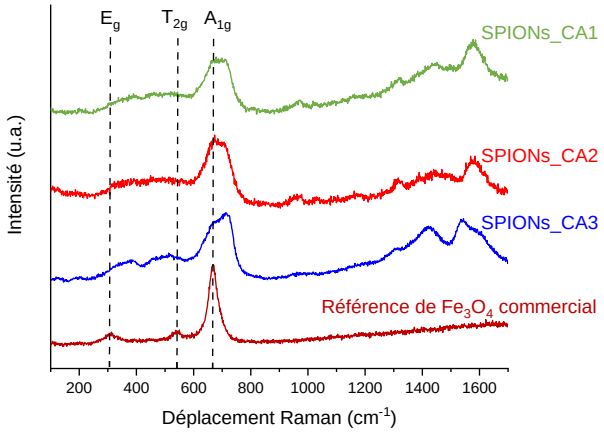


Figure 4. 8 : Spectres Raman de SPIONs_CA1 (vert), SPIONs_CA2 (rouge) et SPIONs_CA3 (bleu) comparé à une référence commerciale de magnétite (bordeaux) montrant les bandes de vibration de la magnétite.

Pour les trois synthèses, la bande A_{1g} s'étend de 630 cm^{-1} à 740 cm^{-1} confirmant que nos nanoparticules synthétisées correspondent à de la magnétite sous stœchiométrique. Par des ajustements avec des fonctions gaussiennes fixées à 670 cm^{-1} et à 720 cm^{-1}, la proportion de magnétite et de maghémite peut être déterminée. Les résultats des déconvolutions de la bande A_{1g} sont décrits dans la publication «Determination of the percentage of magnetite in iron oxide nanoparticles: a comparison between Mossbauer spectroscopy and Raman spectroscopy. » à la fin de ce chapitre.

En conclusion, les proportions obtenues en spectroscopie Raman sont du même ordre de grandeur que celles obtenues en spectroscopie Mössbauer : la spectroscopie Raman peut ainsi nous aider à donner une estimation de la proportion de magnétite et donc de la stœchiométrie des nanoparticules synthétisées. Néanmoins, une dernière interrogation reste de rigueur. En effet, selon la littérature, les

nanoparticules d'oxyde de fer avec des diamètres inférieurs à 10 nm sont composées essentiellement de maghémite (due à la grande réactivité de surface) ou sont des systèmes de type cœur-coquille avec un cœur de magnétite et une coquille de maghémite [13]. Pour déterminer si les nanoparticules synthétisées aux micro-ondes sont de composition homogène ou de type cœur-coquille, une dernière technique de caractérisation est utilisée : les mesures magnétiques à basse température.

3. Détermination d'un système homogène ou cœur@coquille par des mesures magnétiques

Pour une oxydation homogène des nanoparticules, une composition de type $Fe_{3-\delta}O_4$ est obtenue. Pour une oxydation de magnétite en maghémite uniquement en surface des nanoparticules, un système cœur-coquille $Fe_3O_4@Fe_2O_3$ est formé.

La formation d'un système cœur-coquille entraîne une déstabilisation de l'ordre ferrimagnétique des spins de surface permettant de le distinguer par des mesures magnétiques. A très basse température, le gel de ce désordre de spin peut en effet engendrer un phénomène de spin-glass (voir paragraphe 2.2.1.2 du chapitre 1). Pour des systèmes présentant un magnétisme assimilé à du ferrimagnétisme à 5K, la couche oxydée aura un comportement plutôt antiferromagnétique [14]. Lors du refroidissement des échantillons à 5K, si un champ magnétique intense (de l'ordre de 4 Tesla ou plus) est appliqué, les spins du cœur non oxydé (Fe_3O_4) vont s'orienter dans le sens de ce champ et non les spins de la coquille oxydée (Fe_2O_3) entraînant un décalage du cycle d'hystérèse vers les champs négatifs. Ce décalage est appelé champ d'échange et est noté H_e [15].

Ces mesures ont été appliquées à nos échantillons, et notamment à SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 et SPIONs_CA3, afin de vérifier si nos nanoparticules sont de composition homogène ou des systèmes cœur-coquille (Figure 4. 9). Pour nos trois échantillons, aucun décalage de l'hystérèse n'est observé avec ou sans application d'un champ magnétique lors du refroidissement. Les nanoparticules synthétisées par voie micro-ondes sont donc des nanoparticules homogènes de magnétite sous stœchiométrique. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence du ligand dès la précipitation des ions ferriques et ferreux en solution aqueuse : les ions citrates permettent ainsi de contrôler la taille des nanoparticules et de limiter fortement l'oxydation de la surface.

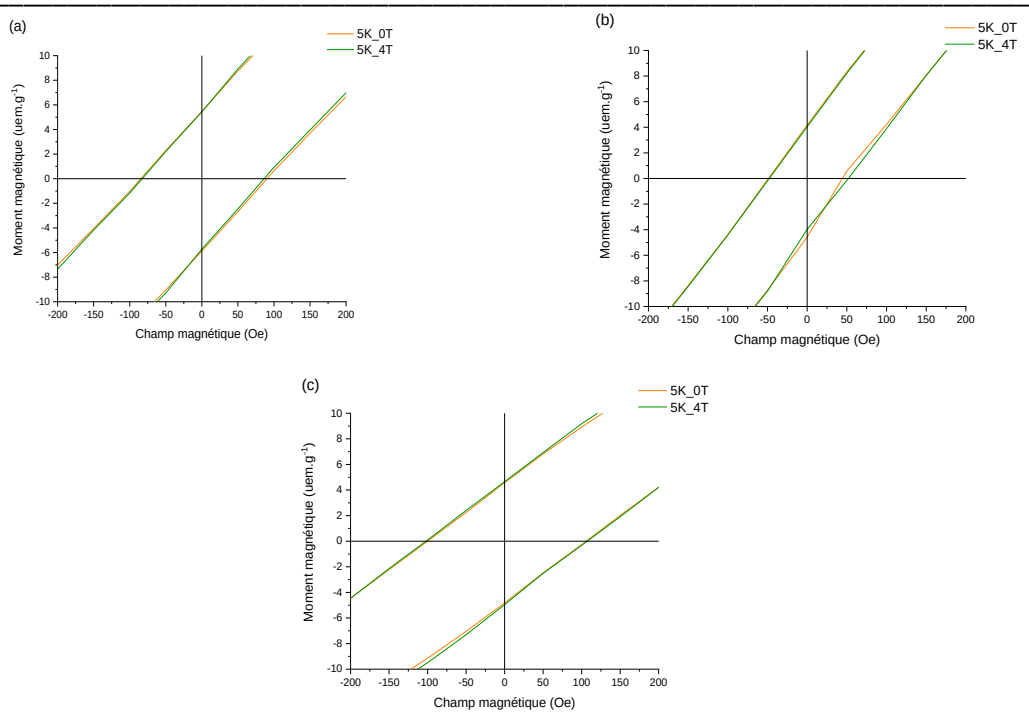


Figure 4. 9 : Courbes M(H) à 5K sans application du champ magnétique lors du refroidissement (courbe rouge) et avec un champ magnétique de 4T lors du refroidissement (vert) de SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (b) et SPIONs_CA3 (c).

4. Conclusion générale du Chapitre 4

Le but de ce chapitre était de comprendre la relation entre la nanostructure, la composition et les propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par voie micro-ondes. En effet, pour une application future dans le domaine biomédical, un contrôle précis de la composition et de la nanostructure est important.

Le premier but est donc de déterminer le pourcentage exact de magnétite dans nos échantillons synthétisés. Une étude par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge a été menée mais ces deux techniques ne permettent pas de connaître la proportion exacte des différents oxydes de fer dans nos nanoparticules. Une étude par microscopie électronique à haute résolution a été également réalisée pour connaître le paramètre de maille exact de nos échantillons. En effet, selon l'état d'oxydation des nanoparticules d'oxyde de fer, le paramètre de maille varie de 8,395 Å (paramètre de maille de la magnétite) à 8,354 Å (paramètre de maille de al maghémite). Cependant, même si cette technique est d'une grande précision, la mesure du paramètre de maille ne l'est pas autant. Il faut donc utiliser une technique de caractérisation permettant d'évaluer avec précision la quantité de magnétite. Pour cela, la spectroscopie Mössbauer est la technique la plus appropriée.

En effet, cette technique de spectroscopie a l'avantage d'être sensible au degré d'oxydation des atomes de fer présents dans les échantillons ainsi qu'à leur environnement chimique, cristallographique et magnétique. Les mesures ont d'abord été réalisées à 300K. A cette température, les nanoparticules d'oxyde de fer sont dans un état de superparamagnétisme dû à leur diamètre. A cause de cet état magnétique, un doublet est présent sur les spectres Mössbauer et ne permet pas une détermination exacte de la quantité de magnétite. Pour faire abstraction de ce superparamagnétisme, les mesures sont réalisées à 4K. Pour nos échantillons, les spectres Mössbauer présentent un sextuplet avec des contributions d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+}. La composition de nos échantillons est comprise entre 54% et 65% de magnétite. Néanmoins, la longueur des mesures limite le nombre d'échantillons caractérisés. Pour pallier à cela, la spectroscopie Raman peut être utilisée. En effet, un décalage de leurs bandes de vibration, notamment la bande la plus intense (A_{1g}), est caractéristique de la magnétite et de la maghémite. La proportion de magnétite peut être déterminée par déconvolution des spectres. Pour nos échantillons, la quantité de magnétite est du même ordre de grandeur que celle calculée avec la spectroscopie Mössbauer : la spectroscopie Raman, dont les mesures sont plus rapides à mettre en œuvre, permet donc d'estimer la quantité de magnétite sur un grand nombre d'échantillons.

Des mesures magnétiques à très basse température (5K) ont été réalisées afin de déterminer si nous sommes en présence d'un système de type homogène ou cœur-coquille. En effet, si le système est un système de type cœur-coquille, un désordre des spins magnétiques va apparaître et générer un décalage de l'hystérèse vers les champs magnétiques négatifs. Dans notre cas, aucun décalage n'est visible avec ou sans l'application d'un champ magnétique lors du refroidissement : nos nanoparticules synthétisées sont donc de composition homogène.

5. Bibliographie Chapitre 4

[1] Chikazumi, S.; Chikazumi, S.; Graham, C.D. *Physics of Ferromagnetism*; Oxford University Press, **1997**.

[2] Venturini, P. Synthèse et caractérisation de nanomatériaux hybrides innovants pour le biomédical, Université de Lorraine, **2017**.

[3] Teja, A.S.; Koh, P.-Y. Synthesis, Properties, and Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, **2009**, *55*, 22–45.

[4] Cornell, R.M.; Schwertmann, U. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*; 2ème édition.; **2006**.

[5] Kim, W.; Suh, C.-Y.; Cho, S.-W.; Roh, K.-M.; Kwon, H.; Song, K.; Shon, I.-J. A New Method for the Identification and Quantification of Magnetite–Maghemite Mixture Using Conventional X-Ray Diffraction Technique. *Talanta*, **2012**, *94*, 348–352.

[6] Schwaminger, S.; Syhr, C.; Berensmeier, S. Controlled Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Magnetite or Maghemite? *Crystals*, **2020**, *10*, 214.

[7] Daou, T.J.; Grenèche, J.M.; Pourroy, G.; Buathong, S.; Derory, A.; Ulhaq-Bouillet, C.; Donnio, B.; Guillon, D.; Begin-Colin, S. Coupling Agent Effect on Magnetic Properties of Functionalized Magnetite-Based Nanoparticles. *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 5869–5875.

[8] Hah, H.; Gray, S.; Johnson, C.; Johnson, J.; Kolesnichenko, V.; Kucheryavy, P.; Goloverda, G. Mössbauer Spectroscopy of Superparamagnetic Fe3O4 Nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2021**, *539*, 168382.

[9] Tronc, E.; Ezzir, A.; Cherkaoui, R.; Chanéac, C.; Noguès, M.; Kachkachi, H.; Fiorani, D.; Testa, A.; Greneche, J.; Jolivet, J. Surface-Related Properties of γ-Fe2O3 Nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2000**, *221*, 63–79.

[10] Thakur, M.; De, K.; Giri, S.; Si, S.; Kotal, A.; Mandal, T. Interparticle Interaction and Size Effect in Polymer Coated Magnetite Nanoparticles. *Journal of Physics: Condensed Matter*, **2006**, *18*, 9093.

[11] Hanesch, M. Raman Spectroscopy of Iron Oxides and (Oxy)Hydroxides at Low Laser Power and Possible Applications in Environmental Magnetic Studies. *Geophysical Journal International*, **2009**, *177*, 941–948.

[12] Testa-Anta, M.; Ramos-Docampo, M.A.; Comesaña-Hermo, M.; Rivas-Murias, B.; Salgueiriño, V. Raman Spectroscopy to Unravel the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanocrystals for Bio-Related Applications. *Nanoscale Advances*, **2019**, *1*, 2086–2103.

[13] Santoyo Salazar, J.; Perez, L.; De Abril, O.; Truong Phuoc, L.; Ihiawakrim, D.; Vazquez, M.; Greneche, J.-M.; Begin-Colin, S.; Pourroy, G. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in 10− 40 Nm Range: Composition in Terms of Magnetite/Maghemite Ratio and Effect on the Magnetic Properties. *Chemistry of materials*, **2011**, *23*, 1379–1386.

[14] Mumtaz, A.; Maaz, K.; Janjua, B.; Hasanain, S.; Bertino, M.F. Exchange Bias and Vertical Shift in CoFe2O4 Nanoparticles. *Journal of magnetism and magnetic materials*, **2007**, *313*, 266–272.

[15] Baaziz, W.; Pichon, B.P.; Fleutot, S.; Liu, Y.; Lefevre, C.; Greneche, J.-M.; Toumi, M.; Mhiri, T.; Begin-Colin, S. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Reproducible Tuning of the Size and Nanosized-Dependent Composition, Defects, and Spin Canting. *J. Phys. Chem. C*, **2014**, *118*, 3795–3810.

Determination of the percentage of magnetite in iron oxide nanoparticles: a comparison between Mossbauer spectroscopy and Raman spectroscopy

Thomas Girardet[1], Sébastien Diliberto[1], Cédric Carteret[2], Franck Cleymand[1], Solenne Fleutot[1]

1: Institut Jean Lamour, CNRS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France
2: Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement, CNRS, Université de Lorraine, F-54500 Vandoeuvre les Nancy

Abstract

Nanomaterials and especially iron oxide nanoparticles become more common for several fields such as data storage or biomedical applications. For these biomedical applications, iron oxide nanoparticles with a superparamagnetic state are the most used as cancer treatment, contrast agent for MRI… To obtain a superparamagnetic state, the iron oxide must be less than 20nm in size. It exists several types of iron oxide with a superparamagnetic behaviour: magnetite (Fe_3O_4) and maghemite (γ-Fe_2O_3). For the biomedical fields, the magnetic behaviour must be maximal, this is why the iron oxide synthesised in a preferential way is magnetite. A microwave process is carried out because this synthesis allows to obtain monodisperse nanoparticles with a narrow size distribution and a good crystallinity. The goal of this study is to determine the amount of magnetite which is not known exactly in samples to a better understanding of relations between structure, composition and magnetic properties. The most precise technique to determine the magnetite proportion is Mössbauer spectroscopy. A study is carried out with this technique and is compared to Raman spectroscopy. In this work, iron oxide nanoparticles synthesised with a microwave process are characterized by Transmission Electronic Microscopy, X-Ray Diffraction, magnetic measurements, Mössbauer spectroscopy and Raman spectroscopy.

Keywords: iron oxide nanoparticles, microwave process, Mössbauer spectroscopy, Raman spectroscopy

Introduction

Since few years, nanoparticles are more and more used in the daily life, especially iron oxide nanoparticles in a lot of fields such as depollution [1], data storage [2] and biomedical applications [3–8]. For these applications, iron oxide nanoparticles must have a particular magnetic state: the superparamagnetic state. A particle in a superparamagnetic state has no magnetization at room temperature without an applied magnetic field. To obtain a superparamagnetic state with iron oxide nanoparticles, the size must be lower than 20 nm. Thanks to the superparamagnetic state, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) are used in medical fields for therapy [5,7] (for example hyperthermia), for diagnostic [3,8] (for example contrast agent for Magnetic Resonance Imaging) or both [4,6]. To synthesise SPIONs, it exists several methods with their advantages and disadvantages. The commonly used are thermal decomposition and coprecipitation [9–14]. With the thermal decomposition, SPIONs obtained are monodisperses, with a narrow size distribution and a good crystallinity [9,10]. However, SPIONs are stable in an organic solvent: another step is mandatory

to redisperse SPIONs in an aqueous solution for biomedical applications [15–17]. The other commonly used synthesis is coprecipitation. This synthesis allows to obtain SPIONs stable in an aqueous solution in a direct way. In addition, the conditions to obtain SPIONs are easy: a mix between two iron salts (iron III and iron II) is realised in presence of a basis [12,13]. To increase the dispersion of SPIONs in an aqueous solution and their stability, a ligand is added to solution. This ligand often used are polymer as PVA Poly Vinyl Alcohol) [18], PEG (Poly Ethylene Glycol) [19], … or small molecules as citric acid [14]. For this study, citric acid has been chosen because the ligand had a preferential attached to the iron oxide core thanks to the carboxylate groups. With this organic layer, the surface oxidation of the inorganic core is limited [20,21] and it is possible to obtain magnetite Fe_3O_4 nanoparticles. This iron oxide has the high magnetization saturation and allows to have the best magnetic conditions for the used in MRI. If magnetite is oxidised, i.e., Fe^{2+} ions presents on the magnetite structure becomes Fe^{3+}, magnetite converts to maghemite γ-Fe_2O_3. Maghemite has the same cubic crystallize structure than magnetite but has some vacancies which decrease the lattice parameter (from 0.8395 nm for the magnetite to 0.8354 nm for the maghemite) [22] and the magnetisation saturation of maghemite is smaller than that of magnetite [23]. For magnetite nanoparticles in an aqueous solution, some oxidation is occurred even if there is an organic layer to protect the inorganic core: iron oxide is sub stoichiometric magnetite $Fe_{3-\delta}O_4$ with δ the deviation from stoichiometry. The goal of this study is to determine the percentage of magnetite in our SPIONs. For that, SPIONs are synthesised by a microwave process and characterised by some techniques as Transmission Electronic Microscopy to determine the size and the shape, X-Ray Diffraction to justify the crystal structure, Mössbauer spectroscopy and Raman spectroscopy to determine the quantity of magnetite.

Materials and methods

Materials

Ferrous chloride ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) and ferric chloride ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) were purchased from Alfa Aesar. Citric acid ($C_6H_8O_7$) and ammonium hydroxide solution (NH_4OH) were purchased from Sigma Aldrich. In all experiment, ultrapure water (resistivity = 18.2 MΩ·cm) was used.

Synthesis

A mixture of ferrous chloride ($FeCl_2.4H_2O$; 5.03 mmol) and ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$; 3.70 mmol) are solubilized in 15 mL of ultra-pure water in a Pirex reactor for microwave synthesis. Then, citric acid ($C_6H_8O_7$; 3.16 mmol) is added to the solution and solubilized. Before the microwave heating, 5 mL of ammonium hydroxide is added to precipitate the solution. The reactor is placed on a single mode microwave operates at a frequency of 2.45 GHz (Monowave 400 from Anton Paar). For this study, three different syntheses are studied: one synthesis is heated to 96°C for 40 minutes (called SPIONs_CA1), another is heated to 100°C during 35 minutes (called SPIONs_CA2) and the last is heated to 110°C during 40 minutes. The temperature is controlled by an external infrared sensor.

After the heating, the solution is collected and washing by centrifugation. The first is a centrifugation with absolute ethanol at 10 000 rpm during 5min. Then, another step by centrifugation at 10 000 rpm during 5 min is realised with a mixture between absolute ethanol and ultra-pure water. Finally, a part of the SPIONs is collected are redispersed in ultrapure water for TEM analysis. The other part is evaporated at 60°C to obtain a powder for XRD, Mössbauer and Raman analysis.

Characterizations

Transmission Electronic Microscopy

Transmission Electronic Microscopy (TEM) is used to analyse the shape, the size and the dispersion of nanoparticles on the solvent. TEM is a CM200-FEI operating at 200 kV with a point resolution of 0.27 nm. The size distribution is calculated using free software ImageJ.

X-Ray Diffraction

X-Ray Diffraction (XRD) patterns were recorded in standard conditions with an INEL CPS120 equipped with a monochromatic cobalt radiation (Co Kα = 0.178886 nm) at grazing angle of incidence simultaneously on 120°.

Magnetic characterizations

A Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) with a Vibrating Sample Magnetometer (VSM) head is carried out to determine the magnetic properties of the different samples (magnetization saturation M_S and blocking temperature T_B). The magnetic field applied for these measurements sweeps from +5 T (1 T = 10 000 Oe) to -5 T and then from -5 T to +5 T. Thanks to these measurements, the magnetic state and the value of M_S can be determined.

For T_B, a Zero Field Cooled – Field Cooled (ZFC-FC) curve is carried out. The sample is cooled from ambient temperature to 5K without magnetic field. Then, at 5K, a magnetic field of 0.02 T is applied and the temperature heats to 300K: the magnetic moment is recorded to give the ZFC curve. Finally, the sample is cooled down from 300K to 5K with the same magnetic field: the magnetic moment is recorded too to give the FC curve?

Mössbauer spectroscopy

^{57}Fe Mössbauer spectra are obtained at 300K and at 4K in a transmission geometry and constant acceleration mode. The velocity scale was calibrated with a ^{57}CoRh source and a metallic iron foil. The evaluation of the Mössbauer spectra was performed by the least-square fitting of lines using the Winnormos (Wissel) program.

Raman spectroscopy

Raman spectra were recorded on a Renishaw inVia Quontor microspectrometer equipped with a confocal microscope and an Olympus X50 objective. A 532 nm exciting radiation with a power of laser below 1 mW was used. Multiple spectra were recorded in several locations to prove the uniformity of each sample.

Results and discussions

Figure 1 shows the TEM micrographs of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 (respectively figure 1.a, 1.c and 1.e). For all samples, nanoparticles are isolated, without or with slight aggregation. Thanks to the free software ImageJ, the size distribution can be obtained. For the three samples, the size distribution (figure 1.b, 1.d and 1.f) is narrower compared to a size distribution of a classical coprecipitation. The mean diameter is equal to 2.52 ± 0.78 nm for SPIONs_CA1, 3.20 ± 0.87 nm for SPIONs_CA2 and 3.48 ± 1.02 nm for SPIONs_CA3. The microwave synthesis allows to control the diameter of iron oxide nanoparticles and to obtain monodisperses SPIONs samples.

To determine the crystal structure and confirm the presence of magnetite or maghemite, XRD patterns are carried out (figure 2). For the three samples, the mean peaks of magnetite are present. However, magnetite and maghemite crystallize in the same cubic structure (inverse spinel with the space group $\mathrm{F_{d\bar{3}m}}$): the mean peaks of magnetite are similar to the mean peaks of maghemite. One difference between a magnetite pattern and a maghemite pattern is the position of these peaks. Indeed, the lattice parameter of magnetite is higher to the lattice parameter of maghemite (8.395 Å for magnetite and 8.354 Å for maghemite): there is therefore a shift of the maghemite pattern towards the high angles compared to a magnetite pattern. Due to the size of SPIONs, the diffraction peaks are large and does not allow to determine the exact composition of our samples. The lattice parameter of each sample is equal to 0.8384 nm, 0.8388 nm and 0.8370 nm for SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 respectively: these different lattice parameters are between this of magnetite and this of maghemite. XRD patterns confirm that our samples are sub stoichiometric magnetite $Fe_{3-\delta}O_4$.

Another information obtained with XRD patterns is the crystallite size. Indeed, thanks to the Debye-Scherrer formula, the size of the crystallite can be calculated. For nanoparticles with a small size like our sample, only one single domain composed the nanoparticle: the crystallite can be assimilated to one nanoparticle. To calculate this crystallite size, the mean peak (311) of pattern is used. The crystallite size is equal to 3.5 nm for SPIONs_CA1, 3.8 nm for SPIONs_CA2 and 4.1 nm for SPIONs_CA3: these different crystallite sizes are similar to the diameter obtained by TEM measurements.

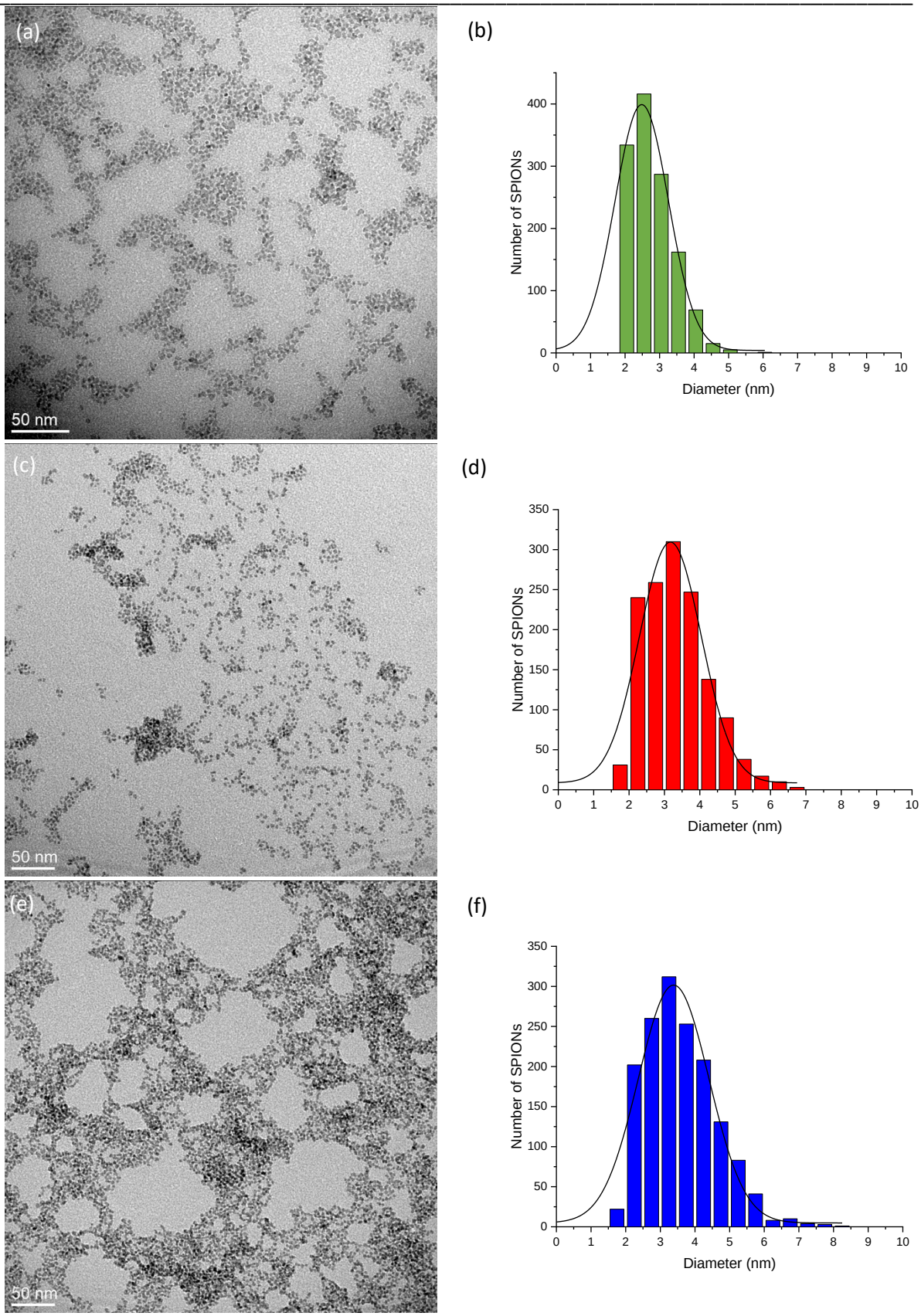


Figure 1: TEM images of SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (c) and SPIONs_CA3 (e) with their size distribution respectively in (b), (d) en (f).

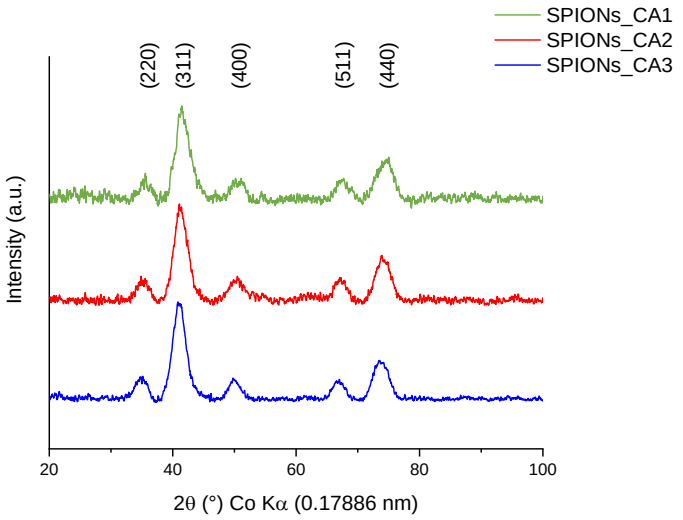


Figure 2: XRD patterns of SPIONs_CA1 (green), SPIONs_CA2 (red) and SPIONs_CA3 (blue) with a cobalt radiation (0.17886 nm).

To determine the magnetic state, several magnetic characterizations are carried out. The first characterization is to determine the magnetization saturation M_S. Figure S1 shows the magnetic cycle of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 at 300K. For the three samples, no hysteresis is present confirming thus the presence of the superparamagnetic state. The value of each M_S is equal to 55 emu.g^{-1} for SPION_CA1, 53 emu.g^{-1} for SPIONs_CA2 and 59 emu.g^{-1} for SPIONs_CA3: these different values are in the same order than to the M_S of SPIONs with the same diameter [8,24]. To check the transition between the superparamagnetic state to a blocked state, another magnetic cycle is carried out at 5K (Figure S2). At this temperature, a hysteresis is present for each sample and SPIONs are so in a blocked state at low temperature. As the magnetic moment is blocked, the M_S values at 5K are higher than to the values at 300K. The different M_S are equal to 78 emu.g^{-1}, 78 emu.g^{-1} and 75 emu.g^{-1} for SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 respectively. To determine the transition temperature between the superparamagnetic state and the blocked state, called T_B, a ZFC-FC measurement is carried out (Zero Field Cooled/Field Cooled). Figure S3 shows the different ZFC-FC curves of the samples. To determine the value of T_B, the maximum of the ZFC curve is taken (the curve from 5K to 300K). The maximum of each curve is equal to 14K, 15K and 46K for SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 respectively: these temperatures confirm the superparamagnetic state at room temperature.

To determine the percentage of magnetite in a sub stoichiometric magnetite, Mössbauer spectroscopy is carried out. The first measurements are recorded at room temperature (figure 3). For the three samples, a doublet is present and corresponding to the superparamagnetic state [25–27]. Indeed, at 300K, due to the Neel relaxation and the Brownian motion, it is difficult to obtain resolved magnetic hyperfine splitting [28]. Thanks to the presence of the superparamagnetic doublet, the isomer shift (IS) and the electrical nuclear quadrupole moment (EQ) can be calculated and are summarize for the three samples on table 1.

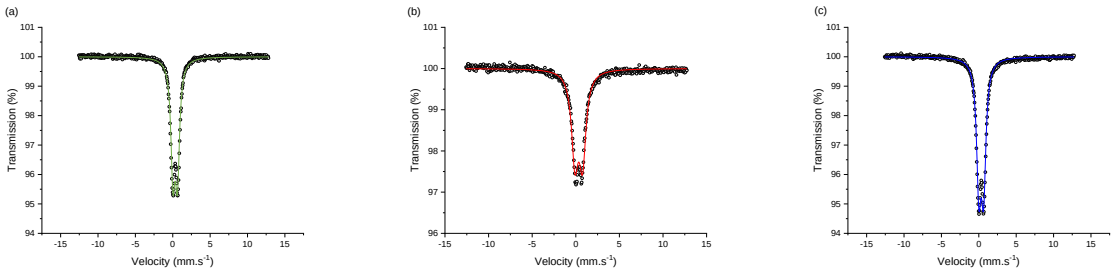


Figure 3: Mössbauer spectra of SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (b) and SPIONs_CA3 (c) at 300K.

Table 1: Hyperfine parameters of Mössbauer spectra recorded at 300K.

Sample	Nature	IS ($mm.s^{-1}$)	EQ ($mm.s^{-1}$)	B (T)	Area (%)
SPIONs_CA1	Doublet	0.3335	0.5961	-	100
SPIONs_CA2	Doublet	0.3404	0.8706	-	100
SPIONs_CA3	Doublet	0.3296	0.6293	-	100

At 4K, below to the blocking temperature T_B, the contribution of divalent and trivalent iron can be identified, separated and quantified: there are more information on Mössbauer spectra at this temperature (figure 4). Indeed, the magnetic state is in a blocked state at this temperature and did not attenuate the chemical and crystal environment of each iron ions. Thanks to the absence of the superparamagnetic state, the determination of the quantity of magnetite can be operate. As magnetite crystallises in an inverse spinel structure, divalent iron are present in octahedral sites and trivalent iron are present in octahedral and tetrahedral sites: the crystallographic formula of magnetite is $(Fe^{3+})_A[Fe^{2+}Fe^{3+}]_B(O^{2-})_4$ with A the tetrahedral sites and B the octahedral sites. In addition, at this temperature, the behaviour of trivalent iron in octahedral and tetrahedral sites are similar (green line on figure 4). However, for SPIONs_CA1 and SPIONs_CA2, a superparamagnetic contribution is always present (black curve on figure 4): this contribution is due to the presence of SPIONs with a very small size (below to 2 nm). Indeed, the blocking temperature is depending to the diameter of the inorganic core: the smaller of size, the lower of T_B.

The percentage of magnetite can be calculated with the different contributions of each iron ions: it is equal to 64% for SPIONs_CA1, 65% for SPIONs_CA2 and 54% for SPIONs_CA3. The different Mössbauer parameters are summarised on table 2.

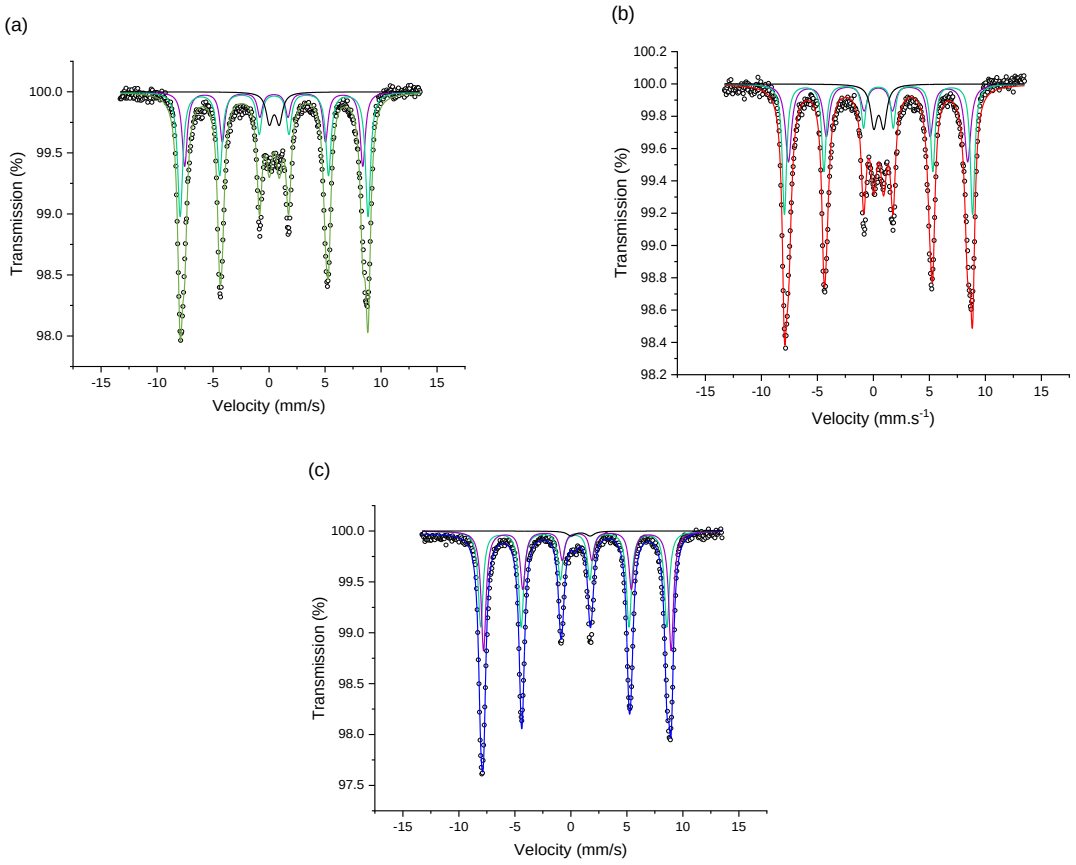


Figure 4: Mössbauer spectra of SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (b) and SPIONs_CA3 (c) recorded at 4K.

Table 2: Hyperfine parameters of Mössbauer spectra recorded at 4K.

Sample	Nature	IS (mm.s^{-1})	EQ (mm.s^{-1})	B (T)	Area (%)
SPIONs_CA1	Sextet	0.42	0.00	49.3	33
	Sextet	0.45	0.00	52.0	56
	Doublet	0.47	0.88	-	11
SPIONs_CA2	Sextet	0.43	0.00	49.6	47
	Sextet	0.45	0.00	52.0	40
	Doublet	0.48	0.88	-	13
SPIONs_CA3	Sextet	0.32	0.11	51.6	53
	Sextet	0.57	0.02	52.0	45
	Doublet	-0.17	1.10	-	2

With Mössbauer spectroscopy, the determination of the quantity of magnetite is precise. However, the time of a measurement is long. An alternative to obtain the percentage of magnetite in a sample of iron oxide nanoparticle is Raman spectroscopy. Indeed, the vibrational bands of magnetite are different to the vibrational bands of maghemite because γ-Fe_2O_3 has some vacancies in its crystal structure. Magnetite has three vibrational bands at 310 cm^{-1} (E_g), 540 cm^{-1} (T_{2g}) and the more intense

at 670 cm^{-1} (A_{1g}) [29,30]. For the maghemite, the different bands are present at 350 cm^{-1} (T_1), 512 cm^{-1} (E), 665 cm^{-1} and the strongest at 730 cm^{-1} (A_1) [29,30]. For our samples, the Raman spectra are shown on figure 5 with a comparison of a commercial magnetite. For the three samples, the presence of the three more and less intense bands confirm the presence of magnetite. For each SPIONs, the A_{1g} band is larger compared to the magnetite A_{1g} band: this increase in bandwidth corresponds to an oxidation of divalent iron to trivalent iron in octahedral sites. Thus, thanks to this spilt of the A_{1g} band, a quantification of magnetite in our samples can be operated.

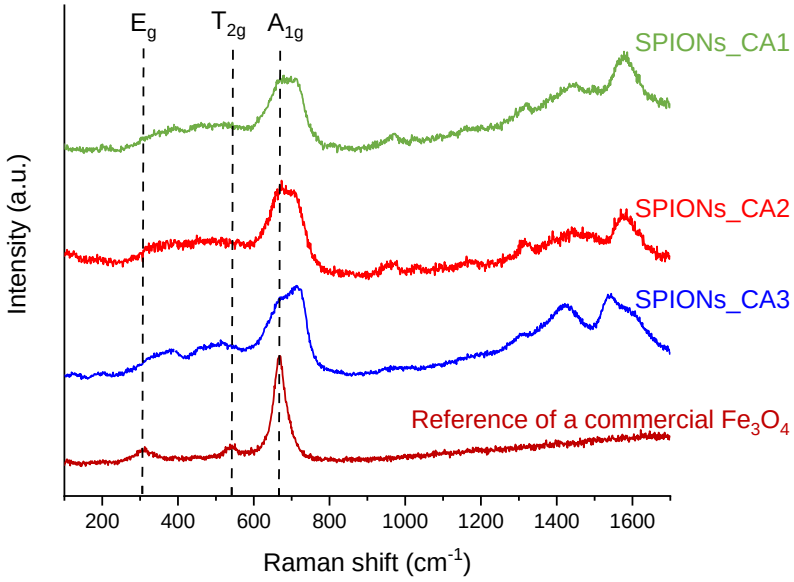


Figure 5: Raman spectra of SPIONs_CA1 (green), SPIONs_CA2 (red) and SPIONs_CA3 (blue) compared to a Raman spectrum of a magnetite reference with a laser at 532 nm.

Figure 6 shows the deconvolution of the A_{1g} band for SPIONs_CA1 (figure 6.a), SPIONs_CA2 (figure 6.b) and SPIONs_CA3 (figure 6.c). For the three samples, the band of magnetite at 670 cm^{-1} is more intense than the band of maghemite at 720 cm^{-1}: the percentage of magnetite is higher to the percentage of maghemite. To determine this value, a ratio between the area under the fit curves is realized: the percentage of magnetite is equal to 60% for SPIONs_CA1, 63% for SPIONs_CA2 and 49% for SPIONs_CA3. These values are lower than those obtained with the Mössbauer spectroscopy. This difference is due to the power of the laser. Indeed, in Raman spectroscopy, a laser (at 532 nm in our case) is used to excite the chemical bonds. But a local heating is generated with this laser and can transform magnetite to maghemite. This transformation is minimal and an estimation of the quantity of magnetite in iron oxide nanoparticles can be made with Raman spectroscopy.

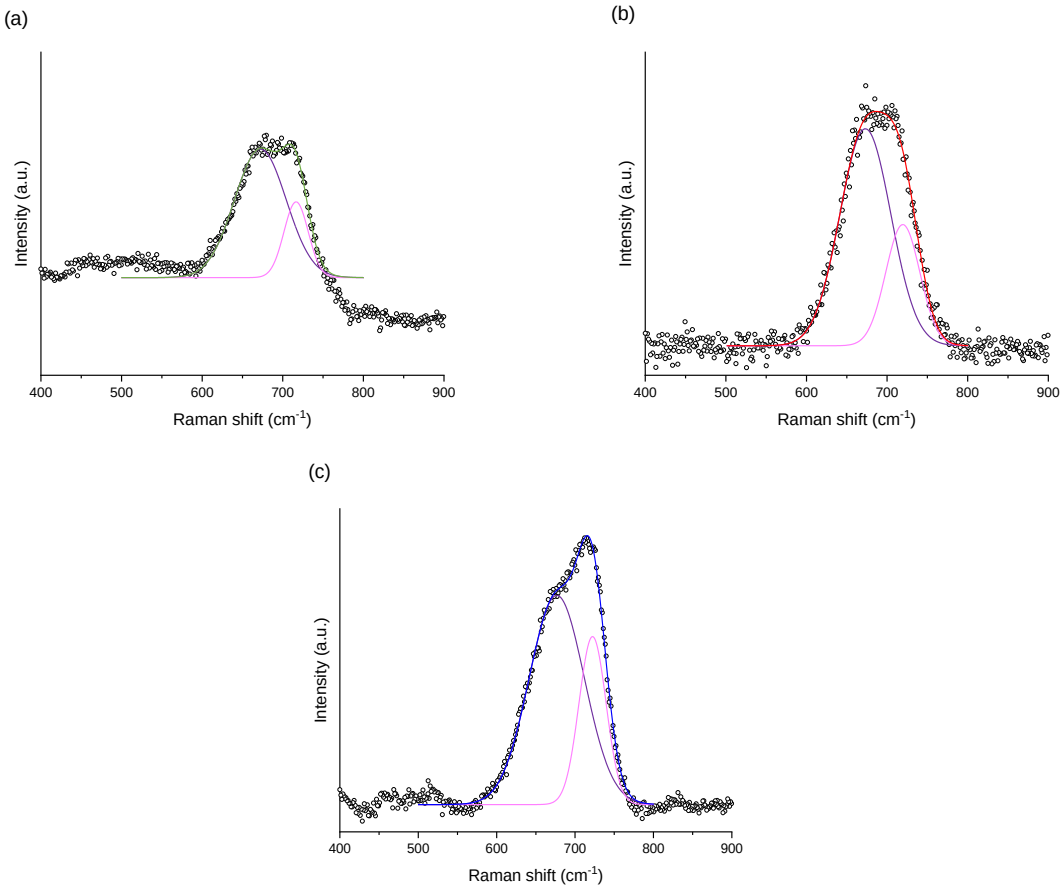


Figure 6: Deconvolution of the A_{1g} band of the different samples SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (b) and SPIONs_CA3 (c). In purple the band of magnetite at 670 cm^{-1} and in magenta the band of maghemite at 720 cm^{-1}.

Conclusion

They are more and more syntheses of iron oxide nanoparticles for several fields. The different iron oxide nanoparticle synthesised are essentially magnetite (Fe_3O_4) or maghemite (γ-Fe_2O_3). However, the difference between these two iron oxide is difficult. The goal of this study is to determine in a sample the part of magnetite. Thanks to a microwave process, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are synthesised. In this work, three samples are realised called SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3. Several characterizations are carried out as Transmission Electronic Microscopy to determine the size and the shape, as X-Ray Diffraction to determine the crystallographic structure and as magnetic characterizations to know about the magnetic state at different temperatures. For the different synthesised SPIONs, the diameter is 2.52 ± 0.78 nm, 3.20 ± 0.87 nm and 3.48 ± 1.02 nm, they are the same crystallographic structure (an inverse spinel similar to the magnetite and the maghemite) and have superparamagnetic properties at ambient temperature. These different characteristics don't allow to determine the percentage of magnetite. To overcome that, two techniques allow to quantify the part of magnetite: Mössbauer spectroscopy and Raman spectroscopy. The first is the most used for iron oxide nanoparticles to determine the amount of ferrous ions and ferric ions. Indeed, the magnetic, chemical and crystallographic environment of the different ions in magnetite are different and allow to determine the quantity of divalent and trivalent

iron. For our samples, the quantity of magnetite is equal to 64% for SPIONs_CA1, 65% for SPIONs_CA2 and 54% for SPIONs_CA3. The amount of magnetite is so determined with extreme precision. But, Mössbauer measurements take a long time to acquire. Thanks to the Raman spectroscopy, these amount of Fe_3O_4 can be determined more quickly. Indeed, magnetite and maghemite have different vibrational bands at different Raman shift and the intensity of these bands are proportional to the quantity. With the A_1 mode of magnetite and maghemite at respectively 670 cm^{-1} and 720 cm^{-1}, the proportion of magnetite and maghemite is calculated. The amount of magnetite is equal to 60% for SPIONs_CA1, 63% for SPIONs_CA2 and 49% for SPIONs_CA3: these values are close to those obtained in Mössbauer spectroscopy. The difference is probably due to the local heating generated by the laser during the Raman measurements which can transform magnetite in maghemite.

In conclusion, a determination of the part of magnetite in an iron oxide nanoparticles sample can be realised with the Raman spectroscopy. However, the percentage of magnetite is not the exact value in the sample: Raman spectroscopy can so give an idea of the amount of magnetite for a screening of a lot of samples and Mössbauer spectroscopy can determine the precise quantity of magnetite. For the next, XPS measurements can be carried out to confirm the percentage of magnetite and a relationship between the percentage of magnetite and the stoichiometric deviation δ in $Fe_{3-\delta}O_4$.

Reference

1. K.Q. Jabbar, A.A. Barzinjy, S.M. Hamad, *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 17 (2022) 100661.
2. J. Peng, W. Zhang, L. Chen, T. Wu, M. Zheng, H. Dong, H. Hu, Y. Xiao, Y. Liu, Y. Liang, *Chemical Engineering Journal*, 404 (2021) 126461.
3. H. Yang, H. Wang, C. Wen, S. Bai, P. Wei, B. Xu, Y. Xu, C. Liang, Y. Zhang, G. Zhang, *Journal of Nanobiotechnology*, 20 (2022) 1–18.
4. A. Amraee, S. Khoei, M. Bahreyni-Toossi, H. Azimian, F. Ansari, F. Fallahi, N. Robatmili, S. Teshnizi, L. Darvish, *Clinical and Translational Imaging* (2022) 1–9.
5. Y. Luengo, Z.V. Díaz-Riascos, D. García-Soriano, F.J. Teran, E.J. Artés-Ibáñez, O. Ibarrola, Á. Somoza, R. Miranda, S. Schwartz, I. Abasolo, *Pharmaceutics*, 14 (2022) 1526.
6. A. Kader, J.O. Kaufmann, D.B. Mangarova, J. Moeckel, J. Brangsch, L.C. Adams, J. Zhao, C. Reimann, J. Saatz, H. Traub, *Cancers*, 14 (2022) 2909.
7. C. Pucci, A. Degl'Innocenti, M.B. Gümüş, G. Ciofani, *Biomaterials Science*, 10 (2022) 2103–2121.
8. C. Chen, J. Ge, Y. Gao, L. Chen, J. Cui, J. Zeng, M. Gao, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 14 (2022).
9. Q. Wang, X. Ma, H. Liao, Z. Liang, F. Li, J. Tian, D. Ling, *ACS Nano*, 14 (2020) 2053–2062.
10. C. Xu, S. Sun, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2013) 732–743.
11. S.M. Dadfar, K. Roemhild, N.I. Drude, S. von Stillfried, R. Knüchel, F. Kiessling, T. Lammers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138 (2019) 302–325.
12. S. Slimani, C. Meneghini, M. Abdolrahimi, A. Talone, J.P.M. Murillo, G. Barucca, N. Yaacoub, P. Imperatori, E. Illés, M. Smari, *Applied Sciences*, 11 (2021) 5433.
13. J. Khanam, M. Ahmed, S. Zaman, N. Sharmin, S. Ahmed, *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 57 (2022) 67–76.
14. M.S. Yusuf, R. Rahmasari, *Biomedical and Pharmacology Journal*, 14 (2021) 1533–1543.
15. N. Zhu, H. Ji, P. Yu, J. Niu, M. Farooq, M.W. Akram, I. Udego, H. Li, X. Niu, *Nanomaterials*, 8 (2018) 810.
16. F. Crippa, L. Rodriguez-Lorenzo, X. Hua, B. Goris, S. Bals, J.S. Garitaonandia, S. Balog, D. Burnand, A.M. Hirt, L. Haeni, M. Lattuada, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2 (2019) 4462–4470.

17. O. Bixner, A. Lassenberger, D. Baurecht, E. Reimhult, *Langmuir*, 31 (2015) 9198–9204.
18. A. Badawi, S.S. Alharthi, M.G. Althobaiti, A.N. Alharbi, *Journal of Vinyl and Additive Technology*, 28 (2022) 235–246.
19. A. Khodadadi, M.R. Talebtash, M. Farahmandjou, *Physical Chemistry Research*, 10 (2022) 537–547.
20. D.K. Kim, M. Mikhaylova, Y. Zhang, M. Muhammed, *Chemistry of Materials*, 15 (2003) 1617–1627.
21. W. Wu, Q. He, C. Jiang, *Nanoscale Research Letters*, 3 (2008) 397–415.
22. M.P. Morales, C. Pecharroman, T. Gonzalez Carreño, C.J. Serna, *Journal of Solid State Chemistry* (1994) 158–163.
23. M.P. Morales, M. Andres-Vergés, M. Veintemillas-Verdaguer, M.I. Montero, C.J. Serna, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* (1999) 146–148.
24. M. Basini, T. Orlando, P. Arosio, M.F. Casula, D. Espa, S. Murgia, C. Sangregorio, C. Innocenti, A. Lascialfari, *The Journal of Chemical Physics*, 146 (2017) 034703.
25. C.E. Johnson, J.A. Johnson, H.Y. Hah, M. Cole, S. Gray, V. Kolesnichenko, P. Kucheryavy, G. Goloverda, *Hyperfine Interact*, 237 (2016) 27.
26. R. Gabbasov, M. Polikarpov, V. Cherepanov, M. Chuev, I. Mischenko, A. Lomov, A. Wang, V. Panchenko, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380 (2015) 111–116.
27. S. Sarveena, J.M. Vargas, D.K. Shukla, C.T. Meneses, P. Mendoza Zélis, M. Singh, S.K. Sharma, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18 (2016) 9561–9568.
28. S.P. Schwaminger, D. Bauer, P. Fraga-García, F.E. Wagner, S. Berensmeier, *CrystEngComm*, 19 (2017) 246–255.
29. M. Hanesch, *Geophysical Journal International*, 177 (2009) 941–948.
30. M. Testa-Anta, M.A. Ramos-Docampo, M. Comesaña-Hermo, B. Rivas-Murias, V. Salgueiriño, *Nanoscale Advances*, 1 (2019) 2086–2103.

Supplementary information of

Determination of the percentage of magnetite in iron oxide nanoparticles: a comparison between Mossbauer spectroscopy and Raman spectroscopy.

Thomas Girardet[1], Sébastien Diliberto[1], Cédric Carteret[2], Franck Cleymand[1], Solenne Fleutot[1]

1: Institut Jean Lamour, CNRS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France
2: Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement, CNRS, Université de Lorraine, F-54500 Vandoeuvre les Nancy

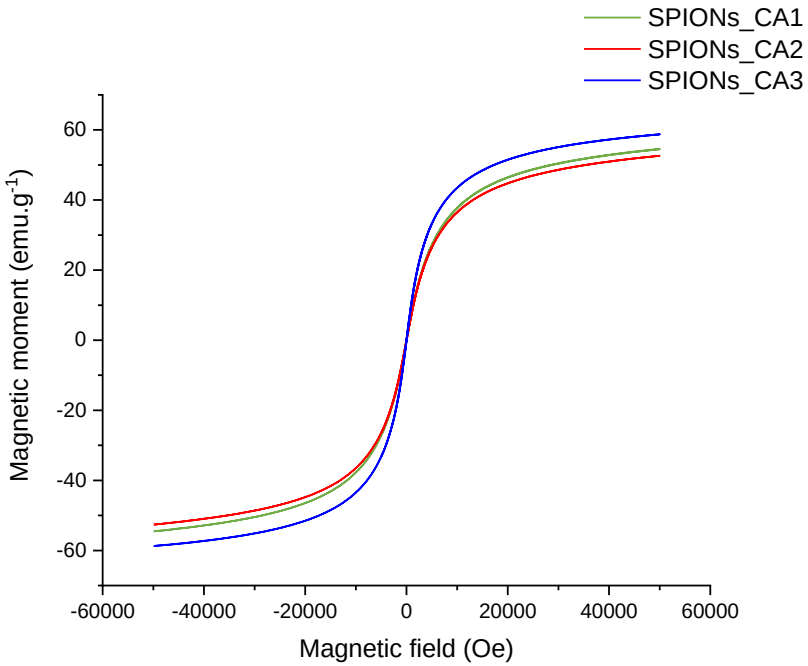


Figure S1: Magnetization as a function of magnetic field at 300K of SPIONs_CA1 (green), SPIONs_CA2 (red) and SPIONs_CA3 (blue) (1 Tesla = 10 000 Oe).

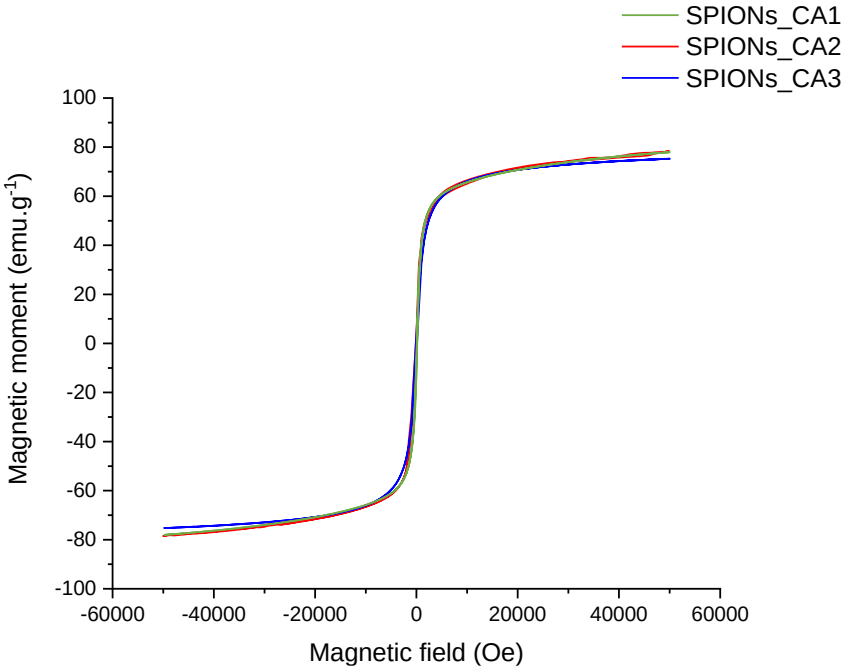


Figure S2: Magnetization as a function of magnetic field at 5K of SPIONs_CA1 (green), SPIONs_CA2 (red) and SPIONs_CA3 (blue) (1 Tesla = 10 000 Oe).

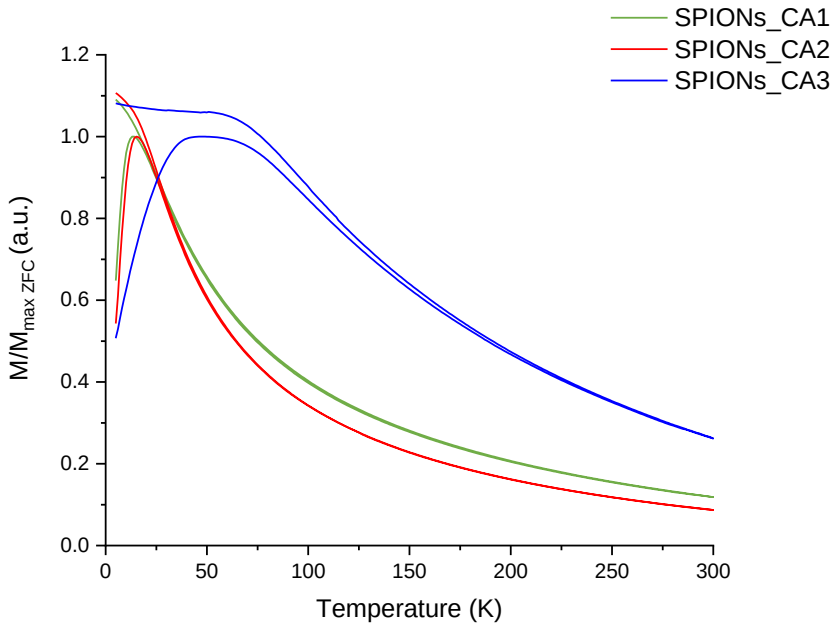


Figure S3: ZFC/FC curves of SPIONs_CA1 (green), SPIONs_CA2 (red) and SPIONs_CA3 (blue).

Chapitre 5

Etude de la stabilité des nanoparticules après stérilisation et en milieu physiologique

Table des matières Chapitre 5

1. La stérilisation des nanoparticules _____ 225

1.1. Le choix de la méthode de stérilisation _____ 225

1.2. Caractérisation des nanoparticules avant et après la stérilisation _____ 226

1.3. Conclusion _____ 226

2. Comportement des nanoparticules dans un sérum physiologique _____ 226

2.1. Etude des liquides biologiques _____ 226

2.2. Comportement des nanoparticules dans du sérum physiologique _____ 227

2.3. Conclusion _____ 227

3. Conclusion générale du chapitre 5 _____ 228

4. Bibliographie Chapitre 5 _____ 229

Les chapitres précédents ont permis la description de l'étude approfondie de la synthèse, par un procédé micro-ondes, et de la caractérisation physico-chimique, structurale et magnétique de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. La synthèse comme les étapes de caractérisation en solution des nanoparticules ont été menées en environnement non stérile et en milieu aqueux (eau ultra-pure). Pour des applications biomédicales, le milieu biologique pourrait influencer les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, les compartiments liquidiens des organismes comportant des molécules telles que des protéines ou des ions susceptibles d'interagir avec leur surface.

L'objectif de ce chapitre est ainsi de s'assurer, avant utilisation éventuelle en tant qu'agent de contraste, de la stabilité des propriétés physico-chimiques des nanoparticules synthétisées (1) après une étape de stérilisation et (2) en milieu physiologique.

1. La stérilisation des nanoparticules

1.1. Le choix de la méthode de stérilisation

Avant toute utilisation en milieu biologique ou médicale, les instruments, dispositifs ou encore médicaments doivent être stérilisés. En effet, une contamination bactérienne ou par tout autre micro-organisme est rigoureusement proscrite. Pour stériliser une solution de nanoparticules, différentes techniques sont envisageables comme la stérilisation par filtration [1], l'irradiation par des UV [2], la stérilisation chimique [3], l'autoclave [4].

La stérilisation chimique a été écartée dès le départ car cette méthode peut dénaturer la couche organique en surface des nanoparticules conduisant à l'obtention de nanoparticules nues (non fonctionnalisées) dont nous avons expliqué les inconvénients dans le chapitre bibliographique. De plus, des produits organiques sont souvent utilisés pour cette technique, induisant de potentiels problèmes toxicologiques [3].

La stérilisation par filtration conduit à la fois à une perte de quantité de matière avec une partie de l'échantillon bloquée dans le filtre et à une agrégation de l'échantillon observée après redispersion en solution [1,5].

La stérilisation par irradiation par des UV est une technique de stérilisation souvent utilisée. Néanmoins, pour nos nanoparticules, cette technique n'a pas été sélectionnée pour éviter toutes réactions possibles de type radicalaire [6].

Le choix de la méthode de stérilisation des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées au micro-ondes s'est porté sur la stérilisation par autoclave. Cette technique consiste à chauffer pendant quelques minutes (en général 30 minutes) les échantillons dans une enceinte fermée à 120°C. Cette température permet de détruire les organismes éventuellement présents dans les solutions de nanoparticules tels que des bactéries, des champignons, …

1.2. Caractérisation des nanoparticules avant et après la stérilisation

Pour s'assurer de la stabilité des propriétés physico-chimiques de nos nanoparticules, une caractérisation physico-chimique et magnétique de celles-ci a été réalisée avant et après la stérilisation par autoclave. Une étude par MET a été réalisée afin de déterminer l'influence de la stérilisation sur la taille et la forme des nanoparticules. Des mesures DLS ont été menées pour évaluer l'évolution du diamètre hydrodynamique moyen. La structure des nanoparticules et leur fonctionnalisation ont été respectivement caractérisées par DRX sur poudre, par IRTF et par ATG. Des mesures magnétiques ont complété cette étude systématique avant et après stérilisation. Les conditions opératoires pour chaque technique pré citée et les résultats issus de ces caractérisations sont décrits dans l'article « Study of the influence of autoclave sterilization on the properties of citrate functionalized iron oxide nanoparticles » reporté dans ce chapitre et publié sous la référence DOI 10.1515/pac-2021-0303

1.3. Conclusion

Les résultats de la première publication associée à ce chapitre démontrent que la méthode de stérilisation par autoclave d'une solution aqueuse de nanoparticules d'oxyde de fer synthétisée par micro-ondes n'influence pas leurs propriétés physico-chimiques et magnétiques. La stérilisation par autoclave, rapide et peu couteuse, constitue donc une bonne technique de stérilisation avant toute utilisation des nanoparticules dans un milieu biologique.

2. Comportement des nanoparticules dans un sérum physiologique

2.1. Etude des liquides biologiques

Les nanoparticules synthétisées pourraient être utilisées en tant qu'agent de contraste lors d'examens d'IRM, c'est-à-dire injectées en solution dans le corps du patient. L'injection, généralement par voie intra-veineuse, introduit les nanoparticules directement dans le système sanguin. Or, ce système contient notamment des protéines dont l'eau ultra-pure, solvant de nos échantillons, est dépourvue. En effet, le plasma sanguin (partie du sang sans les globines) contient 91% d'eau, 7% de protéines (albumine et des globulines) et 2% d'autres éléments comme des électrolytes (Na^+, Cl^-, K^+, …), des nutriments, des déchets, des hormones. Toutes ces molécules possèdent des charges de surface et peuvent interagir avec les nanoparticules injectées. En effet, au moins une fonction carboxylate des citrates fonctionnalisant les nanoparticules ne forme pas de liaison avec l'oxyde de fer, induisant une charge globale négative de la surface des nanoparticules (au niveau de la couche de Stern). Les interactions entre les protéines et/ou les autres molécules comme les électrolytes et les nanoparticules conduisent à l'augmentation drastique du diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules injectées. Cette augmentation du diamètre hydrodynamique moyen peut déstabiliser les nanoparticules en solution par agrégation de celles-ci. L'étude du comportement des nanoparticules dans des solutions biologiques s'avère par conséquent nécessaire.

2.2. Comportement des nanoparticules dans du sérum physiologique

Afin de déterminer la stabilité des nanoparticules dans des solutions biologiques, une étude du comportement des nanoparticules d'oxyde de fer dans du sérum physiologique a été réalisée, le sérum physiologique étant une solution injectable à des patients lors d'examens médicaux. Le sérum physiologique est une solution d'eau ultra-pure contenant 0,9 g de chlorure de sodium (NaCl) pour 100 mL d'eau ultra-pure, c'est-à-dire des électrolytes essentiels pour le vivant.

Pour cette étude, une comparaison a été réalisée entre trois échantillons issus :

- D'une synthèse réalisée dans de l'eau ultra-pure suivie d'une redispersion des nanoparticules après lavage dans de l'eau ultra-pure. L'échantillon est noté NPs_{ww}.
- D'une synthèse réalisée dans de l'eau ultra-pure suivie d'une redispersion des nanoparticules après lavage dans du sérum physiologique. L'échantillon est noté NPs_{wp}.
- D'une synthèse dans du sérum physiologique suivie d'une redispersion des nanoparticules après lavage dans du sérum physiologique. L'échantillon est noté NPs_{pp}.

Les trois échantillons ont été caractérisés par MET et par DLS pour évaluer l'état d'agrégation des nanoparticules par comparaison de la taille déterminée par microscopie au diamètre hydrodynamique moyen obtenu en solution. La structure du cœur inorganique ainsi que la présence ou l'absence du chlorure de sodium provenant du sérum physiologique ont été identifiées par DRX et spectroscopie Raman. Des mesures magnétiques ont été réalisées complétées par une étude de la relaxométrie visant à déterminer l'intérêt des nanoparticules obtenues en tant qu'agent de contraste.

Tous les résultats sont décrits à la fin de ce chapitre, dans la publication « Rapid microwave synthesis of magnetic nanoparticles in physiological serum » référencée sous le DOI 10.1515/pac-2022-0601.

2.3. Conclusion

La synthèse et la redispersion de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques a été réalisée dans de l'eau ultra-pure et dans du sérum physiologique. Pour les trois échantillons considérés (synthèse et redispersion dans de l'eau ultra-pure, synthèse dans l'eau ultra-pure et redispersion dans le sérum physiologique, synthèse et redispersion dans du sérum physiologique), les nanoparticules sont stables dans leur solution, présentent une bonne cristallinité et possèdent un comportement superparamagnétique. Les nanoparticules synthétisées dans de l'eau ultra-pure et redispersées dans du sérum physiologique ont les mêmes propriétés physico-chimiques que celles synthétisées et dispersées dans de l'eau ultra-pure. La caractérisation des nanoparticules synthétisées et dispersées dans du sérum physiologique a démontré la présence d'une matrice de NaCl pouvant générer une légère agrégation des nanoparticules. Enfin, pour les trois échantillons, les nanoparticules synthétisées sont de bonnes candidates pour des applications en tant qu'agents de contraste en IRM. En effet, les différentes relaxivités longitudinales r_2 sont similaires à celles données pour des agents de contraste commerciaux tel que l'Endorem® [7,8].

3. Conclusion générale du chapitre 5

Dans ce chapitre, les étapes préliminaires à toute caractérisation biologique et toute application biomédicale ont été réalisées avec l'objectif de s'assurer de la préservation des propriétés physico-chimiques des nanoparticules après stérilisation et dans un milieu biologique.

Pour une application biomédicale, les solutions de nanoparticules doivent être stérilisées pour éviter une contamination par un micro-organisme (bactéries, champignons, …). Pour ce faire, un traitement de stérilisation par autoclave a été réalisé. La caractérisation des nanoparticules avant et après ce traitement a permis de conclure que la stérilisation par autoclave n'influence pas les propriétés physico-chimiques de celles-ci, à savoir leur taille, leur forme, leur structure et leur stabilité colloïdale.

En vue d 'une utilisation de ces nanoparticules lors d'examens IRM en tant qu'agent de contraste, le comportement de celles-ci dans un milieu biologique a été investigué en considérant la synthèse et la redispersion des échantillons dans de l'eau ultra-pure et dans du sérum physiologique. Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques synthétisées dans de l'eau ultra-pure et redispersées dans une solution de sérum physiologique sont stables, ne présentent pas d'agrégation et possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques que celles synthétisées et redispersées dans de l'eau ultra-pure : les nanoparticules synthétisées peuvent donc être utilisées en tant qu'agent de contraste en IRM.

Avant une possible utilisation dans un organisme vivant, il convient également de s'assurer que les nanoparticules peuvent s'internaliser dans les cellules et ne présentent pas un caractère cytotoxique. Des études d'internalisation cellulaire et d'activité mitochondriale ont été réalisées et sont l'objet du chapitre suivant.

4. Bibliographie Chapitre 5

[1] Konan, Y.N.; Gurny, R.; Alléman, E. Preparation and Characterization of Sterile and Freeze-Dried Sub-200 Nm Nanoparticles. *Internation Journal of Pharmaceutics*, **2002**, 239–252.

[2] Gu, Y.; Xiao, F.; Luo, L.; Zhou, X.; Zhou, X.; Li, J.; Li, Z. Bacterial Disinfection by CuFe2O4 Nanoparticles Enhanced by NH2OH: A Mechanistic Study. *Nanomaterials*, **2019**, *10*, 18.

[3] Sommerfeld, P.; Schroeder, U.; Sabel, B.A. Sterilization of Unloaded Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **1998**, *164*, 113–118.

[4] Dutz, S.; Wojahn, S.; Gräfe, C.; Weidner, A.; Clement, J. Influence of Sterilization and Preservation Procedures on the Integrity of Serum Protein-Coated Magnetic Nanoparticles. *Nanomaterials*, **2017**, *7*, 453.

[5] Venturini, P. Synthèse et caractérisation de nanomatériaux hybrides innovants pour le biomédical, Université de Lorraine, **2017**.

[6] Dimapilis, E.A.S.; Hsu, C.-S.; Mendoza, R.M.O.; Lu, M.-C. Zinc Oxide Nanoparticles for Water Disinfection. *Sustainable Environment Research*, **2018**, *28*, 47–56.

[7] Basly, B. Conception et Caractérisation de Nano-Objets Magnétiques Pour l'imagerie Par Résonnance Magnétique (IRM), Université de Strasbourg, **2010**.

[8] Morfin, J.-F.; Beloeil, J.-C.; Tóth, É. Agents de contraste pour l'IRM. *Technologies biomédicales*, **2014**.

Study of the influence of autoclave sterilization on the properties of citrate functionalized iron oxide nanoparticles.

Thomas Girardet[a]*, Amel Cherraj[a], Astrid Pinzano[b], Christel Henrionnet[b], Franck Cleymand[a] and Solenne Fleutot[a]

[a] *Institut Jean Lamour, Université de Lorraine, CNRS, F-54000 Nancy, France*
[b] *IMoPA, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France*
** Corresponding author: thomas.girardet@univ-lorraine.fr*

Abstract

Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) are widely used in various areas of the biomedical field: for diagnosis (Magnetic Resonance Imaging), for therapeutic applications (hyperthermia, nanovectorization). These applications require a good stability in water and no aggregation of SPIONs, with well-controlled physicochemical and magnetic properties. In this work, SPIONs functionalized by citrate ligands are synthesized in a one-step process with the aim of producing stable water-dispersible nanoparticles with a well-crystallized spinel structure. Microwave technology is implemented to achieve this objective given the ease, speed and reproducibility of the method. For their future use in biomedical applications, the sterilization of these SPIONs is essential by an autoclave treatment. The influence of this treatment on the physicochemical and magnetic properties of the SPIONs is determined by a systematic characterization before and after sterilization by Transmission Electronic Microscopy, Dynamic Light Scattering, X-Ray Diffraction, Fourier Transformed Infra-Red, ThermoGravimetric Analysis and magnetic measurements.

Keywords: iron oxide nanoparticles, synthesis, functionalization, sterilization, physicochemical properties, magnetic properties

Introduction

For several decades, nanoparticles (NPs) have been used in different fields: depollution [1], energy storage [2], biomedical applications [3–7]. In this latter field, magnetic NPs at room temperature are often used for diagnosis (contrast agent for MRI) [7], for therapy (hyperthermia) [3] or both [4]. In these cases, magnetic NPs must be biocompatible, stable in aqueous solution and have controlled magnetic properties. To achieve these characteristics, magnetic iron oxide nanoparticles are a good candidate [8,9].

There are several types of magnetic iron oxide NPs including SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) [7,10–12]. For example, with a superparamagnetic state at room temperature, SPIONs are used as a negative contrast agent for MRI for the lymphatic system [10]. SPIONs are conventionally coated with an organic or an inorganic shell to improve their solubility, stability and

biocompatibility [13]. Several studies are based on this stability of the iron oxide nanoparticles in aqueous solution using different organic shells: with polymers such as dextran [14], Poly Ethylene Glycol (PEG) [15], Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP) [16], chitosan [17] or with small molecules such as citric acid [18], catechol [19].

For biomedical applications, NPs must be sterilized. Two main methods of sterilization exist: terminal sterilization and aseptic processing. The first one is the most used after NPs synthesis [20,21]. There are several methods of terminal sterilization such as sterile filtration [22], UV irradiation [23], chemical sterilization [24], autoclaving [20].

Sterile filtration is used with nanoparticle sizes smaller than the pore size of filter. With the size of the SPIONs in this work, the nanoparticles would be stuck in the filter because this process leads to an agglomeration. With chemical sterilization, organic products like formaldehyde are often used and induce toxicological problems [24]. Finally, autoclaving and UV irradiation are the most widely used sterilization methods because they are easy and quick to use.

In this study, SPIONs covered by an organic citrate shell to stabilize them in aqueous solution are synthesized by a microwave synthesis method. A step of autoclave sterilization is then performed. A study of the evolution of the physicochemical and magnetic properties is carried out before and after treatment to estimate the impacts of these sterilization process.

Experimental

Materials

Ferrous chloride ($FeCl_2.4H_2O$) and ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) were purchased from Alfa Aesar. Citric acid ($C_6H_8O_7$) and ammonium hydroxide solution (NH_4OH) were purchased from Sigma Aldrich. In all experiment, ultrapure water (resistivity = 18.2 MΩ.cm) was used.

Synthesis

A mixture of ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$; 3.70mmol) and ferrous chloride ($FeCl_2.4H_2O$; 5.03 mmol) with citric acid ($C_6H_8O_7$; 3.16 mmol) are solubilized in 15 mL of ultra-pure water in a Pyrex reactor for the microwave. This solution is stirred until homogenization. Then, 5 mL of ammonium hydroxide solution is added to the mixture to precipitate the solution. The solution turns black and is stirred again before being placed in the microwave to heat at 96 °C for 40 min. A single-mode microwave (Monowave 400 from Anton Paar) is used. The system operates at a frequency of 2.45 GHz. The maximum power of this microwave is 850 W. The temperature is controlled by an external infrared sensor [25].

After heating, the solution is collected and washed by centrifugation. The solution is centrifuged a first time with ethanol at 10,000 rpm for 5 min and a second time with a mixture of ultrapure water and ethanol at 10,000 rpm for 5 min. The nanoparticles (SPIONs) obtained are then dispersed in ultrapure water. A part is evaporated at 60°C to obtain powder for X-Ray Diffraction, ThermoGravimetric Analysis and magnetic measurements. The other part is kept in solution for Transmission Electronic Microscopy, Fourier Transformed InfraRed and Dynamic Light Scattering measurements.

Autoclaving

To sterilize SPIONs, an autoclaving treatment is performed at 120°C during 30 min using an autoclave from Advantage Labo (model AL02-07-100).

Characterizations

Different techniques are used for the characterization of nanoparticles.

Transmission Electron Microscopy

Transmission Electron Microscopy (TEM) is used to analyse the shape, size and solvent dispersion of nanoparticles. The TEM is a CM200-FEI operating at 200 kW (point resolution 0.27 nm). The size distribution is calculated using free software ImageJ [26].

Dynamic Light Scattering

Dynamic Light Scattering experiments (DLS) were performed by the ZETASIZER Nano ZS device from Malvern Instrumental. The aqueous solution of nanoparticles is diluted one hundred times (final concentration of 0.2 mg/mL) to determine the hydrodynamic size distribution and polydispersity. The isolated or aggregated character of the SPIONs influence the colloidal stability. To evaluate this stability in an aqueous solution, DLS experiments are conducted to determine the average hydrodynamic diameter of the SPIONs in suspension. The DLS measurements are performed three times and the average of these three measurements will be presented in this work.

X-Ray diffraction

X-Ray Diffraction (XRD) patterns were recorded in standard conditions with an INEL CPS120 equipped with a monochromatic cobalt radiation (Co Kα = 0.17886 nm) at grazing angle of incidence simultaneously on 120°. Crystallite size was calculated with the Debye-Scherrer equation from the most intense peak for (311) plane [27].

Fourier Transform Infra-Red spectroscopy

Fourier Transform InfraRed analysis (FTIR) were performed with a Nicolet 6700 from Thermo-Fisher between 400 and 4 000 cm^{-1}.

Thermogravimetric analysis

ThermoGravimetric Analysis (TGA) were performed on nanoparticle powder to determine the quantity of the organic shell and of the iron oxide core. The device used was a SETSYS EV 1750 TGA microbalance from Setaram. Experiments were conducted in the temperature range of 20°C to 600°C under air flow (20 mL/min) at a heating rate of 10°C/min.

Magnetic measurements

The NPs magnetic properties in powder state were determined by Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) with a Vibrating Sample Magnetometer (VSM) Quantum Design head to determine the saturation magnetization (Ms) and the blocking temperature (T_B). The magnetization was measured by sweeping the magnetic field from +5 T to -5T, and then from -5T to +5T.

Magnetization curves as a function of the temperature were recorded as follows: samples were introduced in the SQUID at room temperature (300K) and cooled down to 5 K with no applied field after applying a careful degaussing procedure. A magnetic field of of 200 Oe was then applied, and the magnetization was recorded upon heating from 5 to 300 K (zero field cooled curves called ZFC curves). The sample was then cooled down to 5 K under the same applied field, and the magnetization was recorded upon heating from 5 to 300 K (field cool curve called FC curves).

Results and discussion

As the organic citrate layer used in this study is composed exclusively of carbons, oxygen and hydrogen, only the inorganic core is visualized by TEM. The TEM micrographs in Fig. 1 show spherical and isolated SPIONs before (Fig. 1.a) and after (Fig. 1.b) sterilization by autoclaving.

The narrow size distribution histograms are similar before (Fig. 1.c) and after (Fig. 1.d) sterilization. The average particle diameters determined by ImageJ are 2.10 ± 1.15 nm for 2163 counted nanoparticles and 2.57 ± 0.99 nm for 2008 counted nanoparticles respectively before and after sterilization.

TEM analysis of the sterilized or non-sterilized SPIONs show that the sterilization by autoclave doesn't modify the shape, the size and the aggregation state of SPIONs.

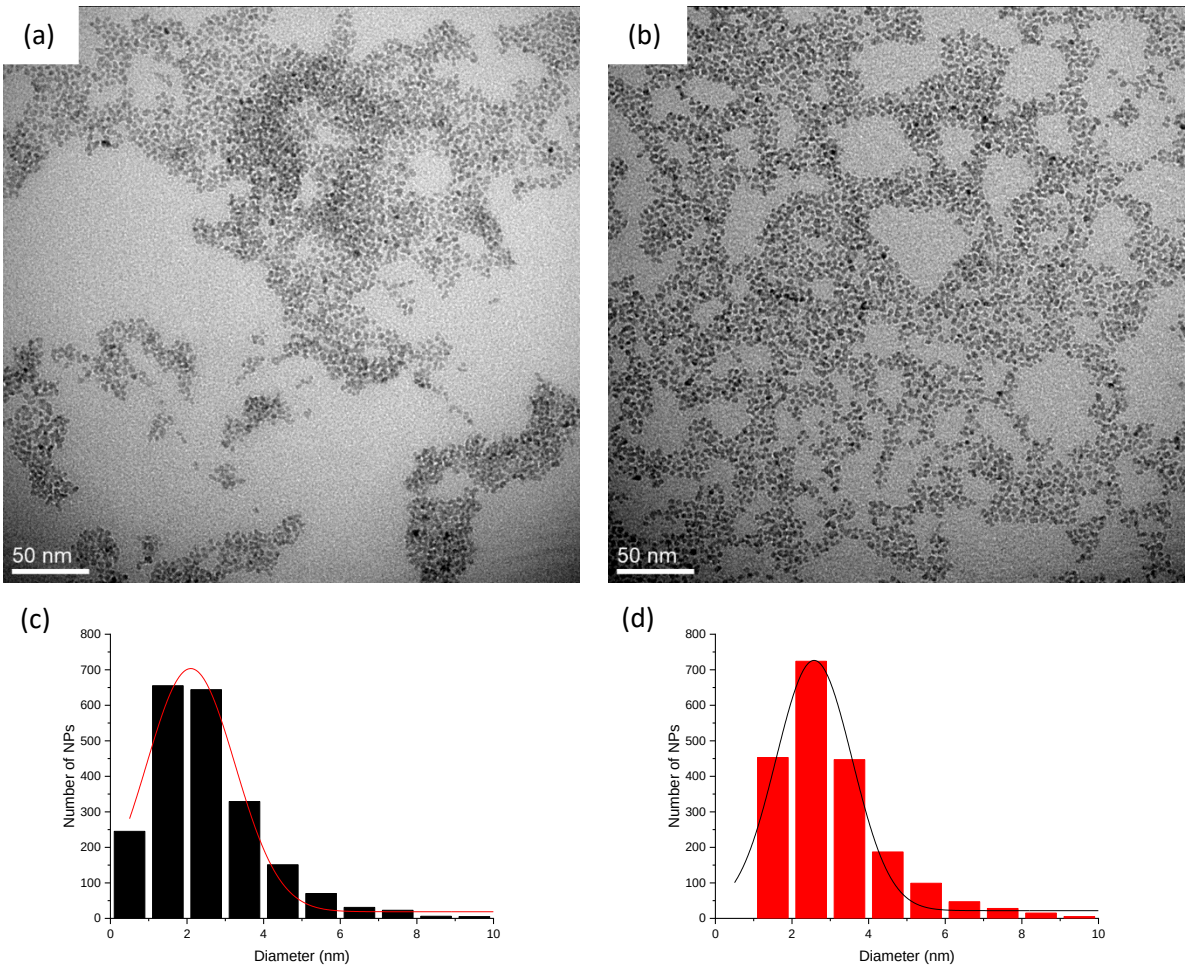


Fig. 1: *TEM images of SPIONs (a) before and (b) after sterilization by autoclaving with their size distribution histogram respectively in (c) and (d).*

Figures 2 present a comparison of size distribution obtained by TEM and DLS. For both, only a population of SPIONs is highlighted. The polydispersity index (PDI) for DLS with small values of 0.29 before treatment and 0.23 after treatment confirms the narrow size distribution obtained by TEM. The mean hydrodynamic diameter corresponds to the maximum of the DLS curve. Figure 2 shows a difference between the diameters determined by TEM on a dry sample and the hydrodynamic diameters measured by DLS in solution. In fact, the hydrodynamic diameter corresponds to the diameter of the mineral shell associated with the thickness of the organic shell and the solvation layer resulting from the interaction between the SPIONs and the aqueous solvent [28]. The hydrodynamic diameter of the SPIONs before (Fig. 2.a) and after (Fig. 2.b) autoclaving is respectively equal to 8.56 ± 2.76 nm and 8.77 ± 2.80 nm. These measurements confirm the conclusions of the TEM analyses. The autoclaving process doesn't modify the nanoparticles size and doesn't induce an aggregation phenomenon.

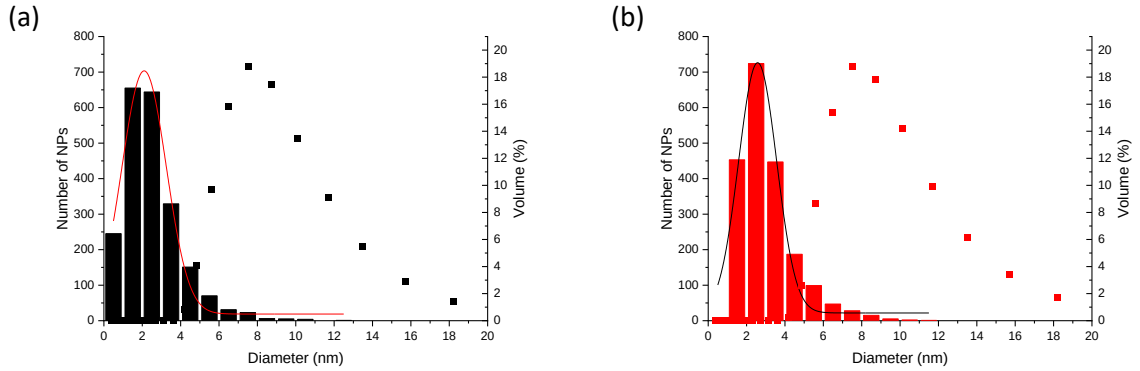


Fig. 2: *Comparison between average hydrodynamic diameters determined by DLS measurements (point curve) and with size distribution histogram obtained by TEM of SPIONs (a) before and (b) after sterilization.*

XRD patterns of SPIONs powder samples show in Fig. 3. Magnetite (Fe_3O_4) and maghemite (γ-Fe_2O_3) crystallize in a same cubic crystal structure (space group F_{d3m}) making it difficult to separate these two structures. Several studies are showed the difference between the XRD pattern of magnetite and of maghemite thanks to the presence of two peaks for the maghemite (corresponding to the appearance of peaks due to vacancies) [6] or thanks to the deconvolution method of some peaks [29].

To determine the influence of sterilization by autoclave on structural properties, the XRD patterns before and after sterilization are compared to a reference of magnetite nanoparticles (JCPDS file: 04-009-2284). The major peaks of the magnetite planes (220), (311), (400), (511) and (440) are present and confirmed the crystallization of the inorganic core. With the Debye Scherrer equation and using the main peak (311), the crystallites size is obtained. The crystallites size is equal to 3.42 nm before sterilization and 3.54 nm after sterilization. The SPIONs sterilization with an autoclave does not influence the crystalline structure.

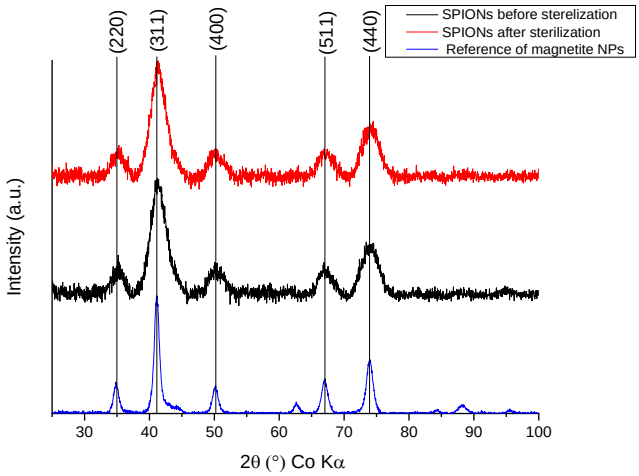


Fig. 3: *Comparison of XRD patterns of SPIONs before sterilization (black) and after sterilization (red) with XRD pattern of a magnetite NPs reference.*

FTIR spectra of SPIONs before and after sterilization, shown in fig 4, can be used to characterize the organic layer and the inorganic core. First, it is important to note that spectra are similar, so the organic layer of SPIONs are not degrade by autoclave sterilization. The large band from 3500 cm^{-1} to 2500 cm^{-1} corresponds to the ν(OH) of water. The band at 3200 cm^{-1} is assigned to the ν(NH) of free ammonium. The band at 2800 cm^{-1} corresponds to the $\nu_s(CH_2)$. The bands at 1610 cm^{-1}, 1402 cm^{-1} and 1064 cm^{-1} are assigned to $\nu_a(OCO^-)$, $\delta_s(OCO^-)$ and $\nu_s(CO)$ respectively. Finally, the bands at 632 cm^{-1} and 580 cm^{-1} corresponds to the elongation of Fe-O bond for maghemite and magnetite respectively [30] .

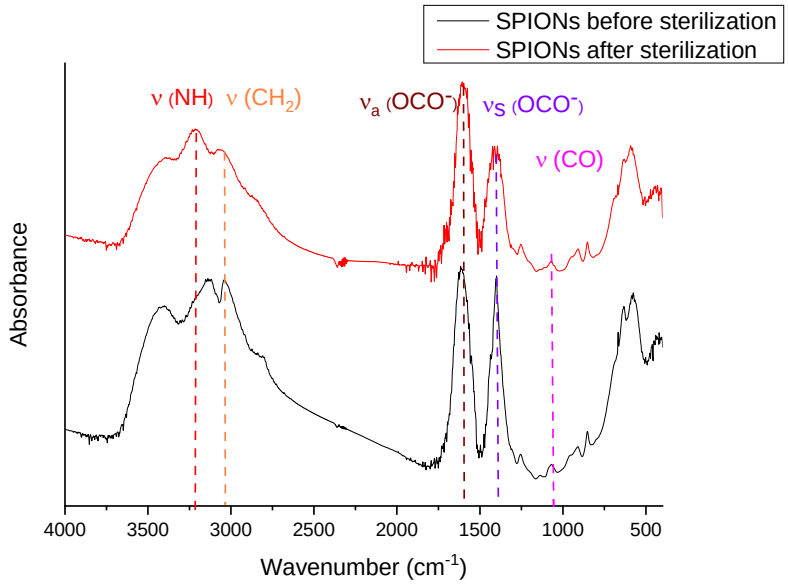


Fig. 4: *FTIR spectra of SPIONs before (black) and after (red) sterilization between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1}.*

To confirm the presence of the organic layer, TGA measurements are realized. The heating curves of SPIONs sample before and after sterilization are shown in Fig. 5. The same behaviour between SPIONs before and after sterilization is observed. In a first time, around 100°C, a weight loss is present and corresponds to the evaporation of water. Then, a second stage from 180°C to 250°C corresponds to the decomposition of citrate. Finally, a last weight loss is produced around 320°C for the last residues of citrate. The remaining mass corresponds to the mass of iron oxide which was oxidized to hematite (α-Fe_2O_3). For SPIONs before sterilization, the percentage weight loss is equal to 39% (9% of water and 30% of the organic layer): the remaining mass of the powder is equal to 61% and corresponds to the percentage of iron oxide. For SPIONs after sterilization, the powder contains 62% of iron oxide and 31% of organic layer. Both the TGA and FTIR results confirm the non-degradation of organic layer during the sterilization. Indeed, the autoclave treatment temperature of 120°C is lower than the decomposition temperature of the citrate observed by thermogravimetric analysis: the autoclave cannot degrade the citrate layer.

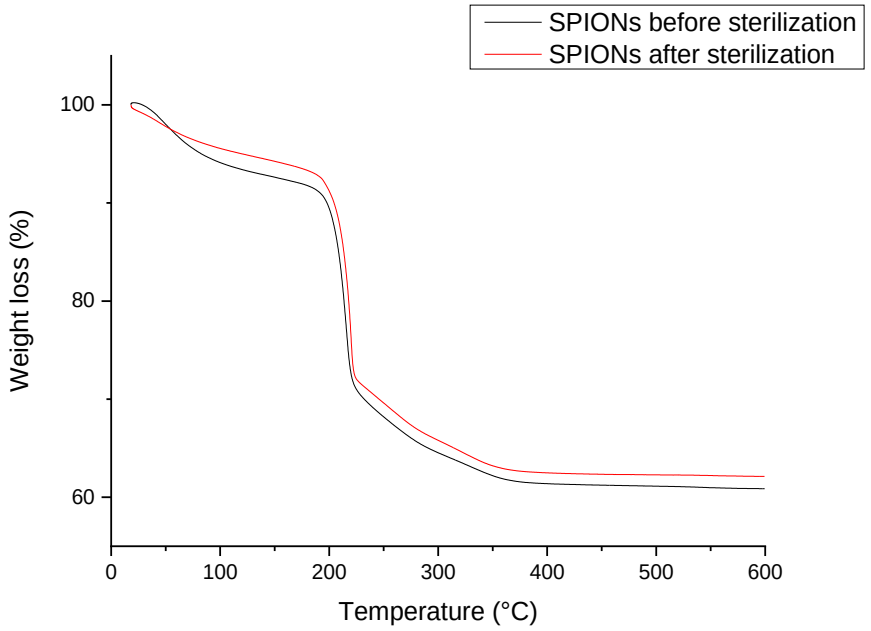


Fig. 5: *TGA results of SPIONs before sterilization (black) and after sterilization (red) between 20°C and 600 °C.*

The magnetization curves M(H) at 300K and at 5K (with and without a magnetic field during the cooling) are presented in Fig. 6. Without effect of the sterilization, no hysteresis is observed at 300K (Fig. 6.a) which is characteristic of superparamagnetic behaviour. At 300K, M_s are equal 54.61 emu.g^{-1} and 53.10 emu.g^{-1} for SPIONs before and after sterilization respectively at 5 T (Fig. 6.a). These values are similar with the M_S values of SPIONs which are used as a contrast agent in MRI [31–34].

At 5K, M_S increase and they are equal to 58 emu.g^{-1} and 61 emu.g^{-1} for SPIONs before and after sterilization respectively at 0.5 T (Fig. 6.b). These values confirm the same size of SPIONs before and after the sterilization treatment.

To evaluate the potential oxidation at the surface of SPIONs, two magnetization curves are realized at 5K: one without magnetic field during the cooling and the second with a magnetic field (4 T) during the cooling.

For SPIONs before and after sterilization (Fig. 6.c and fig 6.d), the left coercive field is similar with or without applied field during the cooling. Sterilization by autoclaving doesn't influence the superparamagnetic properties of iron oxide nanoparticles. If there is an oxidation at the surface, the magnetic state of the surface will be different compared with the magnetic state of the core and nanoparticles will be core-shell structure defined as Fe_3O_4@Fe_2O_3. This core-shell structure would be demonstrated by a difference in values between the left coercive field obtained in the 5K cycle without field and with field. No oxidation at the nanoparticle surface is observed after treatment in accordance with the XRD conclusions.

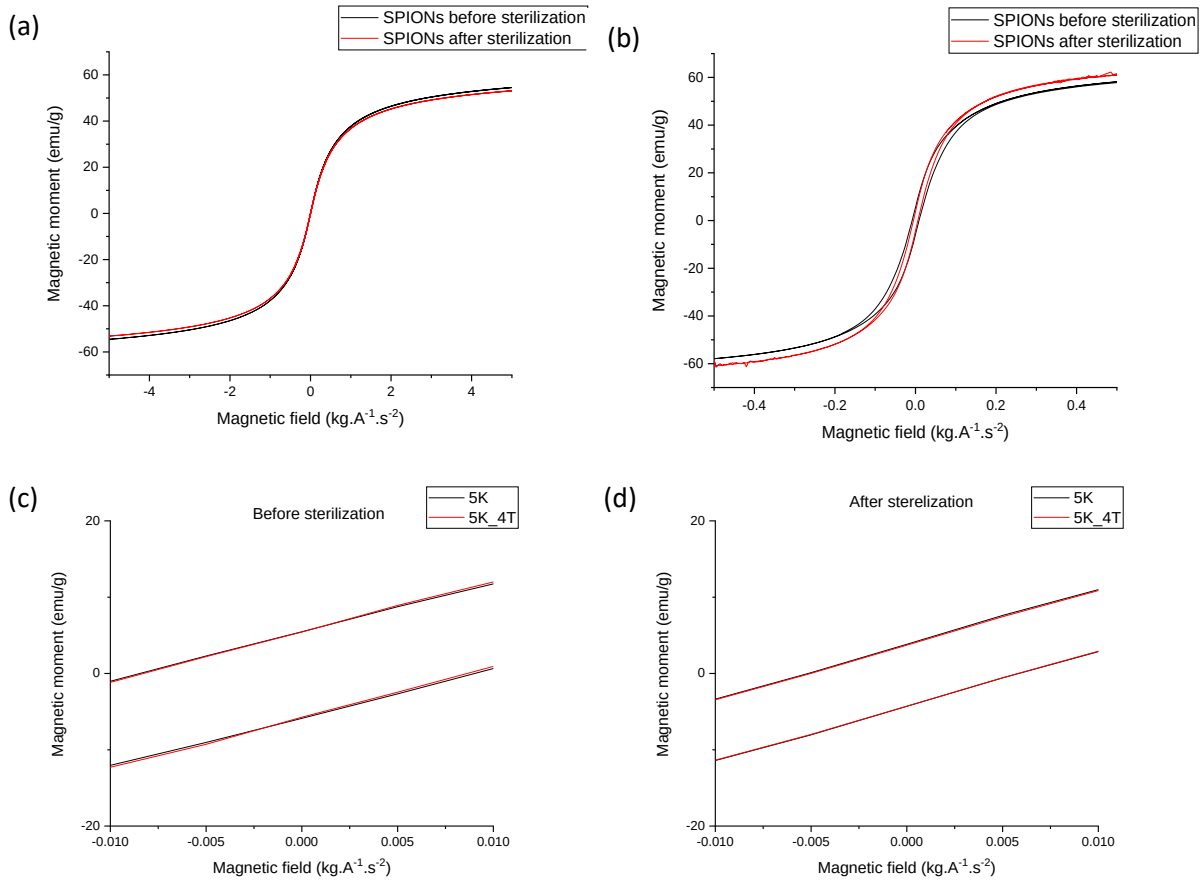


Fig. 6: *Magnetization curves of SPIONs before (black) and after (red) sterilization as a function of an applied magnetic field at (a) 300K and at (b) 5K. Magnetization curves at 5K without or with applied field during the cooling for SPIONs (c) before sterilization and (d) after sterilization.*

To determine the blocking temperature (T_B) defined as the temperature transition between the superparamagnetic state and the ferrimagnetic state, ZFC/FC measurements were recorded (Fig. 7). T_B are assimilated to the maximum of ZFC curves and are equal to 14K and 13K before and after sterilization respectively. However, these values are not the exact blocking temperatures, so we are to do further study as shown by Bruvera and al in their work [35]. These values confirm the superparamagnetic state at 300K and the small sizes of the synthesized SPIONs with a size of nanoparticles proportional to the values of T_B. In addition, a narrow ZFC curve corresponding to a narrow T_B distribution confirms a narrow size distribution of the SPIONs. The narrowness of the ZFC curves before and after autoclave process is in agreement with the narrow size distributions obtained in TEM and DLS.

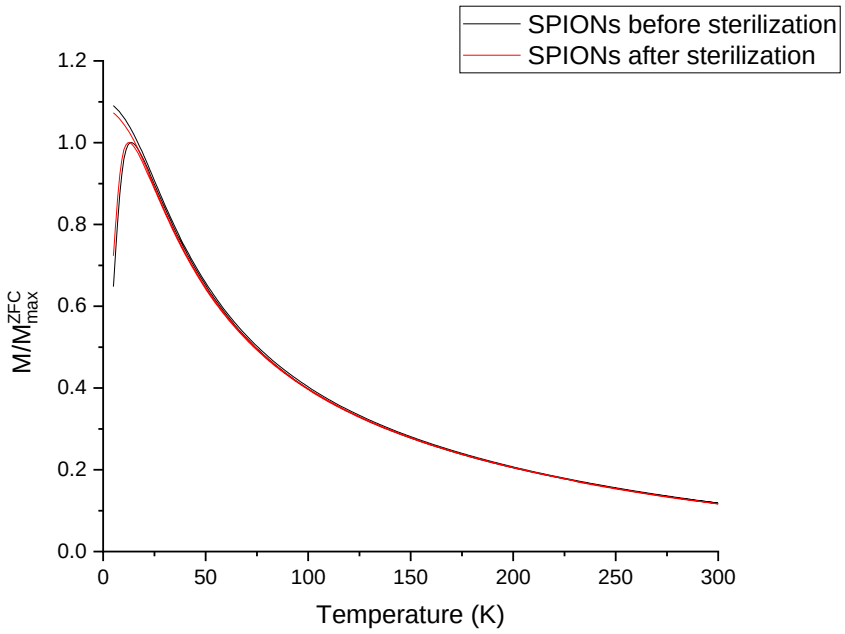


Fig. 7: *Magnetization as function of the temperature measured under a permanent field of 200 Oe. ZFC-FC curves of SPIONs before (black) and after (red) sterilization.*

Conclusion

SPIONs are synthesized by a one-step microwave method. The nanoparticles obtained by this method present a monodisperse distribution with a narrow size distribution, stable in aqueous solution and exhibit superparamagnetic behaviour, which make them good candidates for biomedical applications. Prior to biomedical applications and *in vitro* contact with cells, an essential step is the sample sterilization. The method used in this study is the autoclave sterilization. A systematic characterization of nanoparticles before and after autoclaving by TEM, DLS, XRD, FTIR, TGA and magnetic measurements has demonstrated that SPIONs keep their physicochemical and magnetic properties after the autoclave treatment. This sterilization treatment doesn't modify the size, morphology or crystal structure of SPIONs. This sterilization does not degrade the organic shell and preserved the surface state of the inorganic core. No additional oxidation is observed. Without aggregation of the nanoparticles after sterilization by this method, the colloidal stability is also preserved. The method of sterilization of SPIONs by autoclave without influence on their physicochemical and magnetic properties is validated before future analysis of cytotoxity and biocompatibility study.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the MEM, X-Gamma and Magnetism Competence Centers of Institute Jean Lamour for assistance in TEM, X-ray diffraction and magnetism experiments.

References

1 R. Ortega-Villar, L. Lizárraga-Mendiola, C. Coronel-Olivares, L. D. López-León, C. A. Bigurra-Alzati and G. A. Vázquez-Rodríguez, *J. Environ. Manage.*, **242**, 487–495,2019.

2 J. Peng, W. Zhang, L. Chen, T. Wu, M. Zheng, H. Dong, H. Hu, Y. Xiao, Y. Liu and Y. Liang, *Chem. Eng. J.*, **404**, 126461, 2021.

3 S. Laurent, S. Dutz, U. O. Häfeli and M. Mahmoudi, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **166**, 8–23, 2011.

4 S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset and E. Duguet, *J. Mater. Chem.*, **14**, 2161, 2004.

5 A.-H. Lu, E. L. Salabas and F. Schüth, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 1222–1244, 2007.

6 W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang and W.-S. Kim, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **16**, 023501, 2015.

7 L. Babes, B. Denizot, G. Tanguy, J. J. Le Jeune and P. Jallet, *J. Colloid Interface Sci.*, **212**, 474–482,1999.

8 C. Corot, P. Robert, J. Idee and M. Port, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 1471–1504, 2006.

9 U. Jeong, X. Teng, Y. Wang, H. Yang and Y. Xia, *Adv. Mater.*, **19**, 33–60, 2007.

10 R. Qiao, C. Yang and M. Gao, *J. Mater. Chem.*, **19**, 6274, 2009.

11 M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent and T. Sen, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 24–46, 2011.

12 K. Niemirowicz, KH. Markiewicz, AZ. Wilczewska, H. Car, *Adv Med. Science*, **52**, 196-207, 2012.

13 S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, **108**, 2064–2110, 2008.

14 H. D. Do, T. T. H. Le, H. N. Pham and P. T. Ha, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, **10**, 015008, 2019.

15 C. Yue-Jian, T. juan, X. Fei, Z. Jia-Bi, G. Ning, Z. Yi-Hua, D. Ye and G. Liang, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **36**, 1235–1244, 2010.

16 O. A. Abu-Noqta, A. A. Aziz and A. I. Usman, *Mater. Today Proc.*, **17**, 1072–1077, 2019.

17 J.-B. Qu, H.-H. Shao, G.-L. Jing and F. Huang, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **102**, 37–44, 2013.

18 M. E. de Sousa, M. B. Fernández van Raap, P. C. Rivas, P. Mendoza Zélis, P. Girardin, G. A. Pasquevich, J. L. Alessandrini, D. Muraca and F. H. Sánchez, *J. Phys. Chem. C*, **117**, 5436–5445, 2013.

19 H. B. Na, G. Palui, J. T. Rosenberg, X. Ji, S. C. Grant and H. Mattoussi, *ACS Nano*, **6**, 389–399, 2012.

20 S. Dutz, S. Wojahn, C. Gräfe, A. Weidner and J. Clement, *Nanomaterials*, **7**, 453, 2017.

21 L. Li, K. Y. Mak, J. Shi, C. H. Leung, C. M. Wong, C. W. Leung, C. S. K. Mak, K. Y. Chan, N. M. M. Chan, E. X. Wu and P. W. T. Pong, *Microelectron. Eng.*, 310–313, 2013.

22 Y. N. Konan, R. Gurny and E. Alléman, *Int. J. Pharm.*, 239–252, 2002.

23 Y. Gu, F. Xiao, L. Luo, X. Zhou, X. Zhou, J. Li and Z. Li, *Nanomaterials*, **10**, 18, 2019.

24 P. Sommerfeld, U. Schroeder and B. A. Sabel, *Int. J. Pharm.*, **164**, 113–118, 1998.

25 P. Venturini, S. Fleutot, F. Cleymand, T. Hauet, J. Dupin, J. Ghanbaja, H. Martinez, J. Robin and V. Lapinte, *ChemistrySelect*, **3**, 11898–11901, 2018.

26 M.D. Abràmoff, P.J. Magalhães, S.J. Ram, *Biophotonics International*, 36-32, 2004.

27 P. Gravereau, *Introduction à la pratique de la diffraction des rayons X par les poudres.*, 3rd edn., 2011.

28 J. Lim, S. P. Yeap, H. X. Che and S. C. Low, *Nanoscale Res. Lett.*, **8**, 381, 2013.

29 W. Kim, C.-Y. Suh, S.-W. Cho, K.-M. Roh, H. Kwon, K. Song and I.-J. Shon, *Talanta*, 348–352, 2012.

30 S. Nigam, K. C. Barick and D. Bahadur, *J. Magn. Magn. Mater.*, 237–243, 2011.

31 A. M. Predescu, E. Matei, A. C. Berbecaru, C. Pantilimon, C. Drăgan, R. Vidu, C. Predescu and V. Kuncser, *R. Soc. Open Sci.*, **5**, 171525, 2018.

32 N. Ohannesian, C. T. De Leo and K. S. Martirosyan, *Mater. Today Proc.*, **13**, 397–403, 2019.

33 G. Kandasamy and D. Maity, *Int. J. Pharm.*, **496**, 191–218, 2015.
34 Y. Wu, Z. Lu, Y. Li, J. Yang and X. Zhang, *Nanomaterials*, **10**, 1441, 2020.
35 I.J. Bruvera, P. Mendoza Zelis, M. Pilar Calatayud, G.F. Goya, and F.H. Sánchez, *Journal of Applied Physics,* **118**, 184304–9, 2015.

Rapid microwave synthesis of magnetic nanoparticles in physiological serum

Thomas Girardet, Lyns Verel Che Dji, Sabine Bouguet-Bonnet, Franck Cleymand, Solenne Fleutot*

**Corresponding author: Solenne Fleutot, Institut Jean Lamour, CNRS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France, e-mail: solenne.fleutot@univ-lorraine.fr*

Thomas Girardet, Franck Cleymand and Solenne Fleutot, Institut Jean Lamour, CNRS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France

Lyns Verel Che Dji and Sabine Bouguet-Bonnet, CRM2, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France

Abstract

Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) are more and more used in biomedical applications such as therapy (treatment for certain cancers, hyperthermia), diagnostic (contrast agent for Magnetic Resonance Imaging) or both. For these applications, SPIONs must be stable in an aqueous solution, monodisperse, with a narrow size distribution and without aggregation. To obtain these nanoparticles, a microwave process is carried out in this study as an easy, fast and reproducible synthesis method. Currently, in the literature, most synthesis of SPIONs are in ultra-pure water or another solvent. To consider the use of SPIONs in biomedical applications, it is essential to ensure the preservation of the physico-chemical parameters of the nanoparticles in the physiological medium to validate a synthesis process. With this objective, this study reports a comparison between the SPIONs synthesis in ultra-pure water and the SPIONs direct synthesis in a physiological serum (containing NaCl). To complete this comparison, the dispersion of SPIONs in physiological serum after an elaboration in ultra-pure water is reported. Characterizations of these different SPIONs samples are carried out to determine the physico-chemical parameters and magnetic properties. SPIONs are characterized by Transmission Electronic Microscopy, Dynamic Light Scattering, X-Ray Diffraction, Raman spectroscopy and magnetic measurements. Finally, to check if SPIONs can be used as contrast agent for MRI, a relaxometry measurement is performed.

Keywords: iron oxide nanoparticles; microwave process; contrast agent; physiological serum; NMR relaxometry.

Introduction

For several decades, nanoparticles (NPs) have been used in different fields such as energy storage [1], depollution [2], biomedical applications [3–6]. Indeed, thanks to their size between 1 to 100 nm, comparable to the size of cells, viruses, proteins, interaction between them allows to a great potential for these applications [7]. NPs are indeed used for applications in diagnostic (for example, as a contrast agent CA [8,9]), in therapy (hyperthermia [10,11]) or both (for example, with a drug delivery to treat cancer [12,13]) but the composition of these NPs can be different and adapted according to the targeted application. For example, silver NPs are used as antibacterial agents [14], magnetic NPs such as iron oxide or gadolinium complexes are used as CA [5,9,15].

CA allow to enhance image contrast and also to decrease the analysis time in MRI (Magnetic Resonance Imaging). The first CAs were developed during the 60s by Gramiak and Shah [16]. Then, during the 80s, several commercial CAs have been developed with a gadolinium core. Indeed, thanks to the magnetic behaviour of gadolinium Gd^{3+} (paramagnetism), the longitudinal relaxation time T_1 decreases and the image contrast is improved. However, Gd^{3+} is neurotoxic: an organic layer around the inorganic core is mandatory to avoid a neurocellular destruction [17]. Superparamagnetic NPs are used to shorten the transverse relaxation time T_2.
Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) such as magnetite (Fe_3O_4) or its oxidized form maghemite (γ-Fe_2O_3) are commonly used as CA [5,9,13,18–21]. Indeed, SPIONs are biocompatible and different synthesis are well known. To use SPIONs as CA, NPs must be in an aqueous solution, with a narrow size distribution, with a good crystallinity and good magnetic properties. The different synthesis of SPIONs allow to obtain a part of these properties. For example, the coprecipitation is a synthesis directly in an aqueous media with soft conditions but with a possible aggregation of NPs and a large size distribution [22–24]. To decrease this phenomena, an addition of a ligand during the synthesis can be used: different ligands have been added like for example citric acid [25–27], polyvinyl alcohol (PVA) [28], oleic acid [29], ethylene glycol [30].

Other synthesis allow to obtain SPIONs directly in water, such as hydrothermal synthesis [31] or microemulsion [32] but the conditions are hard and don't allow to obtain monodisperse NPs. The thermal decomposition is an alternative to synthesize SPIONs and presents the advantage of obtaining SPIONs which are monodisperse, with a narrow size distribution and a good crystallinity [33,34]. By thermal decomposition at high temperature, synthesized SPIONs are stable in an organic solution (cyclohexane, chloroform, toluene, …), but a subsequent phase transfer step is therefore mandatory to use SPIONs for the biomedical applications [35,36].
To obtain monodisperse SPIONs in an aqueous media, a new synthesis is more and more used: the microwave synthesis [27,37–39]. Indeed, thanks to the microwave irradiations, the temperature is better controlled inside the reactor: there is a vibration of the solvent molecules generating local heating of the solution. Synthesized SPIONs are stable in an aqueous solution, monodisperse (because a ligand was added during the synthesis), with a good crystallinity and good magnetic properties.
Numerous studies describe the potential use of SPIONs but generally synthesized in ultra-pure water or dispersed in water after a phase transfer. However, in a living organism, there are several proteins and molecules which can lead to an aggregation of these NPs. To limit this phenomenon, we consider it important to obtain SPIONs that are stable in a physiological medium before application.

The goal of this study is to compare the synthesis of SPIONs in different aqueous media. Indeed, we compare a synthesis in ultra-pure water to a synthesis in physiological serum and to a redispersion of SPIONs in a physiological serum. For each synthesis, systematic characterizations are realized to determine the size, the crystallinity, the composition and the magnetic properties. Then, a comparison of relaxivity values of these different synthesis is performed to verify the influence of the physiological serum on the synthesis.

Experimental

Materials

Ferrous chloride ($FeCl_2.4H_2O$) and ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) were purchased from Alfa Aesar. Citric acid ($C_6H_8O_7$) and ammonium hydroxide solution (NH_4OH) were purchased from Sigma Aldrich. For the experiments, ultrapure water (resistivity = 18.2 MΩ.cm) or commercial physiological serum (with 0.9 g of NaCl per 100 mL of ultra-pure water) were used.

Synthesis

A previous work describes the synthesis used for this study [27]. A mixture of ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$; 3.70mmol) and ferrous chloride ($FeCl_2.4H_2O$; 5.03 mmol) with citric acid ($C_6H_8O_7$; 3.16 mmol) are solubilized in 15 mL of ultra-pure water or physiological serum in a Pyrex reactor for the microwave. This solution is stirred until homogenization. Then, 5 mL of ammonium hydroxide solution is added to the mixture to precipitate the solution. The solution turns black and is stirred again before being placed in the microwave to heat at 96 °C for 40 min. A single-mode microwave (Monowave 400 from Anton Paar) is used. The system operates at a frequency of 2.45 GHz. The maximum power of this microwave is 850 W. The temperature is controlled by an external infrared sensor [40].

After heating, the solution is collected and washed by centrifugation for a purification step. The solution is centrifuged a first time with ethanol at 10 000 rpm for 5 min and a second time with a mixture of ultrapure water or physiological serum and ethanol at 10 000 rpm for 5 min. The nanoparticles (SPIONs) obtained are then dispersed in ultrapure water or physiological serum. A part is evaporated at 60°C to obtain powder for X-Ray Diffraction, Raman spectroscopy and magnetic measurements. The other part is kept in solution for Transmission Electronic Microscopy, Dynamic Light Scattering measurements and relaxometry measurements.

The obtained sample by the synthesis, the purification and the redispersion of iron oxide nanoparticles in ultra-pure water is named NPs_{ww}. The obtained sample by the synthesis and the purification in ultra-pure water then the redispersion in physiological serum is named NPs_{wp}. Finally, the obtained sample by the synthesis, the purification and the redispersion in physiological serum is named NPs_{pp}.

Characterizations

Different techniques are used for the characterization of nanoparticles.

Transmission Electron Microscopy

Transmission Electron Microscopy (TEM) is used to determine the shape, the size and the solvent dispersion of nanoparticles. The TEM is a CM200-FEI operating at 200 kW (point resolution 0.27 nm) from Philips. The distribution of size is obtained using free software ImageJ [41].

Dynamic Light Scattering

Dynamic Light Scattering experiments (DLS) were performed by the ZETASIZER Nano ZS device from Malvern Instrumental. The aqueous solution of nanoparticles is diluted (final concentration of 0.2 mg/mL) to determine the hydrodynamic size distribution. The DLS measurements are performed three times and the average of these three measurements will be presented in this work.

X-Ray diffraction

X-Ray Diffraction (XRD) patterns were recorded in standard conditions with an INEL CPS120 equipped with a monochromatic cobalt radiation (Co Kα = 0.17886 nm) at grazing angle of incidence simultaneously on 120°. Crystallite size was calculated with the Debye-Scherrer equation from the most intense peak for (311) plane.

Raman spectroscopy

Raman scattering measurements were performed at room temperature with a laser at 633 nm. The scattered light is analysed by a monochromator with a 1800 lines/mm grating and with a Charge-Coupled Device (CCD) detector.

Magnetic measurements

The NPs magnetic properties in powder state were determined by Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) with a Vibrating Sample Magnetometer (VSM) Quantum Design head. The saturation magnetization (Ms) and the blocking temperature (T_B) are the most important information obtained with this technique. The magnetization was measured by sweeping the magnetic field from +50 000 Oe (1 T = 10 000 Oe) to -50 000 Oe and then from -50 000 Oe to +50 000 Oe.
Magnetization curves as a function of the temperature were recorded as follows: samples were introduced in the SQUID at room temperature (300K) and cooled down to 5 K with no applied field after applying a careful degaussing procedure. A magnetic field of of 200 Oe was then applied, and the magnetization was recorded upon heating from 5 to 300 K (Zero Field Cooled curves called ZFC curves). The sample was then cooled down to 5 K under the same applied field, and the magnetization was recorded upon heating from 5 to 300 K (Field Cooled curve called FC curves).

Relaxometry measurements

The longitudinal ($R_1 = 1/T_1$) and transversal ($R_2 = 1/T_2$) proton relaxation rates of water in solutions containing SPIONs at different concentrations were measured at 37°C and at 1.41T. The proton Larmor frequency corresponding to this magnetic field value is 60MHz and measurements were made with a Bruker Minispec MQ60. T_1 values were measured with an inversion-recovery pulse sequence and T_2 with a CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) pulse sequence. The relaxivities (longitudinal relaxivity r_1 and transverse relaxivity r_2) were obtained by normalizing the relaxation enhancement of water protons to a millimolar solution of Fe_3O_4.

Results and discussions

Figure 1 shows the micrographs of NPs_{ww} (Fig. 1a), NPs_{wp} (Fig. 1c) and NPs_{pp} (Fig. 1e). For the three samples, the shape of SPIONs is spherical. To obtain the mean diameter, a fit by a gaussian function is carried out. The mean diameter is equal to 2.67 ± 0.76 nm, 3.00 ± 0.94 nm and 3.19 ± 1.20 nm for NPs_{ww}, NPs_{wp} and NPs_{pp} respectively thanks to the size distribution of each sample, obtained with a lower magnification (Fig. 1b, Fig. 1d and Fig. 1f). The size distribution obtained with the NPs synthesised and dispersed in water is narrower than for the synthesis or redispersion in physiological serum: the presence of NaCl in physiological serum increases the mean diameter. In addition, with the physiological serum, a little aggregation of NPs appears due to the presence of NaCl. Indeed, a NaCl matrix encompasses SPIONs. This matrix is weak when SPIONs are just dispersed in physiological serum after synthesis in water (Fig. 1c) and it is more important when the synthesis and the dispersion are in this serum (Fig 1e): the size distribution is so more important in NaCl solution that in ultra-pure water.

To confirm this hypothesis, a DLS measurement is carried out. For that, the solution of each NPs was analysed to determine the hydrodynamic diameter as well as the stability of NPs (Fig 2). Indeed, the hydrodynamic diameter is the diameter of the inorganic core increased by the thickness of the organic layer and the solvation sphere. The DLS measurements are expressed in number to be compared with the obtained TEM results. The mean hydrodynamic diameter of samples (determined by a log-normal fit) is equal to 7 ± 2 nm for NPs_{ww}, 11 ± 3 nm for NPs_{wp} and 10 ± 2 nm for NPs_{pp}: these values are higher that the diameter obtained by TEM measurements confirming the presence of an organic layer. In addition, as shown in the TEM micrographs of NPs_{wp} and NPs_{pp} (figure 1.c and 1.e), an aggregation of SPIONs is present and increases the value of the hydrodynamic diameter: it is the reason that the hydrodynamic diameter of NPs_{wp} and NPs_{pp} are higher than the hydrodynamic diameter of NPs_{ww}. Finally, the presence of the NaCl matrix can increase to a little the mean hydrodynamic diameter in agreement with TEM observations. To confirm the presence of this NaCl matrix, XRD measurements are carried out.

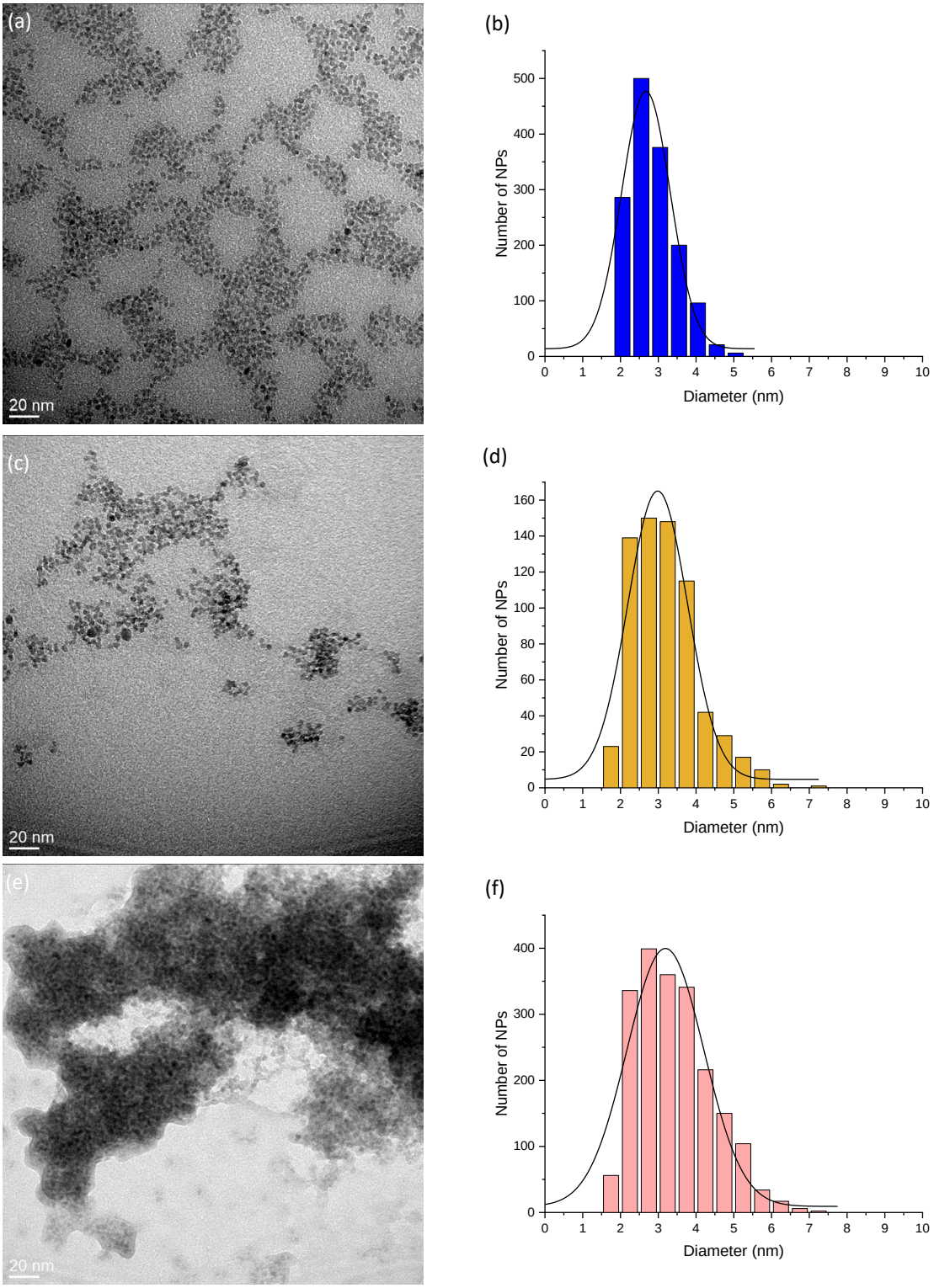


Fig 1: TEM images of NPs_{ww} (a), NPs_{wp} (c) and NPs_{pp} (e) with their size distribution histograms respectively in (b), (d) and (f). The black curve on each histogram represents a fit by a gaussian function.

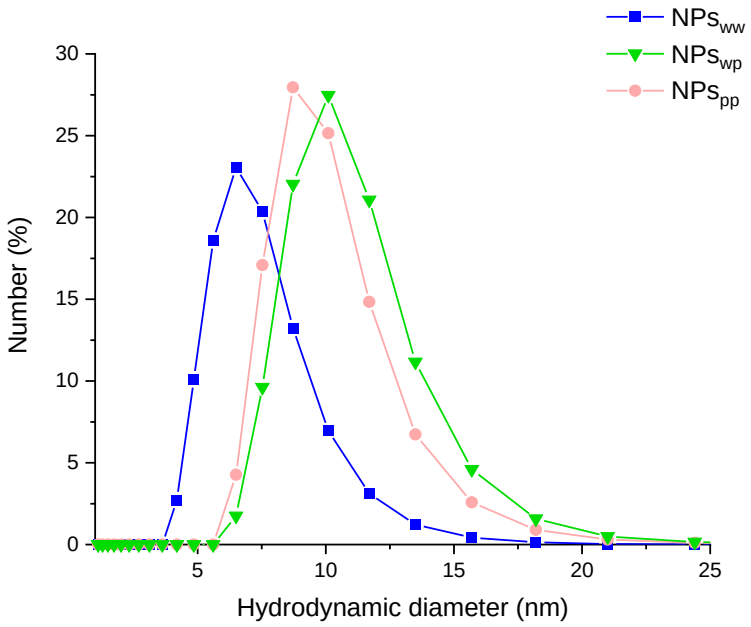


Fig 2: DLS measurements of NPs_{ww} (blue), NPs_{wp} (green) and NPs_{pp} (pink) as function of number of NPs.

Then, a XRD measurement is performed to describe the inorganic core and precisely the crystallographic structure (Fig. 3). Indeed, it exists two types of SPIONs which are magnetite Fe_3O_4 and maghemite γ-Fe_2O_3. These two iron oxide compositions crystallize in the same inverse spinel structure ($F_{d\bar{3}m}$). The lattice parameter is equal to 8.385 Å and 8.354 Å for magnetite and maghemite respectively. XRD patterns of each sample are compared with a reference pattern of magnetite (COD: 9005836). For the three samples, the main diffraction peaks of magnetite, i.e. (200), (311), (400), (511) and (440), are present.

The lattice parameter is calculated for each sample thanks to these main peaks and it is equal to 8.38 Å, 8.36 Å and 8.37 Å for NPs_{ww}, NPs_{wp} and NPs_{pp} respectively. These calculated lattice parameters are between those of magnetite and maghemite: the synthesized NPs for this study correspond to $Fe_{3-\delta}O_4$ sub-stoichiometric magnetite with δ the stoichiometric deviation. Using XRD patterns, the crystallite size can be calculated thanks to the Debye-Scherrer equation which is $t = (k\lambda)/(\beta\cos\theta)$ where t is the size of the crystallite, λ the wavelength of the X-ray radiation, β the FWHM of the main peak with a correction and θ the Bragg angle. The crystallite size is similar to the diameter obtained with the TEM for the three sample: 3.3 nm, 3.7 nm and 3.6 nm respectively for NPs_{ww}, NPs_{wp} and NPs_{pp}.

In addition, for NPs_{wp} and NPs_{pp}, several peaks are present and correspond to a NaCl phase (COD: 231042) in agreement with the interpretation of the matrix and slight aggregation observed on TEM micrographs (Fig. 1c and Fig. 1e) as resulting from the use of physiological serum containing NaCl. To confirm the presence or the absence of NaCl in each sample as function of aqueous solvent and to determine the oxidation state of iron in the inorganic core, Raman spectroscopy measurements are carried out.

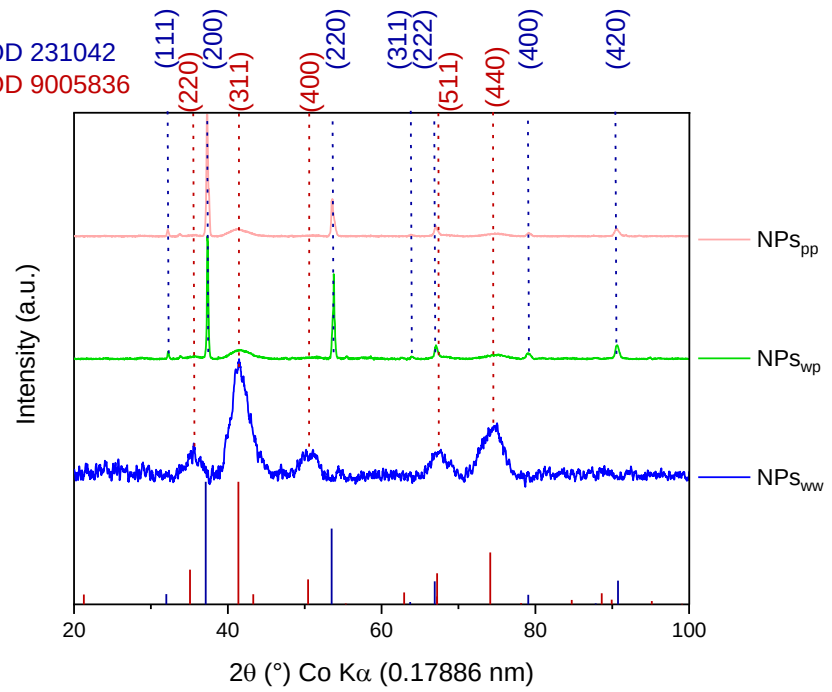


Fig 3: XRD patterns of NPs_{ww} (blue), NPs_{wp} (green) and NPs_{pp} (pink) with a comparison of reference patterns of magnetite Fe_3O_4 (COD 9005836) and sodium chloride NaCl (COD 231042).

The Raman spectra are illustrated on Fig. 4. For the three samples, we observe the vibrational modes of Fe_3O_4: E_g at 300 cm^{-1}, T_{2g} at 540 cm^{-1} and A_{1g} at 670 cm^{-1} [42]. This last mode is characteristic of the oxidation state of the iron oxide: a narrow band is representative of magnetite and a large band from 660 to 720 cm^{-1} with a split of this mode into two components is representative of maghemite. For the three samples, we can see an enlargement with the appearance of a shoulder for the A_{1g} mode by comparison with the magnetite spectrum. This observation implying an oxidation of the nanoparticles without a complete split characteristic of the unique presence of maghemite confirm the synthesis of $Fe_{3-\delta}O_4$ sub-stoichiometric magnetite for all samples as determined by XRD measurements. In addition, for NPs_{wp} and NPs_{pp}, the presence of NaCl is confirmed with the Raman spectroscopy. Indeed, several bands are present at 425 cm^{-1}, 1257 cm^{-1}, 1323 cm^{-1}, 1385 cm^{-1} and 1660 cm^{-1} and are similar with the bands on a NaCl spectrum (Fig.4).

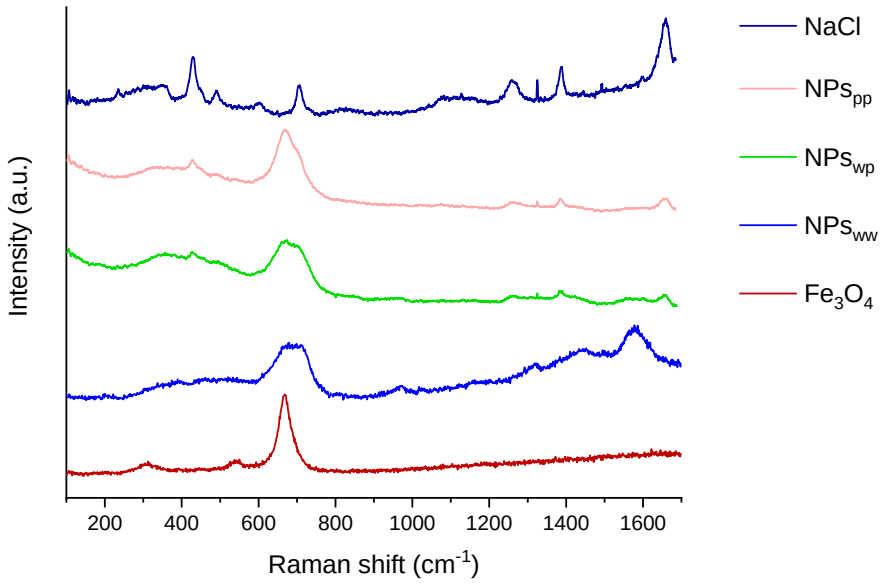


Fig. 4: Raman spectra of NPs_{ww} (blue), NPs_{wp} (green) and NPs_{pp} (pink) obtained with a laser at 633 nm at room temperature compared to a magnetite reference Fe_3O_4 and a sodium chloride reference NaCl.

Then, the magnetic properties of each sample are analysed to determine the magnetic state and the saturation magnetization (Fig. 5). For this goal, the evolution of the magnetic moment M (emu.g^{-1}) in function of magnetic field H (Oe) is analysed at 300K and at 5K. Indeed, at room temperature (Fig. 5a), the superparamagnetic state can be determined thanks to the presence of a hysteresis or not: without hysteresis, NPs are in a superparamagnetic state; with hysteresis, NPs are in a permanent magnetic state such as ferrimagnetic, ferromagnetic or antiferromagnetic. For the three samples studied here, the absence of hysteresis indicates the superparamagnetic state. With this curve, the magnetization saturation can be determined: it is equal to 55 emu.g^{-1}, 29 emu.g^{-1} and 31 emu.g^{-1} for NPs_{ww}, Nps_{wp} and NPs_{pp} respectively. The presence of NaCl in NPs_{wp} and in NPs_{pp} decreases the magnetization saturation because NaCl is a diamagnetic compound: iron oxide nanoparticles are surrounded by a NaCl matrix.

To confirm the superparamagnetic state, a magnetic measurement at 5K is carried out (Fig. 5b). At this temperature, the magnetic moment on iron oxide is in a blocked state so the magnetic behaviour is similar to a cooperative magnetism thus generating a hysteresis in the magnetic curves (Fig. 5c). The magnetization saturation obtained at 5K is higher to the magnetization saturation at 300K du to the blocked state of the magnetic moment: it is equal to 78 emu.g^{-1}, 38 emu.g^{-1} and 41 emu.g^{-1} for NPs_{ww}, Nps_{wp} and NPs_{pp} respectively.

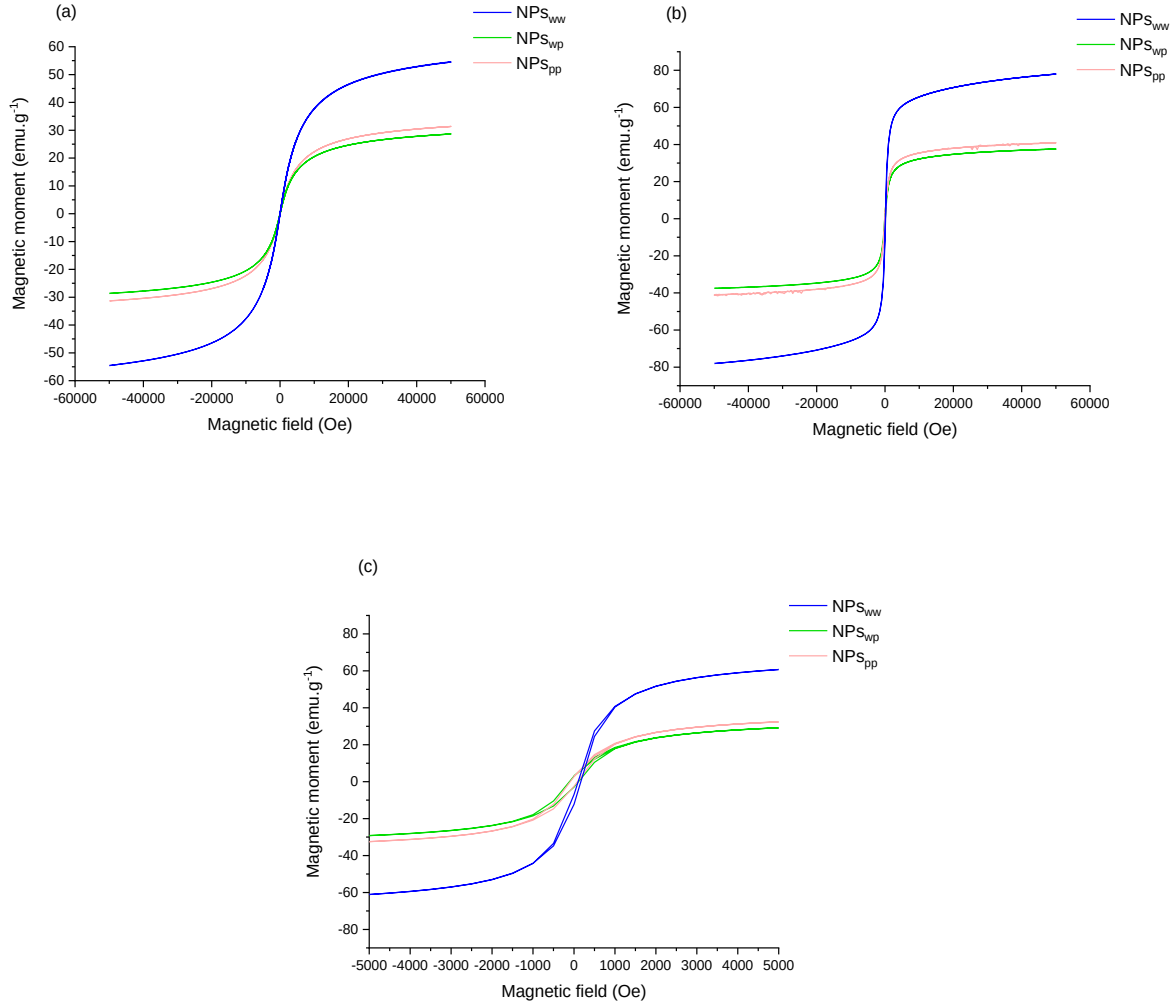


Fig 5: Magnetic moment (emu.g^{-1}) as function of magnetic field (Oe) for NPs$_{ww}$ (blue), NPs$_{wp}$ (green) and NPs$_{pp}$ (pink) at 300K (a), at 5K (b) and a zoom at 5K (c).

To complete magnetic characterizations, a ZFC-FC (Zero Field Cooled – Field Cooled) measurement is carried out to determine the blocking temperature T_B: this temperature is the transition between the superparamagnetic state and the blocked state (Fig. 6). Several methods exist to determine exactly the value of T_B with a ZFC-FC curve [43]. The most used is an assimilation to the maximum of the ZFC curve (it is the curve from 5K to 300K). For each sample, the determined T_B is 14K, 25K and 21K for NPs$_{ww}$, Nps$_{wp}$ and NPs$_{pp}$ respectively: all samples present a superparamagnetic state at room temperature. In addition, the ZFC-FC curves can be considered as a T_B distribution. For an aggregation of NPs or a larger size distribution, the curve will be larger while for a narrow size distribution of NPs, the curve will be narrower. In agreement, the ZFC curve is narrow for NPs$_{ww}$ and larger for NPs$_{wp}$ and NPs$_{pp}$. For these two samples, the distribution increase is due to the presence of the NaCl matrix. Indeed, this matrix encapsulates iron oxide nanoparticles thus creating a set of nanoparticles: this set has a higher size compared to a single nanoparticle according to a magnetic point of view with a collective behaviour.

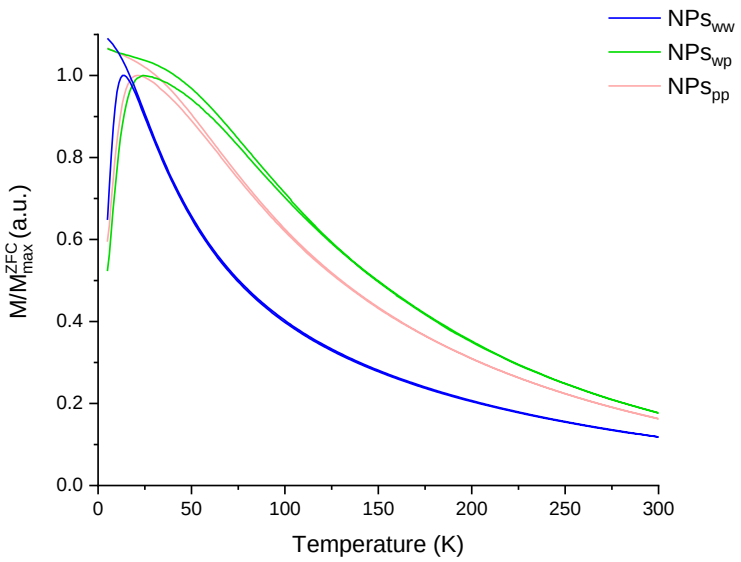


Fig 6: Magnetic moment as function the temperature measured under a magnetic field (200 Oe) of NPs_{ww} (blue), NPs_{wp} (green) and NPs_{pp} (pink).

Finally, for the application of SPIONs as contrast agents in MRI, the value of relaxivity r_i ($s^{-1}.mmol^{-1}.L$) has to be evaluated. This is done by measuring the relaxation rate R_i (i = 1;2) as a function of SPIONs concentration (at 37°C and 1.41T, Fig. 7). Indeed, the paramagnetic contribution to relaxation is linearly proportional to the concentration of CA according to the equation $R_i = r_i*C + (1/T_0)$ where C is the concentration of SPIONs (mM) and T_0 is the relaxation time of the aqueous solution without paramagnetic agent. The parameter r_i is called proton relaxivity and is given in $s^{-1}.mM^{-1}$. Here both types of relaxivities, i.e., longitudinal r_1 and transverse r_2, are obtained from the linear fitting of data in Fig.7 in order to evaluate the efficiency of SPIONS to act as a contrast agent. Concerning longitudinal relaxation, the relaxivity r_1 is 17 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$, 12 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ and 18 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ for NPs_{ww}, NPs_{wp} and NPs_{pp} respectively. The relaxivity of NPs_{wp} is slightly lower than equivalent relaxivities of NPs_{ww} and NPs_{pp}. However, for the transverse relaxivity r_2, which is known to be the relevant parameter for superparamagnetic iron oxide nanoparticles used as negative contrast agent [8,9], NPs_{wp} has a higher value than the others. Indeed, the values are 69 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$, 44 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ and 51 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ for NPs_{wp}, NPs_{ww} and NPs_{pp} respectively. Compared to a commercial contrast agent (Endorem®), these values of transverse relaxivity are lower (for Endorem®, r_1 is between 10 to 24 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ and r_2 is between 100 to 158 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ [44–46]) but the ratio between r_2 and r_1 is similar. This ratio is a good indicator to determine if a contrast agent is a good candidate for MRI: if this ratio is higher to 2, NPs will be good candidate for MRI [47]. For the Endorem®, the ratio is between 4 and 15 according to the different authors. This ratio is equal to 2.6, 5.8 and 2.8 for NPs_{ww}, NPs_{wp} and NPs_{pp} respectively: all samples can be good candidates for MRI, particularly NPs_{wp} with a ratio of 5.8 similar to Endorem®.

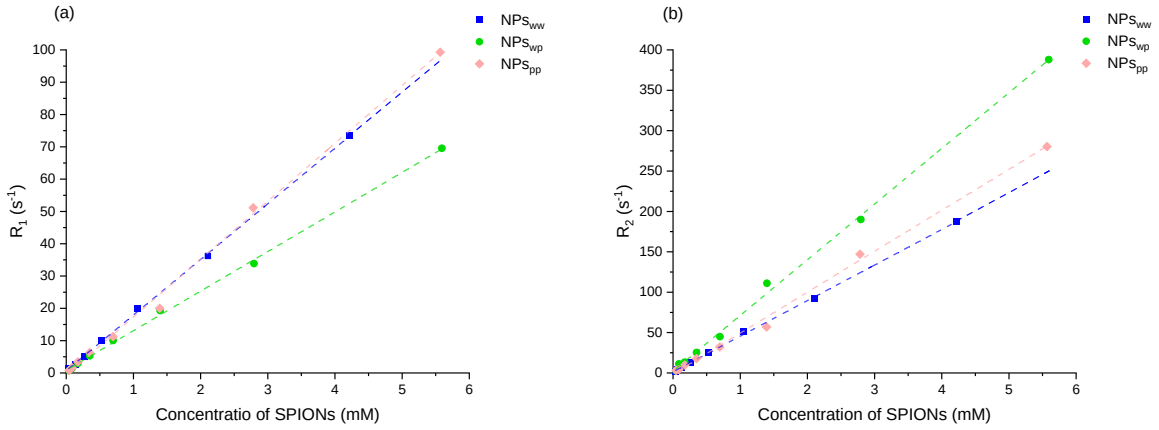


Fig 7: Longitudinal R_1 (a) and transverse R_2 (b) relaxation rate (in s^{-1}) as a function of SPIONs concentration (mM) at 60 MHz and 37°C for NPs_{ww} (blue), NPs_{wp} (green) and NPs_{pp} (pink). Dashed lines represent the linear regression done for evaluating the relaxivity $r_{i=1;2}$.

Conclusion

In summary, thanks to the microwave synthesis, superparamagnetic iron oxide nanoparticles can be synthesised with a small diameter, a good monodispersity and stability in an aqueous solution. These nanoparticles can be used for the biomedical applications with a dispersion in ultra-pure water and in physiological conditions. In this work, for the first time, this synthesis method of SPIONs is performed in ultra-pure water with a validate redispersion in physiological serum (containing 0.9g of NaCl per 100 mL of ultra-pure water) and a direct synthesis in physiological serum is also realised. The nanoparticles obtained by these different conditions offer a small diameter and a colloidal stability thanks to the microwave use and the introduction of an organic layer (a citrate layer) as surfactant during an one-step synthesis. In addition, the inorganic core is a sub-stoichiometric iron oxide ($Fe_{3-\delta}O_4$) with a good crystallinity and a superparamagnetic state at room temperature. Finally, relaxivity measurements are carried out to conclude that these SPIONs are good candidates for MRI. In particular for the SPIONs synthesised in ultra-pure water and redispersed in physiological serum, the ratio of relaxivity (r_2/r_1) is similar to a ratio from a commercial contrast agent (Endorem®).

Acknowledgments: We would like to acknowledge the 3M, X-Gamma, Optic Lasers and Magnetism Competence Centers of Institute Jean Lamour for assistance in TEM,
This work was supported by the « SONOMA» project co-funded by FEDER-FSE Lorraine et Massif des Vosges 2014-2020, a European Union Program.
The authors would like to thank the ORION program for its contribution to the funding of LVC's research internship. This work has benefited from a government grant managed by the Agence Nationale de la Recherche with the reference ANR-20-SFRI-0009.

Reference

1. J. Peng, W. Zhang, L. Chen, T. Wu, M. Zheng, H. Dong, H. Hu, Y. Xiao, Y. Liu, Y. Liang, *Chemical Engineering Journal*, 404 (2021) 126461–126468.
2. R. Ortega-Villar, L. Lizárraga-Mendiola, C. Coronel-Olivares, L.D. López-León, C.A. Bigurra-Alzati, G.A. Vázquez-Rodríguez, *Journal of Environmental Management*, 242 (2019) 487–495.
3. K. Niemirowicz, K. Markiewicz, A. Wilczewska, H. Car, *Advances in Medical Sciences*, 57 (2012) 196–207.
4. S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, *J. Mater. Chem.*, 14 (2004) 2161–2175.
5. L.L. Israel, A. Galstyan, E. Holler, J.Y. Ljubimova, *Journal of Controlled Release*, 320 (2020) 45–62.
6. G. Wang, X. Zhang, A. Skallberg, Y. Liu, Z. Hu, X. Mei, K. Uvdal, *Nanoscale*, 6 (2014) 2953–2163.
7. R. Kumar, M. Nayak, G.C. Sahoo, K. Pandey, M.C. Sarkar, Y. Ansari, V.N.R. Das, R.K. Topno, Bhawna, M. Madhukar, P. Das, *Journal of Infection and Chemotherapy*, 25 (2019) 325–329.
8. M.-A. Fortin, C.S.S.R. Kumar (Ed.), Magnetic Characterization Techniques for Nanomaterials, Springer Berlin Heidelberg, (2017) Berlin, Heidelberg, 511–555.
9. J. Ward, *Radiography*, 13 (2007) e54–e72.
10. F. Reyes-Ortega, Á. Delgado, G. Iglesias, *Nanomaterials*, 11 (2021) 627–639.
11. Z.E. Gahrouei, M. Imani, M. Soltani, A. Shafyei, *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.*, 11 (2020) 025001–025008.
12. F. Soetaert, P. Korangath, D. Serantes, S. Fiering, R. Ivkov, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 163–164 (2020) 65–83.
13. S. Tong, H. Zhu, G. Bao, *Materials Today*, 31 (2019) 86–99.
14. J. Gouyau, R.E. Duval, A. Boudier, E. Lamouroux, *IJMS*, 22 (2021) 1905–1918.
15. W. Xiaoming, G. Shiwei, L. Zhiqian, X. Xueyang, G. Lei, L. Qiang, Z. Hu, G. Qiyong, L. Kui, *Applied Materials Today*, 17 (2019) 92–103.
16. R. Gramiak, PM. Shah, *Invest Radiol* (1968) 356–366.
17. T.J. Clough, L. Jiang, K.-L. Wong, N.J. Long, *Nat Commun*, 10 (2019) 1420–1433.
18. V.F. Cardoso, A. Francesko, C. Ribeiro, M. Bañobre-López, P. Martins, S. Lanceros-Mendez, *Advanced Healthcare Materials*, 7 (2018) 1700845.
19. A. Espinosa, R. Di Corato, J. Kolosnjaj-Tabi, P. Flaud, T. Pellegrino, C. Wilhelm, *ACS Nano*, 10 (2016) 2436–2446.
20. X. Batlle, C. Moya, M. Escoda-Torroella, Ò. Iglesias, A.F. Rodríguez, A. Labarta, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 543 (2022) 168594.
21. E. Taboada, E. Rodríguez, A. Roig, J. Oró, A. Roch, R.N. Muller, *Langmuir*, 23 (2007) 4583–4588.
22. P. Arévalo, J. Isasi, A.C. Caballero, J.F. Marco, F. Martín-Hernández, *Ceramics International*, 43 (2017) 10333–10340.
23. S. Slimani, C. Meneghini, M. Abdolrahimi, A. Talone, J.P.M. Murillo, G. Barucca, N. Yaacoub, P. Imperatori, E. Illés, M. Smari, E. Dhahri, D. Peddis, *Applied Sciences*, 11 (2021) 5433–5435.
24. K. Petcharoen, A. Sirivat, *Materials Science and Engineering: B*, 177 (2012) 421–427.
25. O.A. Abu-Noqta, A.A. Aziz, A.I. Usman, *Materials Today: Proceedings*, 17 (2019) 1072–1077.
26. S. Nigam, K.C. Barick, D. Bahadur, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323 (2011) 237–243.
27. T. Girardet, A. Cherraj, A. Pinzano, C. Henrionnet, F. Cleymand, S. Fleutot, *Pure and Applied Chemistry*, 93 (2021) 1265–1273.

28. C. Tao, Y. Chen, D. Wang, Y. Cai, Q. Zheng, L. An, J. Lin, Q. Tian, S. Yang, *Nanomaterials*, 9 (2019) 699–711.
29. Ika.O. Wulandari, H. Sulistyarti, A. Safitri, D.J.D.H. Santjojo, A. Sabarudin, *J App Pharm Sci*, 9 (2019) 1–11.
30. M. Anbarasu, M. Anandan, E. Chinnasamy, V. Gopinath, K. Balamurugan, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135 (2015) 536–539.
31. H. Kahil, A. Faramawy, H. El-Sayed, A. Abdel-Sattar, *Crystals*, 11 (2021) 1153–1168.
32. T. Lu, J. Wang, J. Yin, A. Wang, X. Wang, T. Zhang, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436 (2013) 675–683.
33. A.G. Roca, L. Gutiérrez, H. Gavilán, M.E. Fortes Brollo, S. Veintemillas-Verdaguer, M. del P. Morales, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138 (2019) 68–104.
34. X. Guo, W. Wang, Y. Yang, Q. Tian, *CrystEngComm*, 18 (2016) 9033–9041.
35. O. Bixner, A. Lassenberger, D. Baurecht, E. Reimhult, *Langmuir*, 31 (2015) 9198–9204.
36. F. Crippa, L. Rodriguez-Lorenzo, X. Hua, B. Goris, S. Bals, J.S. Garitaonandia, S. Balog, D. Burnand, A.M. Hirt, L. Haeni, M. Lattuada, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2 (2019) 4462–4470.
37. E. Aivazoglou, E. Metaxa, E. Hristoforou, *AIP Advances*, 8 (2018) 048201–048214.
38. I. Fernández-Barahona, M. Muñoz-Hernando, F. Herranz, *Molecules*, 24 (2019) 1224–1258.
39. Y.-J. Liang, Y. Zhang, Z. Guo, J. Xie, T. Bai, J. Zou, N. Gu, *Chem. Eur. J.*, 22 (2016) 11807–11815.
40. P. Venturini, S. Fleutot, F. Cleymand, T. Hauet, J. Dupin, J. Ghanbaja, H. Martinez, J. Robin, V. Lapinte, *ChemistrySelect*, 3 (2018) 11898–11901.
41. M.D. Abràmoff, P.J. Magalhães, S.J. Ram, *Biophotonics International*, 36-32, 2004.
42. M. Hanesch, *Geophysical Journal International*, 177 (2009) 941–948.
43. I.J. Bruvera, P. Mendoza Zélis, M. Pilar Calatayud, G.F. Goya, F.H. Sánchez, *Journal of Applied Physics*, 118 (2015) 184304–184310.
44. N. Ohannesian, C.T. De Leo, K.S. Martirosyan, *Materials Today: Proceedings*, 13 (2019) 397–403.
45. M. Geppert, M. Himly, *Front. Immunol.*, 12 (2021) 688927–688934.
46. A.M. Predescu, E. Matei, A.C. Berbecaru, C. Pantilimon, C. Drăgan, R. Vidu, C. Predescu, V. Kuncser, *R. Soc. Open Sci.*, 5 (2018) 171525–171535.
47. Y. Gossuin, P. Gillis, A. Hocq, Q.L. Vuong, A. Roch, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 1 (2009) 299–310.

Chapitre 6

Applications en IRM : cytotoxicité et mesure de relaxivité

Table des matières Chapitre 6

1. Etude biologique des nanoparticules d'oxyde de fer _____ 261

1.1. Etude de l'internalisation cellulaire _____ 261

1.1.1. Préparation des cellules _____ 261

1.1.2. Ensemencement des cellules _____ 262

1.1.3. Coloration de Perls _____ 262

1.1.4. Etude microscopique de l'internalisation cellulaire des nanoparticules _____ 263

1.2. Etude de l'activité mitochondriale _____ 263

1.2.1. Tests MTT _____ 264

1.2.2. Tests LDH _____ 265

1.2.2.1. Préparation et réactions lors des tests LDH _____ 265

1.2.2.2. Analyse des tests LDH _____ 266

2. Etude IRM des nanoparticules d'oxyde de fer _____ 267

2.1. Etude de la relaxivité et images IRM _____ 267

2.2. Etude des profils NMRD _____ 269

3. Conclusion générale du Chapitre 6 _____ 271

4. Bibliographie Chapitre 6 _____ 272

Pour une utilisation en tant qu'agent de contraste pour l'IRM, après avoir évalué les effets d'une stérilisation par autoclave et l'influence du sérum physiologique sur des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées par voie micro-ondes, il convient de déterminer l'internalisation cellulaire de celles-ci ainsi que leur toxicité en procédant à des tests d'activité mitochondriale. Des mesures de relaxométrie et des mesures de relaxivité en fonction de la fréquence de résonance du proton (profil NMRD pour Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) ont été opérées afin de s'assurer de l'efficacité potentielle des nanoparticules synthétisées comme agents de contraste pour l'IRM et afin de déterminer les champs magnétiques optimums d'utilisation.

1. Etude biologique des nanoparticules d'oxyde de fer

Pour tous les tests biologiques et d'IRM reportés ici, trois échantillons aux propriétés physico-chimiques et magnétiques caractérisées dans les chapitres précédents et rappelées dans la publication figurant à la fin de ce dernier chapitre ont été sélectionnés. Il s'agit de l'échantillon de référence décrit dans le chapitre 2 (NPs_{MW}@Cit) et de deux échantillons provenant du plan d'expérience du chapitre 3 ($S3_{1A}$ et $S8_{1A}$). Pour des raisons de simplicité de comparaison des échantillons, de compréhension et d'homogénéité de notation avec la publication jointe, ces trois échantillons ont été renommés SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 et SPIONs_CA3 respectivement dans la suite de ce manuscrit.

Comme présenté dans le chapitre précédent, les trois échantillons de nanoparticules d'oxyde de fer ont été stérilisés par autoclave à 120°C pendant 30min afin de détruire tous les micro-organismes présents. Les trois solutions ont ensuite été diluées à huit concentrations massiques différentes de nanoparticules (en µg de nanoparticules par mL). Les différentes concentrations sont 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL et 1600 µg/mL. Ce choix de concentrations a été basé sur la littérature afin de pouvoir comparer les résultats avec d'autres auteurs [1,2].

1.1. Etude de l'internalisation cellulaire

1.1.1. Préparation des cellules

Les cellules sélectionnées pour les différents tests biologiques présentés dans ce manuscrit sont des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) : ces cellules sont très utilisées pour des tests biologiques car elles peuvent se différencier en n'importe quel type de cellules. Les CSMs utilisées pour nos études proviennent de cellules osseuses du col du fémur de patients anonymes qui subissent un remplacement total de la hanche par une prothèse (Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique du CHU de Nancy). Les cellules sont déposées dans un milieu de culture puis centrifugées pendant 5min à 1500 tours/min, puis le culot est remis dans un milieu de culture. Le milieu de culture est un milieu DMEM 1g/L de glucose (31885, Invitrogen) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma), 1 ng/mL de bFGF (R&D, France). Les cellules sont ensuite ensemencées dans des flasques de 75 cm^2 (cela correspond à $3{,}75.10^6$ cellules par flasque) et ces flasques sont placées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO_2. Le milieu est changé au bout de 48h afin d'éliminer les cellules

hématopoïétiques. Ce milieu est remplacé deux à trois fois par semaine afin de permettre le développement correct des cellules.

1.1.2. Ensemencement des cellules

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont ensemencées dans des plaques de 24 puits pouvant contenir jusqu'à 2500 cellules par puits. Ensuite, les nanoparticules d'oxyde de fer aux différentes concentrations sont ajoutées dans les différents puits. Une série de puits n'est pas mise en contact avec les nanoparticules afin d'avoir un témoin de l'évolution des cellules. Dans le but d'améliorer l'internalisation des nanoparticules dans les cellules, un ajout de Poly-L-Lysine (PLL) peut être effectué. En effet, la PLL est un agent de transfection qui va faciliter l'endocytose (mécanisme de transport de molécules ou de particules vers la cellule). Dans notre étude, l'ajout de PLL n'a pas été effectué afin d'observer l'internalisation non facilitée des nanoparticules vers les cellules.

Les nanoparticules restent en contact avec les cellules pendant 72h. A l'issue de cette durée, les cellules sont lavées trois fois avec une solution de PBS (tampon phosphate salin) puis sont placées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO_2 dans leur milieu de culture.

Afin de fixer les cellules, une solution de paraformaldéhyde à 4% est mélangée aux cellules pendant 15min. Un lavage au PBS et à l'eau ultra-pure est alors appliqué afin d'éliminer le paraformaldéhyde. Les cellules sont ensuite conservées à 4°C jusqu'à la réalisation de la coloration pour visualiser les nanoparticules.

1.1.3. Coloration de Perls

Afin de visualiser les nanoparticules d'oxyde de fer au sein des cellules, une coloration est réalisée. Cette coloration, nommée coloration de Perls, s'effectue en milieu acide en ajoutant de l'hexacyanoferrate II de potassium ($K_4Fe^{II}(CN)_6$) afin de former un précipité de formule $Fe_4^{III}[Fe^{II}(CN)_6]_3$ (ferrocyanure ferrique, appelé bleu de Prusse). Ce précipité de coloration bleue permet de visualiser directement les nanoparticules.

Quinze minutes après l'ajout de l'hexacyanoferrate II de potassium sur les cellules, les cellules sont lavées à l'eau pour éliminer l'excédent de $K_4Fe^{II}(CN)_6$. Une contre-coloration des cellules en rose est ensuite réalisée par ajout du Kernechtrot (de formule $C_{14}H_8NNaO_7S$) appliqué pendant 5 minutes. Cela permet de mieux distinguer les cellules qui sont ensuite une nouvelle fois rincées à l'eau puis déshydratées via trois bains successifs dans de l'éthanol absolu (à 99,99%).

Pour visualiser correctement les cellules ainsi que les nanoparticules, une observation au microscope optique est nécessaire. Pour cela, les lamelles contenant les cellules sont retirées du puits. Une résine Eukitt est ajoutée afin de fixer les lamelles sur des lames en verre avant trempage dans un bain de toluène : le bain de toluène va permettre de fondre la résine pour une fixation durable de la lamelle à la lame permettant une observation sans modification pendant des années.

1.1.4. Etude microscopique de l'internalisation cellulaire des nanoparticules

Comme la Figure 6. 1 le montre, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont très facilement visualisables avec cette méthode de coloration au bleu de Prusse. La Figure 6. 1 représente l'internalisation cellulaire de SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 et SPIONs_CA3 (respectivement Figure 6. 1.a, 1.b et 1.c) à une concentration de 400 µg de SPIONs/mL. Nous constatons que, pour les trois échantillons, les nanoparticules s'internalisent bien dans les cellules. Les nanoparticules s'accumulent essentiellement autour des noyaux cellulaires (de couleur rose grâce à la contre-coloration au Kernechtrot). Cependant, pour les trois échantillons, des agrégats apparaissent pouvant entraîner une toxicité pour les cellules : ces agrégats sont visibles à partir d'une concentration de 400 µg/mL sous la forme de tâches bleu foncé (Figure 6. 1). Cette observation est cohérente avec la littérature indiquant que les concentrations non toxiques de nanoparticules se situent entre 1 et 100 µg/mL [3–5].

Le détail de l'évolution de l'internalisation cellulaire en fonction de la concentration en nanoparticules est décrit dans la publication « SPIONs magnetic nanoparticles for MRI applications: microwave synthesis and physicochemical, magnetic and biological characterizations ».

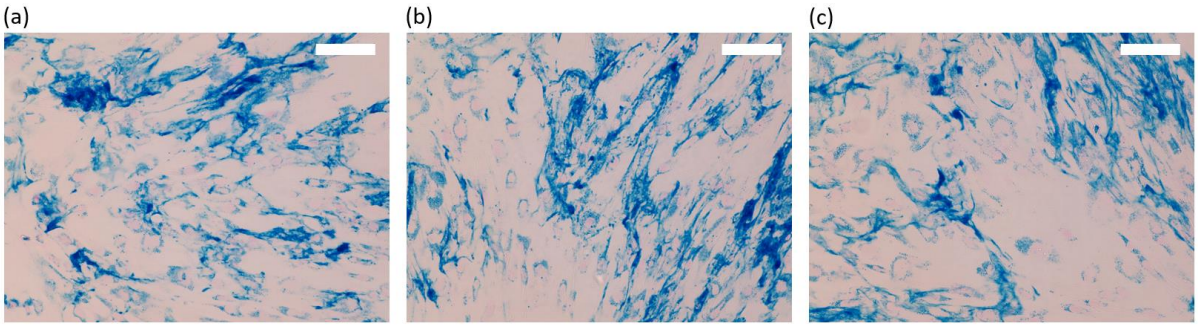


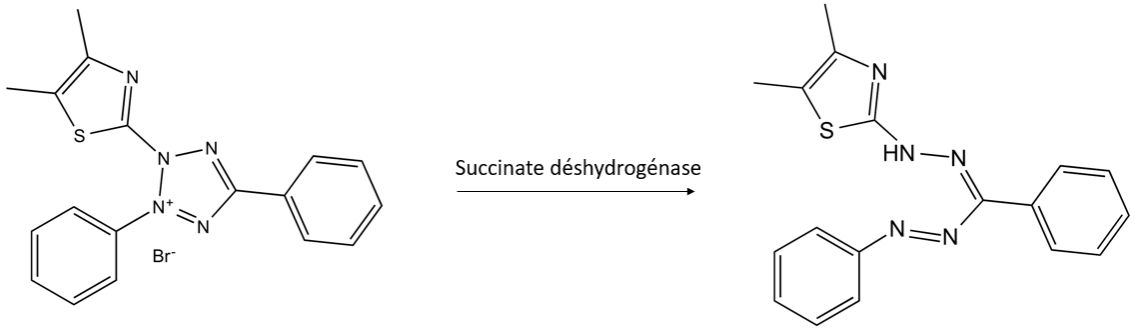
Figure 6. 1 : Images en microscopie optique de SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (b) et SPIONs_CA3 (c) pour les tests d'internalisation cellulaire (échelle = 100 µm) sur des CSMs (concentration en SPIONs de 400µg/mL).

1.2. Etude de l'activité mitochondriale

Afin de vérifier notre hypothèse sur la toxicité des nanoparticules à hautes concentrations sur les cellules, des tests d'activités mitochondriales sont réalisés. En effet, dans la cellule, la mitochondrie est un organite qui permet de générer l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme sous forme d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). Cet organite permet aussi de gérer la régulation du cycle cellulaire et la mort cellulaire programmée (ou apoptose). L'étude de l'activité mitochondriale permet donc de déterminer la toxicité des cellules. Pour cela, il existe différents tests biologiques, notamment les tests MTT et les tests LDH.

1.2.1. Tests MTT

Pour mesurer l'activité mitochondriale, des tests MTT sont réalisés. Une molécule, le MTT (Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrasolium), est ajoutée dans le milieu de culture contenant les cellules. En contact avec la succinate déshydrogénase (enzyme mitochondriale), le MTT forme des cristaux de « bleu de Formazan » (Figure 6. 2). Pour déterminer cette activité mitochondriale, un spectrophotomètre est utilisé pour mesurer l'activité de ces cristaux de bleu de Formazan : plus l'activité de ces cristaux est élevée et plus l'activité mitochondriale est importante.



Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrasolium **(MTT)**

(E,Z)-5-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-1,3-diphénylformazan **(Formazan)**

Figure 6. 2 : Réaction du MTT avec de la succinate déshydrogénase pour former du Formazan.

Si l'activité mitochondriale augmente, plusieurs hypothèses peuvent être formulées : soit il y a une augmentation de la prolifération cellulaire (c'est-à-dire du nombre de cellules), soit il y a une augmentation de l'activité cellulaire (par exemple, une différenciation des CSMs en cellules hématopoïétiques). Si l'activité mitochondriale diminue, cela signifie que soit la prolifération cellulaire diminue car le milieu n'est pas un environnement favorable pour les cellules, soit l'activité cellulaire diminue (ce qui va engendrer une mort des cellules) ou soit la mortalité des cellules augmente (montrant ainsi un effet cytotoxique des nanoparticules).

Pour réaliser les tests MTT, les nanoparticules ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits (5000 cellules par puits) avec des concentrations similaires à celles utilisées pour l'internalisation cellulaire. Plusieurs durées ont été réalisées afin d'observer cette activité mitochondriale au cours du temps : les durées choisies sont 24h, 48h et 72h après 24h d'ensemencement. Après cette durée, 25 µL de MTT ont été ajoutés à 100 µL de milieu complet dans chaque puits. La plaque a ensuite été incubée à 37°C avec 5% de CO_2 pendant 4 heures. Le surnageant a été éliminé afin de lyser les cellules avec 100 µL de SDS-DMF (80 g de sodium dodecyl sulfate, 200 mL de dimethylformamide, 200 mL d'H_2O, pH 4,7) pendant 24 heures à 37°C et avec 5% de CO_2.

Pour mesurer concrètement l'activité mitochondriale, l'absorbance a été mesurée à 580 nm grâce à un spectrophotomètre (Multiskan Ex, ThermoLabsystems).

Pour les trois échantillons (SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 et SPIONs_CA3), l'activité mitochondriale augmente de façon similaire au témoin : cette augmentation est donc due à la prolifération cellulaire. Cependant, à fortes concentrations (c'est-à-dire à 800 et 1600 µg/mL), l'activité diminue pour SPIONs_CA1 et SPIONs_CA2, sûrement en raison d'une mortalité des cellules. Pour SPIONs_CA3, l'évaluation de l'activité mitochondriale à ces concentrations est un peu biaisée du fait de la viscosité du milieu : il a été difficile de lyser le surnageant et un large dépôt est resté, augmentant ainsi l'absorbance.

Tout le détail des tests d'activité mitochondriale figure dans la publication « SPIONs magnetic nanoparticles for MRI applications: microwave synthesis and physicochemical, magnetic and biological characterizations » à la fin de ce chapitre.

Ces tests MTT permettent d'évaluer l'évolution de l'activité mitochondriale mais ne permettent pas de conclure sur la mort cellulaire et donc sur une toxicité des nanoparticules. En complément, des tests LDH sont par conséquent réalisés.

1.2.2. Tests LDH

Les tests LDH (pour Lactate Déshydrogénase) permettent de mesurer l'intégrité membranaire. En effet, lors de l'apoptose (mort cellulaire), le contenu de la cellule se déverse dans le milieu de culture après rupture de la membrane. Différentes molécules vont alors se trouver dans le cytoplasme, notamment le LDH. La quantité de LDH relarguée par la cellule dans le milieu de culture est proportionnelle à la mort cellulaire : ce test permet donc d'estimer la toxicité des nanoparticules.

1.2.2.1. Préparation et réactions lors des tests LDH

Pour réaliser ces tests, les nanoparticules sont ensemencées dans des plaques de 96 puits avec les mêmes concentrations que pour les précédents tests. Puis, après une période d'incubation (de 24h, 48h et 72h), 10 µL de surnageant sont ajoutés à 100 µL de solution contenant du lactate de sodium (substrat de l'enzyme), du sel de tétrazolium, de la diaphorase/NAD^+ (qui joue le rôle de catalyseur de la réaction). Le lactate, en présence du LDH, devient du pyruvate (Figure 6. 3). Lors de cette réaction, un proton est libéré par le lactate et est capté par NAD^+ pour devenir du NADH. Le NADH va alors réagir avec le sel de tétrazolium (de couleur jaune) pour former du formazan (de couleur rouge). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la réaction est arrêtée par l'ajout de 50 µL d'acide chlorhydrique (1M). L'absorbance de chaque puits est alors mesurée au spectrophotomètre à 490 nm.

Pour comparer les résultats correctement, un témoin positif, noté T^+, et un témoin négatif, noté T^-, ont été réalisés. Le témoin positif contient du triton X-100 à 2% (détergeant permettant de perméabiliser les membranes cellulaires) : la cellule est lysée intégralement et énormément de LDH est déversé dans le milieu cellulaire. La couleur finale est rouge vif. Quant au témoin négatif, il contient du rouge de phénol permettant ainsi d'avoir un blanc après l'incubation. Le pourcentage de mort cellulaire est égal

au rapport de la différence entre l'absorbance mesurée au spectrophotomètre et l'absorbance de T^- sur la différence entre l'absorbance de T^+ et l'absorbance de T^-. Pour chaque concentration et chaque durée, trois essais ont été réalisés : la moyenne des trois essais ainsi que son erreur standard sont présentées sur la Figure 6. 4.

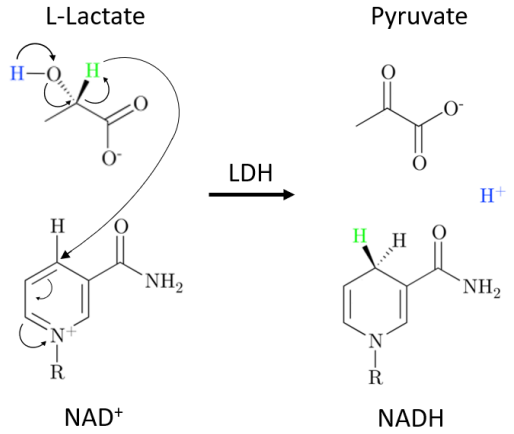


Figure 6. 3 : Réaction du lactate avec le NAD⁺ en présence de LDH (Lactate DésHydrogénase) pour former du pyruvate.

1.2.2.2. Analyse des tests LDH

Les différents résultats de toxicité des nanoparticules sur les cellules sont présentés en Figure 6. 4. Pour les trois échantillons, le pourcentage de toxicité ne suit pas des variations significativement différentes quelle que soit la concentration en comparaison avec la valeur témoin (en noir sur les différents graphiques). Cela indique que les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques synthétisées n'engendrent pas une forte toxicité envers les CSMs, excepté pour l'échantillon SPIONs_CA1 à une concentration de 1600 µg/mL à 48h et à 72h comme le montre la Figure 6. 4.a. Ce résultat pour l'échantillon SPIONs_CA1 confirme ceux obtenus lors des tests MTT indiquant que les fortes concentrations de nanoparticules diminuent l'activité mitochondriale.

Pour toutes les autres valeurs de concentrations des trois échantillons et pour toute durée d'incubation, le pourcentage de toxicité n'excède pas les 10% : les nanoparticules synthétisées peuvent donc être utilisées dans le domaine biomédical, notamment en tant qu'agent de contraste pour des mesures IRM. Pour cette application, la dernière étape est de déterminer la relaxivité des nanoparticules synthétisées et de comparer les valeurs obtenues avec la relaxivité d'un agent de contraste commercial : l'Endorem®.

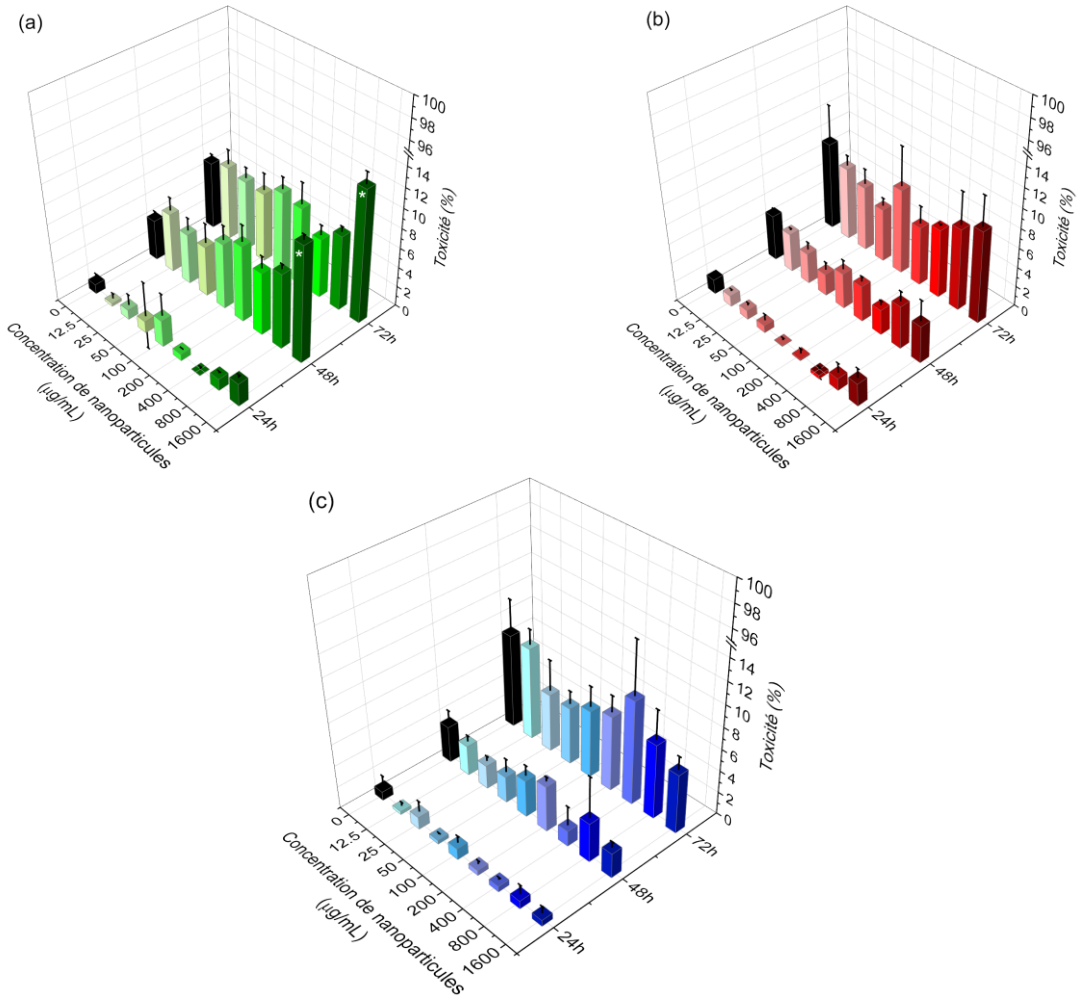


Figure 6. 4 : Graphiques représentant les résultats de toxicité des tests LDH pour SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (b) et SPIONs_CA3 (c) en fonction de la concentration en nanoparticules et en fonction du temps (24h, 48h et 72h).

2. Etude IRM des nanoparticules d'oxyde de fer

2.1. Etude de la relaxivité et images IRM

Les trois échantillons de nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées aux micro-ondes présentant peu de toxicité envers les cellules, une étude de la relaxivité peut être envisagée. Ces mesures de relaxivité vont permettre de quantifier l'efficacité des agents de contraste sur la relaxation des protons de l'eau. Comme cela a été expliqué dans le chapitre 1 (paragraphe 8.3.2), il existe deux relaxivités : la relaxivité longitudinale r_1 et la relaxivité transverse r_2. Pour déterminer ces valeurs de relaxivités, les mêmes concentrations que celles utilisées lors des tests biologiques sont considérées. Les valeurs de relaxivité sont obtenues par régression linéaire de la droite représentant l'évolution de la vitesse de relaxation en fonction de la concentration en nanoparticules.

Grâce à la détermination de ces valeurs de relaxivités, nos échantillons de nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être comparés à des agents de contraste utilisés dans des mesures IRM. L'agent de contraste qui a été le plus utilisé en Europe est l'Endorem® pour des organes spécifiques [6]. Il s'agissait de l'un des meilleurs agents de contraste négatif sur le marché.

Pour les trois échantillons, les valeurs de relaxivités transverse r_2 sont élevées et similaires à celles de l'Endorem®, notamment pour l'échantillon SPIONs_CA3 dont la relaxivité est de 158 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ à 60 MHz soit 1,4T (La valeur de r_2 de l'Endorem® varie de 100 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ à 158 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ d'après la littérature [7,8].).

Le détail des mesures de relaxivités des différents échantillons à différents champs magnétiques est présenté dans la publication « SPIONs magnetic nanoparticles for MRI applications: microwave synthesis and physicochemical, magnetic and biological characterizations » à la fin de ce chapitre.

Les images obtenues par IRM permettent également de visualiser l'évolution de la relaxation transverse des trois échantillons en fonction de la concentration en nanoparticules. Les images présentées sur la Figure 6. 5 ont été obtenues à un champ magnétique de 2,34 Tesla et avec un contraste-T_2 (Bruker Biospec Avance 24/40, séquence d'écho de spin avec 5s de temps de répétition et 50ms de temps d'écho).

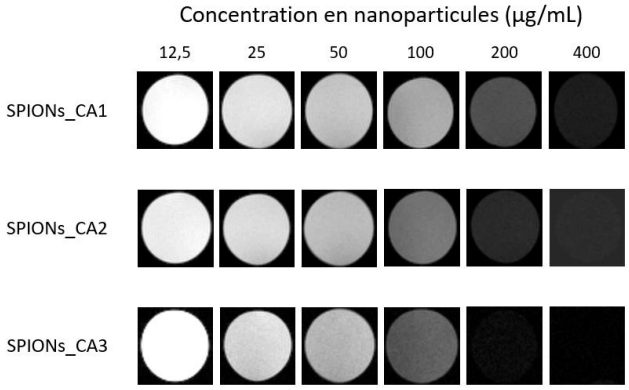


Figure 6. 5 : Images IRM de SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 et SPIONs_CA3 en fonction de la concentration en nanoparticules. Les images contrastées en T_2 ont été obtenues à un champ de 2,34 Tesla.

La relaxation transverse des protons de l'eau augmente quand la concentration des nanoparticules augmente. L'effet sur le signal des images IRM est clairement visible sur la Figure 6. 5 : plus l'échantillon est concentré, plus le signal diminue, jusqu'à une disparition complète à des fortes concentrations. Au-delà des concentrations supérieures à 400 µg/mL, le signal a complètement disparu avec le temps d'écho utilisé et les images IRM ne sont donc plus exploitables : les concentrations de nanoparticules à utiliser en tant qu'agent de contraste doivent donc être comprises entre 25 µg/mL et 100 µg/mL.

Pour évaluer la relaxivité en fonction du champ magnétique, des profils NMRD ont ensuite été réalisés sur nos échantillons.

2.2. Etude des profils NMRD

Actuellement, les champs magnétiques les plus utilisés pour réaliser des images IRM sont en moyenne de 1,5 Tesla (63,8MHz en fréquence de résonance du proton) mais, de plus en plus d'appareils présentent des champs magnétiques plus élevés afin d'augmenter la sensibilité de la mesure. Cependant, quand le champ magnétique augmente, les valeurs de relaxivités longitudinales et transverses des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont modifiées. Comme visible sur la Figure 6. 6 publiée par le groupe de l'Université de Mons en Belgique [9], les profils NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) montrent que la relaxivité r_2 présente un maximum puis diminue vers un plateau à haut champ, alors que la relaxivité r_1 chute drastiquement après sa valeur maximum, c'est-à-dire à plus haut champ. Il y a donc un intérêt à développer les agents de contraste négatifs qui agissent par leur T_2, notamment les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques.

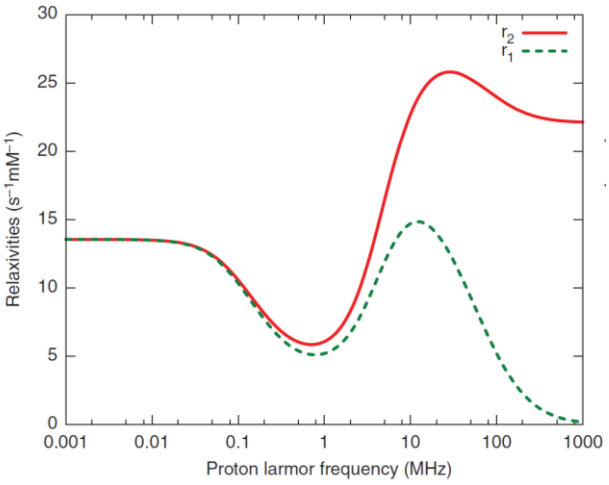


Figure 6. 6 : Profils NMRD théoriques décrits par Gossuin et al. [9].

Les profils NMRD de nos échantillons de nanoparticules ont été mesurés entre 10kHz et 60MHz (fréquence de résonance du proton) et sont représentés sur Figure 6. 7. Ils représentent l'évolution de la relaxivité longitudinale des échantillons en fonction de la fréquence du proton, et donc de manière équivalente du champ magnétique.

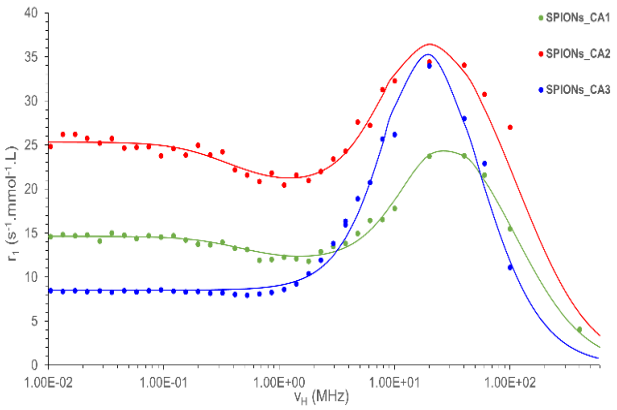


Figure 6. 7 : Profils NMRD (relaxivité longitudinale r_1) pour les échantillons SPIONs_CA1 (vert), SPIONs_CA2 (rouge) et SPIONs_CA3 (bleu).

Les profils de 10kHz à 10MHz ont été obtenus par la technique du champ cyclé qui consiste à mesurer les vitesses de relaxation longitudinale en faisant cycler rapidement le champ magnétique statique, et non en utilisant des impulsions radiofréquences (RF) comme décrit au chapitre 1. Ceci permet de remédier au problème de sensibilité inhérent aux bas champs. Il n'est pas possible de mesurer des vitesses de relaxation transverse par la même technique en raison du nombre important d'impulsions RF nécessaire (cf chapitre 1), c'est pourquoi seuls les profils r_1 sont présentés ici alors que nous nous intéressons à des agents de contraste négatifs. Cependant ces profils restent riches d'informations car ils permettent de visualiser la gamme de champ magnétique optimum pour avoir une relaxivité (longitudinale ou transverse) maximum. Comme visible sur la Figure 6. 7, tous nos échantillons présentent une très bonne relaxivité dans la gamme 10-60MHz, soit 0,2-1,5T.

D'autre part, la compréhension des mécanismes de relaxation régissant ces courbes NMRD devrait permettre à terme de pouvoir prédire le comportement des nanoparticules d'oxydes de fer en tant qu'agent de contraste, aussi bien pour leur effet T_1 que pour leur effet T_2. Les profils NMRD de nos échantillons ont ici été ajustés avec les équations des sphères externes et internes développées par Roch et al [10]. Pour les trois échantillons, aux basses fréquences de résonance du ^1H, un plateau est présent et est dépendant de l'énergie d'anisotropie, comme dans le modèle théorique. Puis, une augmentation de la relaxivité longitudinale apparaît à des fréquences aux alentours de 10 MHz : le maximum permet de déterminer l'aimantation à saturation des échantillons (valeur pouvant être comparée avec les résultats obtenues des cycles d'aimantation). Enfin, la relaxivité longitudinale diminue quand la fréquence en proton augmente. Le point d'inflexion correspondant permet de remonter à la valeur du diamètre hydrodynamique, qui peut également être déterminé et comparé avec des mesures obtenues en DLS.

Ces différents profils sont décrits dans la publication « SPIONs magnetic nanoparticles for MRI applications: microwave synthesis and physicochemical, magnetic and biological characterizations » à la fin de ce chapitre.

3. Conclusion générale du Chapitre 6

Dans ce chapitre, différents tests biologiques ont été mis en œuvre afin de déterminer la toxicité potentielle des nanoparticules. La première étape consiste à déterminer si les nanoparticules s'internalisent dans les cellules et si elles vont jusqu'au noyau cellulaire. Afin de visualiser cette internalisation, une coloration des nanoparticules grâce à l'ajout d'hexacyanoferrate de potassium pour former du bleu de Prusse est réalisée : les nanoparticules prennent une couleur bleue et sont donc plus facilement visualisables. Trois échantillons provenant des essais de références et du plan d'expériences décrits dans les chapitres 2 et 3 ont été sélectionnés. Pour ces trois échantillons, les nanoparticules s'internalisent de manière facilitée, sans aide de molécules favorisant l'endocytose comme le PLL (Poly-L-Lysine) dans les cellules. Il n'y a pas ou peu de dénaturation de l'ADN observable due à l'internalisation des nanoparticules au niveau des noyaux.

Cependant, cette technique ne permet pas de quantifier réellement la toxicité des nanoparticules sur les cellules. Une méthode est de déterminer l'activité mitochondriale des cellules via des tests MTT. En effet, la mitochondrie est un organite dans les cellules qui permet de contrôler la synthèse de l'énergie sous forme d'ATP et de contrôler la mort cellulaire (apoptose). Ainsi, en incubant des nanoparticules d'oxyde de fer avec des cellules, l'activité mitochondriale varie. Si cette activité diminue, une toxicité des nanoparticules peut être envisagée. Si l'activité augmente, les cellules prolifèrent montrant ainsi que les nanoparticules n'engendrent pas de toxicité. Pour nos échantillons, l'activité mitochondriale augmente au cours du temps. Cependant, à des fortes concentrations de nanoparticules, une diminution de cette activité est observée pouvant traduire une toxicité.

Pour confirmer ces résultats, des tests LDH sont réalisés. Ces tests vont quantifier le LDH (ou lactate déshydrogénase) dont la quantité est proportionnelle à la mort cellulaire. Pour les trois échantillons sélectionnés, la toxicité est faible (moins de 10% de mort cellulaire) et suit l'évolution d'un témoin : les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées au micro-ondes n'engendrent donc pas de toxicité cellulaire.

Les résultats de ces tests biologiques permettent de conclure que les nanoparticules pour les relaxivités longitudinale et transverse considérées peuvent être utilisées en tant qu'agent de contraste en IRM. En effet, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont des agents de contrastes négatifs : elles permettent donc d'améliorer les images IRM pondérées en T_2. Pour étudier l'efficacité de ces agents de contraste sur la relaxation des protons de l'eau, une comparaison des valeurs de relaxivités entre nos échantillons et un agent de contraste commercial (Endorem®) est réalisée : les échantillons synthétisés possèdent des valeurs de relaxivités transverses du même ordre de grandeur que le produit commercial. Nos échantillons sont donc de bons candidats en tant qu'agent de contraste négatif n'engendrant pas de toxicité.

De plus, en raison de l'augmentation des champs magnétiques des équipements IRM pour améliorer la sensibilité et donc la résolution des images, les agents de contraste négatifs deviennent de plus en plus intéressants. En effet, quand le champ magnétique augmente, les valeurs de relaxivité sont modifiées : la relaxivité longitudinale diminue quand le champ augmente alors que la relaxivité transverse augmente puis stagne. Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont donc de bons candidats pour les examens IRM à haut champ.

4. Bibliographie Chapitre 6

[1] Roeder, E.; Henrionnet, C.; Goebel, J.C.; Gambier, N.; Beuf, O.; Grenier, D.; Chen, B.; Vuissoz, P.-A.; Gillet, P.; Pinzano, A. Dose-Response of Superparamagnetic Iron Oxide Labeling on Mesenchymal Stem Cells Chondrogenic Differentiation: A Multi-Scale In Vitro Study. *PLoS ONE*, **2014**, *9*, e98451.

[2] Arbab, A.S.; Jordan, E.K.; Wilson, L.B.; Yocum, G.T.; Lewis, B.K.; Frank, J.A. In Vivo Trafficking and Targeted Delivery of Magnetically Labeled Stem Cells. *Human gene therapy*, **2004**, *15*, 351–360.

[3] Kostura, L.; Kraitchman, D.L.; Mackay, A.M.; Pittenger, M.F.; Bulte, J.W. Feridex Labeling of Mesenchymal Stem Cells Inhibits Chondrogenesis but Not Adipogenesis or Osteogenesis. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In Vivo*, **2004**, *17*, 513–517.

[4] Reddy, A.M.; Kwak, B.K.; Shim, H.J.; Ahn, C.; Lee, H.S.; Suh, Y.J.; Park, E.S. In Vivo Tracking of Mesenchymal Stem Cells Labeled with a Novel Chitosan-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Using 3.0 T MRI. *Journal of Korean medical science*, **2010**, *25*, 211–219.

[5] Boutry, S.; Brunin, S.; Mahieu, I.; Laurent, S.; Elst, L.V.; Muller, R.N. Magnetic Labeling of Non-phagocytic Adherent Cells with Iron Oxide Nanoparticles: A Comprehensive Study. *Contrast media & molecular imaging*, **2008**, *3*, 223–232.

[6] Qiao, R.; Yang, C.; Gao, M. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: From Preparations to in Vivo MRI Applications. *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, 6274.

[7] Ali, L.M.; Marzola, P.; Nicolato, E.; Fiorini, S.; Heras Guillamón, M. de las; Piñol, R.; Gabilondo, L.; Millán, A.; Palacio, F. Polymer-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as T2 Contrast Agent for MRI and Their Uptake in Liver. *Future Science OA*, **2019**, FSO235.

[8] Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R.N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 2064–2110.

[9] Vuong, Q.L.; Gillis, P.; Roch, A.; Gossuin, Y. Magnetic Resonance Relaxation Induced by Superparamagnetic Particles Used as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging: A Theoretical Review. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, **2017**, *9*..

[10] Roch, A.; Muller, R.N.; Gillis, P. Theory of Proton Relaxation Induced by Superparamagnetic Particles. *The Journal of chemical physics*, **1999**, *110*, 5403–5411.

SPIONs magnetic nanoparticles for MRI applications: microwave synthesis and physicochemical, magnetic and biological characterizations †

Thomas Girardet,[a] Emilie Bianchi,[a] Christel Henrionnet,[b] Astrid Pinzano,[b] Sabine Bouguet-Bonnet,[c] Corentin Boulogne, [c] Sébastien Leclerc,[d] Franck Cleymand [a] and Solenne Fleutot [a]

a Institut Jean Lamour, CNRS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France
b IMoPA, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France
c CRM2, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France
d LEMTA, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France
† Electronic Supplementary Information (ESI) available: XRD, FTIR, TGA, magnetic characterizations and relaxometry at 20 MHz, 40 MHz and 60 MHz, table S1.

Abstract

More and more biomedical applications used nanoparticles to improve their quality and their possibilities. Among the nanoparticles used, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) are often used because these nanoparticles are biocompatible, non-toxic and the ease of synthesizing them. The goal of this study is to obtain highly water-soluble iron oxide nanoparticles thanks a microwave process. The SPIONs developped with this technique have a diameter between 2 nm and 4 nm, are monodisperse and stable in an aqueous media. Indeed, thanks the microwaves, the control of the temperature is more precise and allows so to obtain nanoparticles with a same diameter. After the synthesis, several characterizations are carried out to determine the shape, the size, the chemical composition, the stability and the magnetic properties. Then, these SPIONs can use to control the regeneration of tissues such as cartilage tissue. For that, SPIONs are internlasized in mesenchymal stromal cells (MSCs) because these cells can to differenciate into all humans cells and allows so to regenerate all tissues: these cells are good candidate for tissue engineering. In this work, the internalization of SPIONs and the cytotocixity are studied and confirm the biocompatibility of our SPIONs. Then, for the control of the regeneration of tissues, relaxometry and MRI (Magnetic Resonance Imaging) of SPIONs are realized to compare with the commercial contrast agent present (Endorem®). For our SPIONs, the values of transverse and longitudinal relaxivities are high and in the same order to Endorem®.

Introduction

Magnetic nanoparticles, and especially iron oxide nanoparticles, are used often in biomedical applications such as hyperthermia, drug delivery, contrast agents, etc [1–5]… In function of the size, iron oxide nanoparticles will have different magnetic properties: for a spherical nanoparticle, if the size is higher to 20 nm, nanoparticles will have a ferrimagnetic behaviour[6]. However, if the size is lower than 20 nm, iron oxide nanoparticles will have a superparamagnetic state: this magnetic state is important for the Magnetic Resonance Imaging (MRI). Indeed, they have a superparamagnetic behaviour and a biocompatible nature which makes them good candidates for these applications[7–9]. These

superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) should have several optimum physico-chemical properties for biomedical applications: size and a narrow size distribution, stable in an aqueous solution, good magnetic properties.
To obtain SPIONs with these properties, there exists different synthesis with each advantage and disadvantages. For example, thermal decomposition is a good synthesis to obtain SPIONs with a good crystallinity, a control of the size, the shape and the size distribution[7,10–12]. The disadvantage of this synthesis is the presence of an organic solvent: another step to remove the organic solvent is obligatory for the biomedical applications[13,14].

To overcome this problem, a synthesis directly in water can be done: it's the coprecipitation synthesis. This synthesis is the most used because nanoparticles are easily and quickly obtained[15–17]. To synthesise SPIONs, a mixture of iron salts (generally iron chloride II and iron chloride III) with a base (ammonium hydroxide) is realised[18]. However, the control of the shape, size and the size distribution is very difficult and aggregation phenomena occur [19]. In order to isolate SPIONs, a functionalization step is necessary with organic or/and inorganic shells[20–23].
To control the size, the shape, the size distribution and magnetic properties directly in an aqueous solution, a new synthesis method is more and more used: microwave synthesis[24,25]. Indeed, thanks to microwave irradiations, there is a control of the temperature inside the reactor (the temperature gradient between the walls of the reactor and the interior is minimal) thus allowing a better control of the physico-chemical parameters[26]. In addition, this process allows synthesizing a high quantity of SPIONs with a very good yield in a short time.

This synthesis method coupled to a functionalization by a ligand allows to obtain SPIONs which are stable in an aqueous solution with a good control of the size, the shape and the size distribution.
The goal of these nanoparticles is to use these for the biomedical applications such as MRI. However, before to obtain MRI images, a study of the SPIONs behaviour with cells is important. For this, an internalization of SPIONs in mesenchymal stromal cells (MSC) is carried out. Indeed, these cells provide a large possibility to regenerate damaged tissues in articular diseases thanks to their large differentiation potentialities[27]. With SPIONs inside MSCs, a follow-up of the cartilage regeneration is possible through the MRI.

To increase the quality of images in MRI, contrast agents are increasingly used. Indeed, they allow to decrease the examination time, to quickly and easily distinguish between healthy and diseased tissues and to provide more information on the functioning of the organs[9]. There exist two types of contrast agent: positive contrast agent and negative contrast agent. The positive contrast agents are composed of a paramagnetic center (such as Gd^{3+}, Mn^{2+} [28,29]). They can shorten the longitudinal relaxation time (T_1). In addition, the contrast agent with a Gd^{3+} complex can cause a toxicity if the cation is free on a living organism[30]: the goal with these contrast agents is to chelate the paramagnetic centre or to use another cation such as Mn^{2+}. For the negative contrast agents, they are composed of a superparamagnetic center (iron oxide nanoparticles for example): they can shorten the transverse relaxation time (T_2), which allows a reduction in the intensity of the signal[31,32]. To decrease this transverse relaxation time, several commercial contrast agents, such as Endorem®, Ferumoxides®, were used in clinical MRI. These contrast agents are SPIONs with an inorganic core diameter around 5 nm and a hydrodynamic diameter around 100-150 nm.

The goal of this study is to synthesise SPIONs with the microwave synthesis. After the synthesis, systematic characterizations were realized to determine the shape, the size, the chemical composition, the stability and the magnetic properties. Then, after a sterilisation step, a study of the internalisation of SPIONs in cells as well as a study of the cytotoxicity are carried out to check if these nanoparticles are biocompatible in human cells. Finally, to verify if these nanoparticles have a good signal in MRI and to determine the best conditions to use it, relaxometry measures and MRI images were performed.

Materials and methods

Materials

Ferrous chloride ($FeCl_2.4H_2O$) and ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$) were purchased from Alfa Aesar. Citric acid ($C_6H_8O_7$), absolute ethanol (99%) and ammonium hydroxide solution (NH_4OH) were purchased from Sigma Aldrich. In all experiment, ultrapure water (resistivity = 18.2 MΩ.cm) was used.

Synthesis

A solution of ferrous chloride ($FeCl_2.4H_2O$; 5.03 mmol) and ferric chloride ($FeCl_3.6H_2O$; 3.7 mmol) with citric acid ($C_6H_7O_8$; 3.16 mmol) in 15 mL of ultra-pure water is realized in a Pyrex reactor for the microwave. Then, 5 mL of ammonium hydroxide solution (NH_4OH) is added to precipitate the solution: the solution turns black and it is placed in the microwave reactor. The microwave is a single mode microwave (Monowave 400) from Anton Paar which operates at a frequency of 2.45 GHz and with a maximum power of 850W.
The solution is heating at 96°C for 40 min. The synthesis parameters are optimised by a design experiment. After heating, the solution is collected and washed by centrifugation with different solvents. The first step is a mixture of absolute ethanol and the nanoparticles solution which is centrifuged during 5 min at 10 000 rpm. The last step is another centrifugation during 5 min at 10 000 rpm with a mixture of ultrapure water and absolute ethanol. Finally, SPIONs obtained are dispersed in ultrapure water. A part is evaporated at 60°C in an oven to obtain powder for some characterization techniques. The other part stays in liquid state. For this study, three experiments are presented: one which has the optimised parameters (SPIONs-CA1) and two which come from the design experiment (SPIONs-CA2 and SPIONs-CA3). The difference of the synthesis between SPIONs_CA1 and CA2 is the temperature rape time: 5min for SPIONs_CA2 and 10min for SPIONs_CA1. For SPIONs_CA3, the difference with SPIONs_CA1 is a higher temperature of synthesis (110°C instead of 96°C).

Characterizations techniques

Different techniques are used to control the physico-chemical parameters of SPIONs.

Transmission Electron Microscopy

Transmission Electron Microscopy (TEM) is used to analyse the size, the size distribution and the shape of SPIONs. The TEM is a CM200-FEI operating at 200 kV (point resolution 0.27 nm). After the analysis, the size distribution is calculated using free software ImageJ.

Dynamic Light Scattering

Dynamic Light Scattering (DLS) was performed by the ZETASIZER Nano ZS device from Malvern Instrumental. The solution of SPIONs obtained after the synthesis is diluted to obtain a solution with a concentration of 0.2 mg/mL. Thanks to the DLS measurements, the hydrodynamic diameter and the stability of SPIONs in the solution can be determined. DLS measurements are performed three times and the average of these three measurements will be presented in this study.

X-Ray Diffraction

X-Ray Diffraction (XRD) patterns were recorded in standard conditions with an INEL CPS120 equipped with a monochromatic cobalt radiation (Co Kα = 0.17886 nm) at grazing angle of incidence simultaneously at 120°.

Fourier Transform Infra-Red

Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy (FTIR) was performed with a Nicolet 6700 from Thermo-Fisher between 400 and 4000 cm^{-1}.

Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed on SPIONs powder to determine the quantity of the organic shell and of the iron oxide core. The device used was a SETSYS EV 1750 TGA microbalance from Setaram. Experiments were conducted in the temperature range of 20-600°C under air flow (20 mL/min) at a heating rate of 10°C/min.

Magnetic measurements

A Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) with a Vibrating Sample Magnetometer (VSM) from Quantum Design is used to determine the saturation magnetization (Ms) and the blocking temperature (T_B). The magnetic field which is applied sweeps from +5 T to -5 T and then from -5 T to +5 T.
For the Zero Field Cooled/Field Cooled (ZFC/FC) curves, the sample was cooled to 5K without magnetic field. After, a magnetic field of 0.02 T is applied and the temperature heats from 5K to 300K (ZFC curve). Finally, the sample was cooled down to 5K (FC curve).

Ethics statement, isolation and culture of human bone mesenchymal stromal cells (MSCs)

MSCs were isolated from femoral necks of patients undergoing total hip replacement (all bone samples were received from our local bone bank, UTCT). The MSCs obtained were anonymous when researchers received them. These experiments with MSCs were approved ethically and

methodologically by the local Research Institution (Direction de la Recherche et de l'Innovation registration number UF 9757 – Contrat de Programme de Recherche Clinique – Cellules souches et chondrogenèse). These studies were conducted with informed patients (written consent, non-opposition) in accordance with the usual ethical legal regulations (decrees n2007-1220 and AC-2008-49). All procedures were done in accordance with our authorization and registration number DC-2008-263 given by the National "Cellule de Bioéthique".

Cellular internalisation

Before all experiments with human MSCs, a sterilisation step of SPIONs is necessary. For that, an autoclaving treatment is performed at 120°C during 30 min with an autoclave from Advantage Labo (model AL02-07-100). A previous work showed that the physico-chemical properties of SPIONs were not modified after this sterilisation step [18].

SPIONs were internalized in mesenchymal stromal cells (MSCs) with different concentrations of SPIONs: 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL and 1600 µg/mL. This choice of these concentrations is based on the literature[33]. The solution of SPIONs were incubated with MSCs at 37°C with 5% of CO_2 for 24 hours.
To control the internalisation of SPIONs in MSCs, a Prussian Blue staining was realized. MSCs with SPIONs were fixed with Paraformaldehyde (PFA) 4% for 10 min and then immersed in 2% potassium ferrocyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$) and 2% HCl for 15 min. They were washed with distilled water and a counterstaining with Kernechtrot (5 min) is realised. After a last wash with distilled water and absolute ethanol, MSCs were mounted with resin. The stained cells were observed and recorded by light microscopy (DMD108, LEICA).

Mitochondrial activity

Mitochondrial activity in MSCs with SPIONs was evaluated by an MTT (3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2-5diphenyltetrazolium bromide) assay. MSCs were placed in wells (5000 cells per well for a volume of 100 µL) with 25 µL of MTT and plates were incubated at 37°C under 5% of CO_2 for 4 hours. MTT has been reduced by dehydrogenase succinate to form formazan crystals.
The supernatant has been removed in order to lyse MSCs with 100 µL of SDS-DMF (80 g of sodium dodecyl sulfate, 200 mL of dimethylformamide, 200 mL of water at pH = 4.7) during 24 hours at 37°C with 5% of CO_2.
Finally, the absorbance was measured at 580 nm thanks to a spectrophotometer (Multiskan Ex from ThermoLabsystem). The results of mitochondrial activity are obtained after 24, 48 and 72 hours of seed.

Relaxometry measurements

Prior to MRI measurements, relaxation properties of SPIONs were evaluated at several values of the magnetic field. The longitudinal ($R_1=1/T_1$) and transverse ($R_2=1/T_2$) proton relaxation rates of water in solutions containing SPIONs at different concentrations (the same concentrations as for cellular

internalisation) were measured at 25°C and 0.47T, 0.94T or 1.41T. The proton Larmor frequencies corresponding to these magnetic field values are 20MHz, 40MHz and 60MHz respectively; measurements were made with a Bruker Minispec MQ20, a Bruker Minispec MQ40, and a Bruker Minispec MQ60 respectively. T_1 values were measured with an inversion-recovery pulse sequence and T_2 with a CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) pulse sequence. The relaxivities (longitudinal relaxivity r_1 and transverse relaxivity r_2) were obtained by normalizing the relaxation enhancement of water protons to a millimolar solution of Fe_3O_4. Each relaxivity measurement was realised three times in order to evaluate uncertainties.

^{1}H NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) profiles (i.e., longitudinal relaxivities r_1 as a function of the proton Larmor frequency) were also obtained between 5 kHz and 10 MHz on a Stelar Smartracer fast-field-cycling relaxometer (Stelar company, Medde, Italy). Temperature was fixed at 25 °C and T_1 values were measured with an inversion-recovery pulse sequence on the same samples as the ones used at 20MHz, 40MHz and 60MHz.

MRI measurements

MRI images were acquired with a Bruker Biospec Advance 24/40 with a 2.34 T magnetic field (100 MHz) equipped with a 5 cm diameter Rapid Biomedical volume resonator. The concentrations of SPIONs which are used for MRI images are the same as the ones used for the cells internalisation and for the relaxometry. Spin echo images were acquired for T_2 contrast with a repetition time of 5 s and an echo time of 50 ms. The total acquisition time for one image was 21 min

Results and discussion

TEM micrographs of each sample, SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3, are shown in Fig.1 (respectively 1a, 1c and 1e). For the three samples, SPIONs are spherical and isolated. The size distribution of SPIONs is similar and narrow for SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 as shown respectively in Fig 1b, 1d and 1f. The main diameter obtained with these size distributions is, respectively for SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3, 2.62 ± 0.83 nm, 3.30 ± 1.10 nm and 3.80 ± 1.67 nm. These diameters are compared with the hydrodynamic diameter obtained with DLS measurements (symbols on Fig 1b, 1d and 1f). The hydrodynamic diameter is the diameter of the inorganic core plus the diameter of the organic layer plus the solvation sphere. For each sample, there is only one narrow peak which corresponds to a population of size of SPIONs. The hydrodynamic diameter of each SPIONs is larger than that obtained with TEM measurements corresponding to a presence of an organic layer and the solvation sphere. The value of the hydrodynamic diameter is expressed as a number in order to be able to compare it with the diameter obtained by TEM. The hydrodynamic diameter is 7 ± 2 nm for SPIONs_CA1, 9 ± 2 nm for SPIONs_CA2 and 15 ± 4 nm for SPIONs_CA3.

Then, a XRD measurement on each sample is realised to know the crystallographic structure of SPIONs. XRD patterns are shown on supplementary figure S1. Magnetite (Fe_3O_4) and maghemite (γ-Fe_2O_3)

crystallise in the same cubic crystal structure (F_{d-3m}). XRD patterns of each sample are compared with a reference pattern of magnetite (COD: 9005836). All of the diffraction peaks are indexed with this spinel structure. To confirm the inverse spinel structure, the lattice parameter is calculated for the main peaks on each sample. The lattice parameter of reference Fe_3O_4 is equal to 0.8395 nm and that of reference γ-Fe_2O_3 is equal to 0.8354 nm. The average lattice parameter is equal to 0.8384 nm, 0.8388 nm and 0.8370 nm for SPIONs_CA1, CA2 and CA3 respectively: there are between the lattice parameter of magnetite and maghemite, those are sub stoichiometric magnetite.

Thanks to the Debye-Scherrer equation, the crystal size can be calculated to compare with the size obtained by TEM images. Indeed, each nanoparticle can be assimilated to one crystal because each nanoparticle is composed of a single domain. To calculate the crystal size, the mean peak of patterns is used, i.e. the (311) peak. The crystal sizes of SPIONs are respectively 3.5 nm, 3.8 nm and 4.1 nm for CA1, CA2 and CA3. These sizes are in accordance with the diameter measured by TEM.

To confirm the presence of the organic layer, FTIR measurements are realized and shown on supplementary information (Fig. S2). For the three sample, the characteristic vibration bands of citrate are present, i.e. a large band from 3000 cm^{-1} to 3500 cm^{-1} which corresponds to the stretching vibration of O-H of the hydroxyl group in citrate and absorbed water, a band at 2840 cm^{-1} which corresponds to the stretching vibration of CH_2 and the stretching band at 1050 cm^{-1} of C-O of the hydroxyl group. In addition, there are two intense peaks at 1610 cm^{-1} and 1415 cm^{-1} which are respectively the asymmetric and symmetric stretching of carboxylate groups of citrate[34]. To confirm the presence of the carboxylate groups, another band which corresponds to the stretching of C-O in carboxylate is present at 1260 cm^{-1}. These two peaks are shifted compared to the carboxylate bands of a sodium citrate solution (shift of 30 cm^{-1}): this shift is due to the chemisorption of citrate on the surface of the iron oxide (Fig.2). Finally, in the organic part of FTIR spectra (from 1000 cm^{-1} to 4000 cm^{-1}), a last peak is present and corresponds to the stretching of N-H: there is a presence of adsorbed free ammonium.

With FTIR spectra, we can determine the type of iron oxide which is synthesized. Indeed, the FTIR spectrum of magnetite has only one intense peak around 580 cm^{-1} and, for maghemite, there are succession peaks from 400 cm^{-1} to 800 cm^{-1} [35]. In our case, there is a peak at 580 cm^{-1}: the inorganic core of the three samples is composed of magnetite. However, another peak can be observed which results in a slight oxidation of the magnetite: the inorganic core is so substoichiometric magnetite ($Fe_{3-\delta}O_4$ with δ the deviation from the stoichiometric).

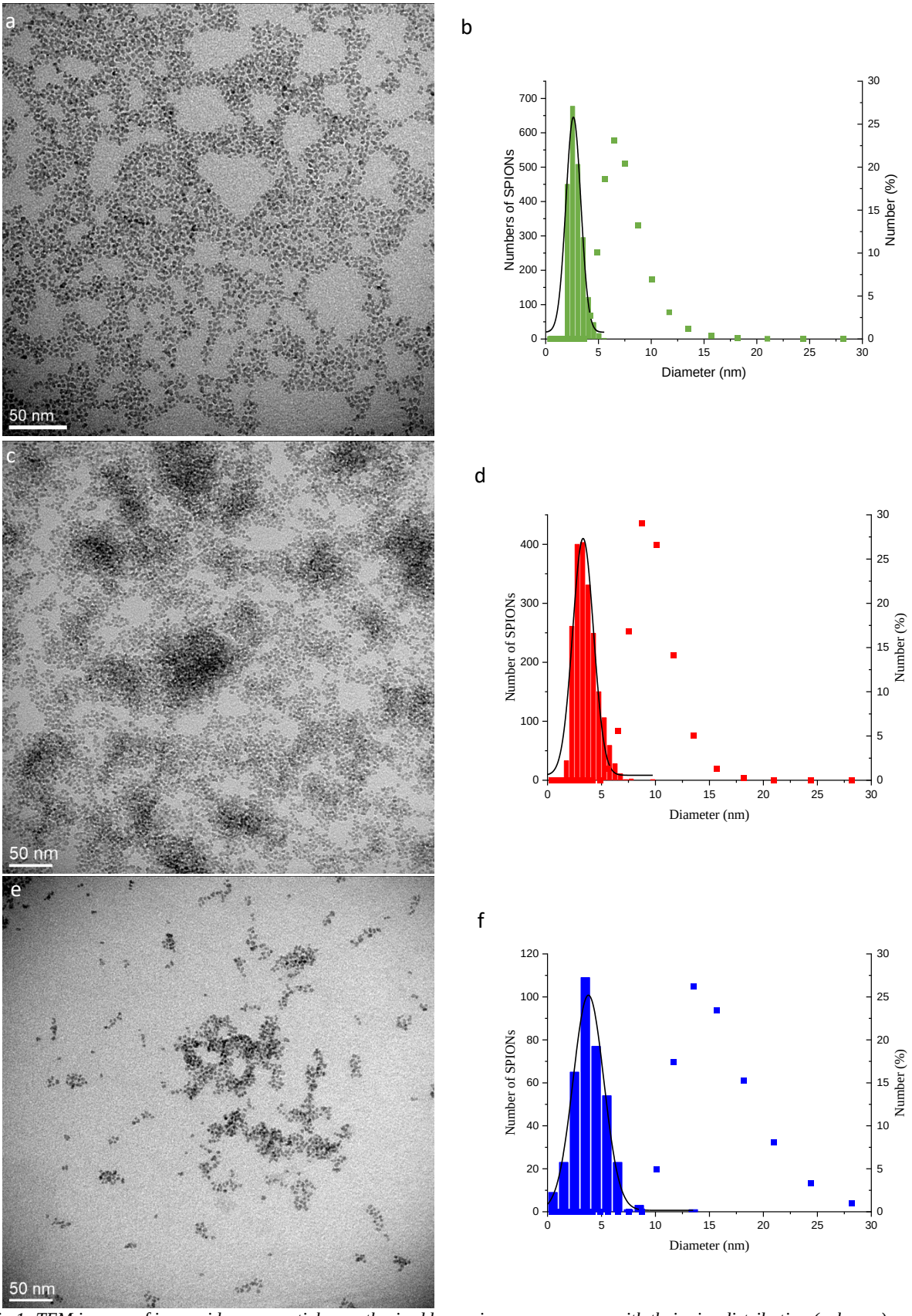


Fig 1: TEM images of iron oxide nanoparticles synthesised by a microwave process with their size distribution (columns) and DLS measurements (symbols). SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (c) and SPIONs_CA3 (e) with their respectively average size equals to 2.62 ± 0.83 nm, 3.30 ± 1.10 nm and 3.80 ± 1.67 nm and a hydrodynamic diameter of 7 ± 2 nm (b), 9 ± 2 nm (d) and 15 ± 4 nm (f).

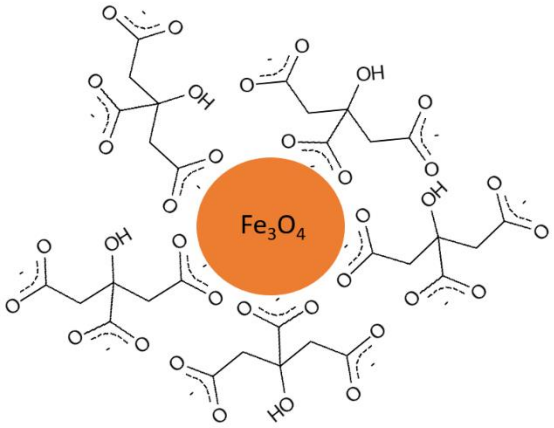


Fig 2: Schema of iron oxide nanoparticle with an organic layer of citrate.

The percentage in weight of this organic layer is determined by a thermogravimetric analysis (TGA) and which presents in figure S3. For the three samples of SPIONs, there is the same weight loss. Indeed, three steps of weight loss are present. The first begins at 30°C and finishes at 130°C and it corresponds to the loss of water absorbed. The second stage, from 180°C to 250°C, can be attributed to the decomposition of the citrate. Indeed, if we compare this stage with the decomposition of citrate, the weight loss is similar (Fig S4). Finally, the last stage around 320°C corresponds to the last degradation of citrate. The remaining mass is the mass of iron oxide which is oxidised to hematite (α-Fe_2O_3). The quantity of iron oxide and ligand are detailed in table S1 in supplementary information. For SPIONs_CA1 and SPIONs_CA2, the quantity of ligands and iron oxide are similar but, for SPIONs_CA3, there is an increase of iron oxide so a decrease of ligands. This difference can be explained by the grafting of citrate around the inorganic core. Indeed, citrate can be attached to iron oxide thanks to carboxylate groups. However, with the centrifugation washing, some citrates can be separate to the inorganic core.

Finally, the magnetic properties were studied to determine the magnetic state and the magnetization. In first, a magnetization curve is realised at room temperature to show if a hysteresis is present or not (fig S5). In our case, at 300K, there is no hysteresis and no coercivity: different SPIONs synthesised are in a superparamagnetic state. The superparamagnetic state is a magnetic state where the sum of magnetic moments is null[36,37]. Then, the magnetization saturation is determined thanks to these curves and are equal to 55 $emu.g^{-1}$, 53 $emu.g^{-1}$ and 59 $emu.g^{-1}$ for SPIONs_CA1, CA2 and CA3 respectively. These magnetization saturations are in the same proportion with nanoparticles with the same diameter[38]. To check if iron oxide nanoparticles are in a superparamagnetic state at room temperature, a hysteresis loop is studied at 5K (fig S6). Indeed, at this temperature, iron oxide nanoparticles are in a blocked state which results in an appearance of an opening of the curve. For each sample, a hysteresis is present and confirms the blocked state at 5K. The magnetization saturations obtained at 5K are higher than obtained at 300K due to the blocked state: there are 78 $emu.g^{-1}$, 78 $emu.g^{-1}$ and 75 $emu.g^{-1}$ for CA1, CA2 and CA3 respectively. To determine the transition temperature between the superparamagnetic state and the blocked state (i.e., the blocking temperature called T_B), a ZFC/FC curve is realised (fig S7). T_B is determined thanks to the maximum of the ZFC curve (i.e., the curve from 5K to 300K) and is equal to 14K, 15K and 46K for CA1, CA2 and CA3: the superparamagnetic state is confirmed at room temperature. In addition to that, these curves correspond to a distribution of T_B

and T_B is in function with the diameter of a nanoparticle: if the size increases, the blocking temperature increases too[39]. In our case, for SPIONs_CA1 and SPIONs_CA2, the ZFC/FC curves are narrow so it corresponds to a narrow size distribution: it is adequate to the size distribution obtained by TEM analyses.

After a sterilisation step, a biological study on the behaviour of the iron oxide nanoparticles on cells is realised. For that, different concentrations of SPIONs_CA1, CA2 and CA3 are brought into contact with MSCs. Then a coloration of SPIONs and nuclei (with potassium ferrocyanide and Kernechtrot), the internalisation of SPIONs is highlighted (Fig. 3). For the three samples, the internalisation increases with the concentration of SPIONs. For SPIONs_CA3, the internalisation begins at low concentration (12.5 µg SPIONs/mL) without aggregation of the nanoparticles. However, at high concentrations (400, 800 and 1600 µg/mL) for the three samples, few aggregates appear and will induce a cytotoxicity of cells. Indeed, several studies have shown that the low concentrations (from 1 to 100 µg/mL) don't affect the viability and toxicity of various cells such as MSCs[33].

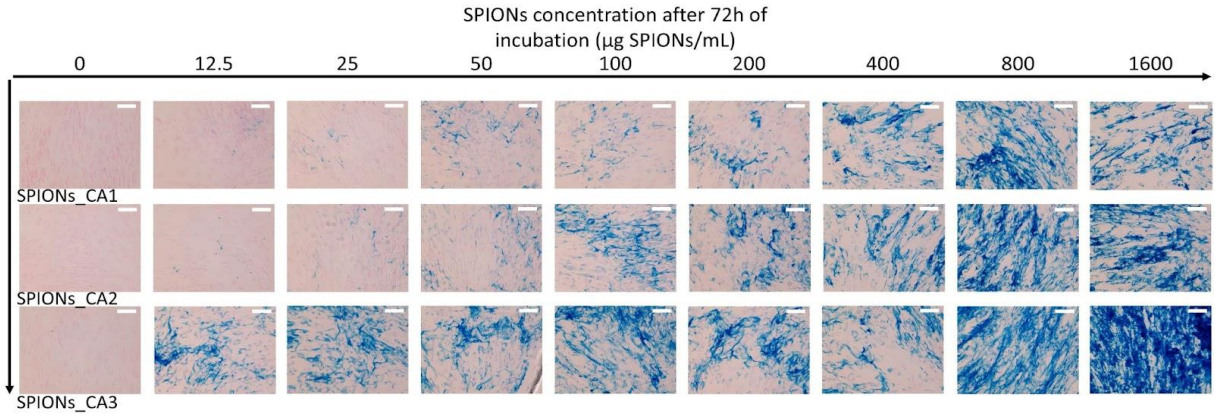


Fig 3: Histological visualization of human mesenchymal stromal cells (MSCs) using Prussian blue staining and Kernechtrot counterstaining. Staining was performed 72 hours after exposure of SPIONs (SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3) with different concentrations (from 100 to 1600 µg SPIONs/mL) (scale bare: 100 µm).

To verify this cytotoxicity, an analysis of the mitochondrial activity is carried out (Fig. 4). The absorbance of the formazan complex (obtained through the reaction between MTT and the succinate dehydrogenase) was collected after 24h, 48h and 72h. For the three samples, there is an increase of the mitochondrial activity over time: this increase is due to the classical cell proliferation. However, for the high concentrations, a decrease in this activity is observed. For SPIONs_CA1, at 1600 µg/mL, the mitochondrial activity is low at 24h, increases at 48h (30% of increase) and decreases at 72h (- 34%): this evolution is likened to a cytotoxicity. For SPIONs_CA2, there is the same behaviour for the high concentrations. Finally, for SPIONs_CA3, there is no difference between the control and the concentrations from 12.5 µg/mL to 200 µg/mL over time. However, for the 400 µg/mL, 800 µg/mL and 1600 µg/mL and only at 24h, the mitochondrial activity is high: for these concentrations, the solution was more viscous than the other and generated a large deposit which was difficult to lyse for analysis. But the presence of this large deposit doesn't induce a cytotoxicity because the mitochondrial activity with the high concentrations are similar to the control. To confirm these results, a LDH (Lactate DesHydrogenase) test have been released: the same conclusion about the toxicity of different SPIONs was found but the data of LDH are not shown on this work.

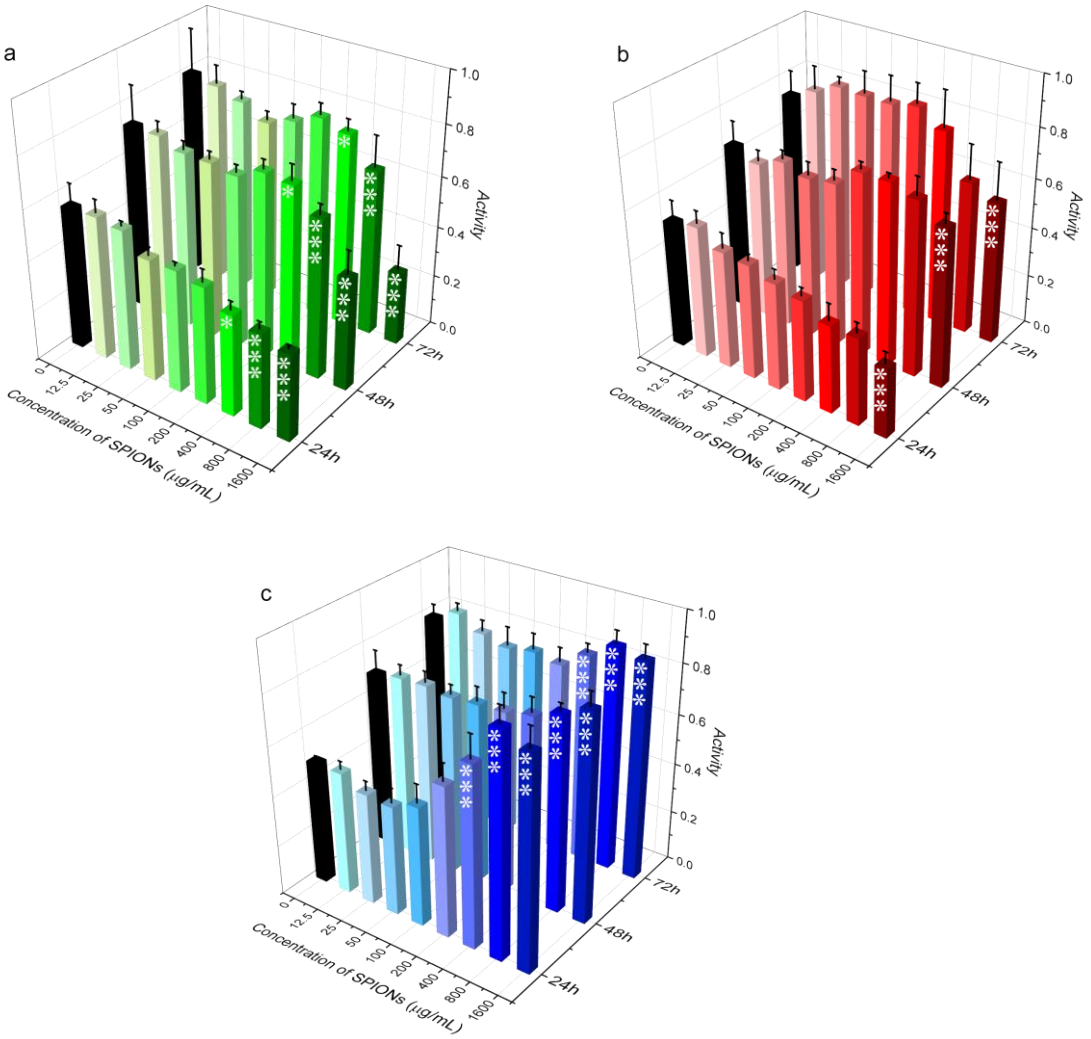


*Fig 4: Mitochondrial activity of MSCs with different concentrations of SPIONs collected at 24h, 48h and 72h (SPIONs_CA1 (a), SPIONs_CA2 (b) and SPIONs_CA3 (c)). All comparisons were performed versus the control condition (0) with a 2-ways ANOVA (SPIONs concentrations and time) followed by a Tukey's test. Data are mean ± sd. *p<0.5, **p<0.05 and ***p<0.01. The experiment was carried out five times.*

Once the no-toxicity of SPIONs asserted by the first biological tests, their NMR relaxation properties were studied for a potential use as an MRI contrast agent. Longitudinal (R_1) and transverse (R_2) relaxations rates were measured as a function of SPIONs concentration. Relaxivities were obtained from the linear regression of these rates in accordance with the equation $R_i = R_{i,0} + r_i.C$, where $R_{i=1,2}$ is the relaxation rate (s^{-1}) of the aqueous solution, $R_{i=1,2,0}$ (s^{-1}) is the relaxation rate of the aqueous solution without contrast agent, $r_{i=1,2}$ is the relaxivity ($s^{-1}.mmol^{-1}.L$) and C the concentration of the contrast agent ($mmol.L^{-1}$). It characterizes the contribution of the superparamagnetic nanoparticle to the acceleration of water proton relaxation.

Figure 5 shows the transverse relaxation (i = 2) evolution of SPIONs_CA1, CA2 and CA3 at 60 MHz (i.e. 1.4 T) with the concentration. The high values of r_2 obtained from the linear regression show that SPIONs_CA1, CA2 and CA3 are good candidate for negative contrast agents[7,12,40]. The r_2 value is 58 s^{-}

^{1}.mmol^{-1}.L, 88 s^{-1}.mmol^{-1}.L and 158 s^{-1}.mmol^{-1}.L for SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 respectively. These values are in accordance with other SPIONs with equivalent diameters[41,42]. From SPIONs_CA1 to SPIONs_CA3, the increase in r_2 values is mainly due to the increase in their hydrodynamic diameters because their saturation magnetizations are of the same order. To complete the relaxation data of these nanoparticles, the r_1 value (longitudinal relaxation) is measured in the same conditions (same concentrations at 60 MHz) and is equal to 22 s^{-1}.mmol^{-1}.L, 31 s^{-1}.mmol^{-1}.L and 23 s^{-1}.mmol^{-1}.L for SPIONs_CA1, CA2 and CA3 respectively (Figure S8). The values of $r_{i=1,2}$ are compared with the values of Endorem®, a commercial contrast agent composed of a superparamagnetic iron oxide core (around 5 nm) and an organic layer of dextran. Its hydrodynamic diameter is around 80 to 150 nm[40,43,44] . Endorem® was used as a contrast agent for the lymphatic system in Europe. From literature, Endorem® relaxivity values are between 10 to 24 s^{-1}.mmol^{-1}.L for r_1 and 100 to 158 s^{-1}.mmol^{-1}.L for r_2 at 37°C and 1.5T : these values are in the same order as the relaxivity values of our SPIONs[43,44].

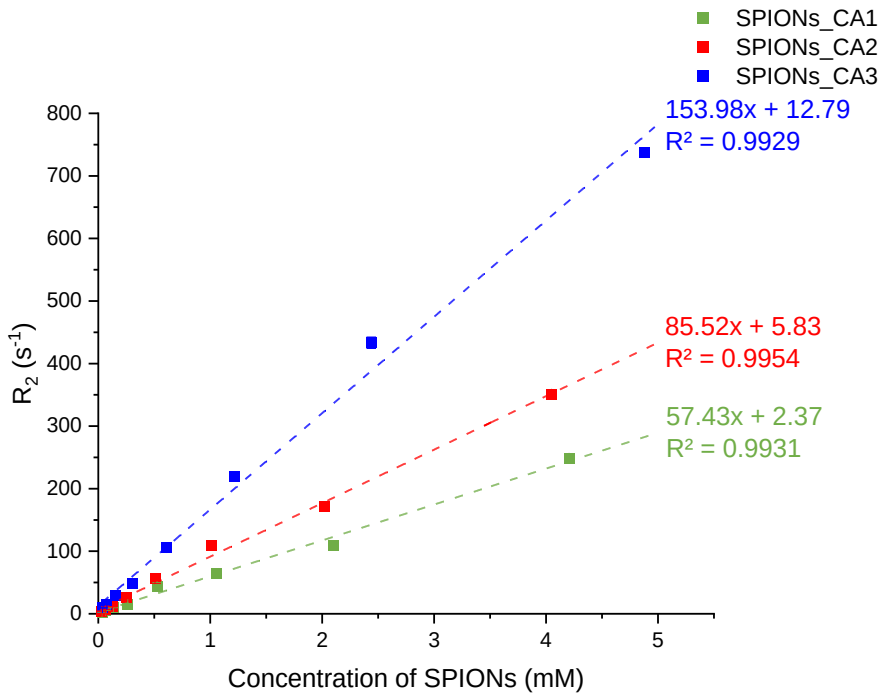


Fig 5: Transverse relaxation rate R_2 (s^{-1}) as a function of SPIONs concentration (mM) at 60 MHz and 25°C. Dashed lines represent the linear regression done for evaluating the transverse relaxivity r_2.

These relaxivity results are nicely confirmed by T_2-contrasted Magnetic Nuclear (MR) images shown on Figure 6. Images were obtained at 2.34T on phantoms corresponding to different concentrations of SPIONs (the same as the ones used for MTT tests and relaxometry measurements). The superparamagnetic nanoparticles act by lowering the relaxation time of water protons. When the concentration of SPIONs increases, the signal in the T2-weighted images decreases, as expected.

The NMR relaxometric properties of SPIONs were further investigated by measuring r_1 and r_2 at different values of the magnetic field (Figure S8 to S11). Table 1 summarises the value of $r_{i=1,2}$ of SPIONs_CA1, CA2 and CA3 at 20 MHz (0.47 Tesla), 40 MHz (0.95 Tesla) and 60 MHz (1.41 Tesla). For the three samples, when the magnetic field increases (i.e., when the frequency increases), the r_2 value increases too but the r_1 value decreases. This behaviour is classical for a superparamagnetic material. To determine if our SPIONs are good candidates for contrast agent for MRI, the ratio between r_2 and r_1 is important (Fig S12)[45]. Indeed, if this ratio is higher to 2, the contrast agent is classified as a negative

contrast agent, especially under magnetic fields mostly used in MRI[45]. For SPIONs_CA1 and SPIONs_CA2, the ratio is higher to 2 at 40 MHz (0.95 T) and 60 MHz (1.41 T), these magnetic field values correspond to the ones commonly used in clinical MRI. For SPIONs_CA3, the ratio is higher to 2 under any magnetic fields which are applied (between 3.5 to 6.7): this sample is a very good candidate to be used in a living organism in future works. For comparison, this ratio is between 4 and 15 for Endorem® according to the different authors [43,44].

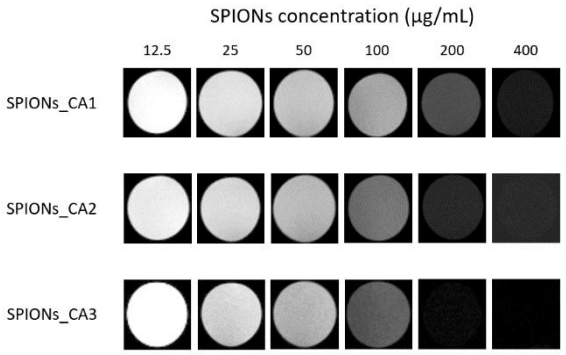


Fig 6: T_2 contrasted MR images at different concentrations of SPIONs under 2.34 Tesla.

Table 1: Relaxivity $r_{i=1,2}$ ($s^{-1}.mmol^{-1}.L$) of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 at different ^1H Larmor frequencies. The relaxivity is obtained by normalizing the relaxation enhancement of water protons to a millimolar solution of SPION. Each relaxivity was realised three times and the average with the standard deviation (sd) are in this table.

	SPIONs_CA1		SPIONs_CA2		SPIONs_CA3	
	r_1	r_2	r_1	r_2	r_1	r_2
20 MHz	23.7 (0.3)	39.3 (0.4)	34.4 (0.3)	59.7 (0.3)	29.0 (0.1)	103.6 (0.7)
40 MHz	23.8 (0.2)	52.5 (0.2)	34.1 (0.2)	78.6 (0.5)	26.5 (0.1)	140.2 (0.7)
60 MHz	21.6 (0.2)	58.3 (0.8)	30.8 (0.1)	87.7 (1.1)	22.8 (0.1)	157.9 (1.2)

Then, NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) measurements allowed us to explore a wider range of magnetic fields. Curves describe the evolution of r_1 as a function of the magnetic field expressed in proton Larmor frequency: Figure 7 shows NMRD profiles of SPIONs_CA1, CA2 and CA3 between 10kHz and 60MHz (0.24mT-1.41T) at 25°C. Profiles are characteristic of relaxation induced by superparamagnetic nanoparticles: at low frequency, the relaxation mechanism is driven by the magnetic anisotropy of the nanoparticle, and at high frequency by the diffusion of water molecules at proximity of the magnetic moments of the nanoparticles[38,45,46]. SPIONs_CA1, CA2 and CA3 are the most efficient for water longitudinal relaxation between 20MHz and 40MHz (0.47-0.95T), this magnetic field value correspond to the limit beyond which transverse relaxivity r_2 should be almost constant because the saturation magnetization is reached[47], promising good efficiency as negative contrast agent in MRI. The high field inflection point is correlated to the system dynamics and given by the condition $\omega_H \tau_D = 1$ in which $\tau_D = r^2/D$ with r the hydrodynamic radius of the nanoparticle and D the relative diffusion coefficient of water. Using D=3.0 10^{-9} $m^2.s^{-1}$, hydrodynamic diameter obtained from the NMRD is equal to 7.4 nm, 6.5 nm and 13.0 nm for SPIONs_CA1, CA2 and CA3 respectively. These diameters are fully consistent with the values obtained by DLS. These fittings are similar to a fitting of a NMRD profile of Endorem®[43].

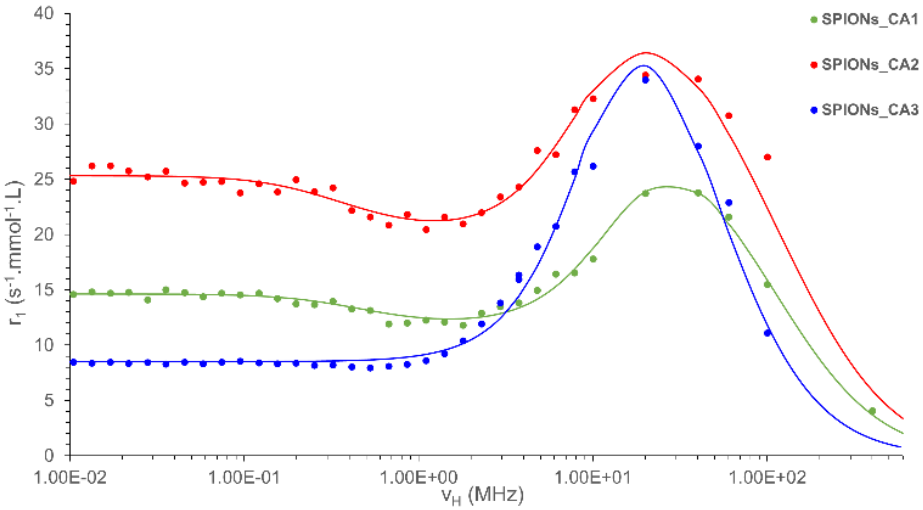


Fig 7: Longitudinal relaxivity (r_1) NMRD profiles of SPIONS between 10kHz and 60MHz (^{1}H Larmor frequency). Continuous lines represent the best fits obtained with the model of Roch et al. [48].

Conclusions

In summary, a new method of synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles was described in this work. Indeed, these nanoparticles were synthesized by a microwave process and nanoparticles obtained are monodisperse, stable directly in an aqueous medium thanks to the organic layer (citrate). Nanoparticles had a diameter between 2.62 nm to 3.80 nm, had good crystallinity and magnetization saturation higher. These nanoparticles had a goal to use for MRI. For that, several biological tests were carried out to determine the cytotoxicity or not of SPIONs.

The internalisation of SPIONs in MSCs was studied as well as MTT tests: for the three samples, there is no cytotoxicity of MSCs in presence of SPIONs at low concentrations. In addition, the three synthesized SPIONs are a good internalisation in cells, especially SPIONs_CA3 at low concentration: this SPION was a good candidate for the MRI compared to the other. To improve these results, other tests will be carried out such as LDH tests. Thanks to this no toxicity, our nanoparticles are good candidates for MRI. Indeed, with the superparamagnetic state, iron oxide nanoparticles can be used as negative contrast agents. To determine the efficiency for MRI, a preliminary characterization is important: relaxometry. Our nanoparticles have a good transverse relaxivity (r_2), especially SPIONs_CA3 which had a r_2 of 158 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ (in comparison, Endorem®, a negative contrast agent, had a r_2 between 100 to 158 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$). However, this value is dependent on the hydrodynamic diameter and the magnetic field. To determine the best conditions for MRI, relaxivity was studied at different magnetic fields, those used in a classical MRI. NMRD profiles were simulated for the longitudinal relaxivity (r_1) and the same profile that Endorem® was obtained.

Finally, we acquired the first images using MRI which confirmed the good relaxation effects of our nanoparticles.
Future studies will be realised about the NMRD profile for the transverse relaxivity at high magnetic field. Indeed, in the simulation, there is maybe an interaction between the proton of water and nanoparticles which modify the magnetic moment locally and this interaction is neglected in the equation of simulation. In addition to these works, several biological studies will be carried out to determine the exact presence of SPIONs in cells with a cryo-TEM and to determine the cytotoxicity (for example, check the inflammatory nature of the internalisation and the absence of the induction of apoptosis). These different characterizations will allow the use of these nanoparticles in a living organism to determine the behaviour of SPIONs *in vivo*.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Plateforme de RMN de l'Institut Jean Barriol, Université de Lorraine.
Supported by the « SONOMA» project co-funded by FEDER-FSE Lorraine et Massif des Vosges 2014-2020, a European Union Program

References

1 C. S. S. R. Kumar and F. Mohammad, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, **63**, 789–808.
2 F. Crippa, L. Rodriguez-Lorenzo, X. Hua, B. Goris, S. Bals, J. S. Garitaonandia, S. Balog, D. Burnand, A. M. Hirt, L. Haeni, M. Lattuada, B. Rothen-Rutishauser and A. Petri-Fink, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2019, **2**, 4462–4470.
3 Y. Jun, Y.-M. Huh, J. Choi, J.-H. Lee, H.-T. Song, S. Kim, S. Yoon, K.-S. Kim, J.-S. Shin, J.-S. Suh and J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 5732–5733.
4 T. Vangijzegem, D. Stanicki and S. Laurent, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2019, **16**, 69–78.
5 H. Shokrollahi, *Materials Science and Engineering: C*, 2013, **33**, 4485–4497.
6 J. L. Dormann, *Advances in Chemical Physics*, 1997, **98**, 283–494.
7 A. Alipour, Z. Soran-Erdem, M. Utkur, V. K. Sharma, O. Algin, E. U. Saritas and H. V. Demir, *Magnetic Resonance Imaging*, 2018, **49**, 16–24.
8 C. Chen, J. Ge, Y. Gao, L. Chen, J. Cui, J. Zeng and M. Gao, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, ,
9 J. Ward, *Radiography*, 2007, **13**, e54–e72.
10 A. G. Roca, L. Gutiérrez, H. Gavilán, M. E. Fortes Brollo, S. Veintemillas-Verdaguer and M. del P. Morales, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019, **138**, 68–104.
11 F. Reyes-Ortega, Á. Delgado and G. Iglesias, *Nanomaterials*, 2021, **11**, 627.
12 P. Cheah, T. Cowan, R. Zhang, A. Fatemi-Ardekani, Y. Liu, J. Zheng, F. Han, Y. Li, D. Cao and Y. Zhao, *Nanoscale*, 2020, **12**, 9272–9283.
13 C. A. Monnier, M. Lattuada, D. Burnand, F. Crippa, J. C. Martinez-Garcia, A. M. Hirt, B. Rothen-Rutishauser, M. Bonmarin and A. Petri-Fink, *Nanoscale*, 2016, **8**, 13321–13332.
14 T. Lam, P. Avti, P. Pouliot, F. Maafi, J.-C. Tardif, É. Rhéaume, F. Lesage and A. Kakkar, *Nanomaterials*, 2016, **6**, 100.

15 M. O. Besenhard, L. Panariello, C. Kiefer, A. P. LaGrow, L. Storozhuk, F. Perton, S. Begin, D. Mertz, N. T. K. Thanh and A. Gavriilidis, *Nanoscale*, 2021, **13**, 8795–8805.
16 S. Slimani, C. Meneghini, M. Abdolrahimi, A. Talone, J. P. M. Murillo, G. Barucca, N. Yaacoub, P. Imperatori, E. Illés, M. Smari, E. Dhahri and D. Peddis, *Applied Sciences*, 2021, **11**, 5433.
17 N. Saxena and M. Singh, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2017, **429**, 166–176.
18 T. Girardet, A. Cherraj, A. Pinzano, C. Henrionnet, F. Cleymand and S. Fleutot, *Pure and Applied Chemistry*, 2021, **93**, 1265–1273.
19 L. Polito, M. Colombo, D. Monti, S. Melato, E. Caneva and D. Prosperi, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 12712–12724.
20 R. K. Kottana, L. Maurizi, B. Schnoor, K. Morris, J. A. Webb, M. A. Massiah, N. Millot and A. Papa, *Small*, 2021, **17**, 2004945.
21 N. Pimpha, N. Woramongkolchai, P. Sunintaboon and N. Saengkrit, *J Clust Sci*, 2022, **33**, 567–577.
22 N. Ohannesian, C. T. De Leo and K. S. Martirosyan, *Materials Today: Proceedings*, 2019, **13**, 397–403.
23 N. Padmavathy, I. Chakraborty, A. Kumar, A. Roy, S. Bose and K. Chatterjee, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2022, **5**, 237–248.
24 A. H. Hirad, S. A. Ansari, M. A. E. Ali and M. A. Egeh, *Process Biochemistry*, 2022, **118**, 205–214.
25 D. Gusain, O. O. Awolusi and F. Bux, *Surface Science*, 2022, **716**, 121952.
26 J.-S. Schanche, *Mol Divers*, 2003, **7**, 291–298.
27 X. Guo, Y. Ma, Y. Min, J. Sun, X. Shi, G. Gao, L. Sun and J. Wang, *Bioactive Materials*, 2023, **20**, 501–518.
28 Y.-D. Xiao, R. Paudel, J. Liu, C. Ma, Z.-S. Zhang and S.-K. Zhou, *International Journal of Molecular Medicine*, 2016, **38**, 1319–1326.
29 G. J. Strijkers, W. J. M. Mulder, G. A. F. van Tilborg and K. Nicolay, *ACAMC*, 2007, **7**, 291–305.
30 C. H. Evans, *Biochemistry of the Lanthanides*, Springer Science & Business Media, 2013, vol. 8.
31 R. Qiao, C. Yang and M. Gao, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 6274.
32 S. Laurent, L. V. Elst and R. N. Muller, in *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, eds. A. Merbach, L. Helm and É. Tóth, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2013, pp. 427–447.
33 E. Roeder, C. Henrionnet, J. C. Goebel, N. Gambier, O. Beuf, D. Grenier, B. Chen, P.-A. Vuissoz, P. Gillet and A. Pinzano, *PLoS ONE*, 2014, **9**, e98451.
34 S. Nigam, K. Barick and D. Bahadur, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2011, **323**, 237–243.
35 T. J. Daou, J. M. Grenèche, G. Pourroy, S. Buathong, A. Derory, C. Ulhaq-Bouillet, B. Donnio, D. Guillon and S. Begin-Colin, *Chem. Mater.*, 2008, **20**, 5869–5875.
36 L. Néel, 4.
37 L. Néel, *J. Phys. Radium*, 1950, **11**, 49–61.
38 M. Basini, T. Orlando, P. Arosio, M. F. Casula, D. Espa, S. Murgia, C. Sangregorio, C. Innocenti and A. Lascialfari, *The Journal of Chemical Physics*, 2017, **146**, 034703.
39 J.-H. Huang, H. J. Parab, R.-S. Liu, T.-C. Lai, M. Hsiao, C.-H. Chen, H.-S. Sheu, J.-M. Chen, D.-P. Tsai and Y.-K. Hwu, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 15684–15690.
40 S. Tong, H. Zhu and G. Bao, *Materials Today*, 2019, **31**, 86–99.
41 Q. L. Vuong, J.-F. Berret, J. Fresnais, Y. Gossuin and O. Sandre, *Advanced Healthcare Materials*, 2012, **1**, 502–512.
42 G. Wang, X. Zhang, A. Skallberg, Y. Liu, Z. Hu, X. Mei and K. Uvdal, *Nanoscale*, 2014, **6**, 2953.

43 S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2064–2110.
44 L. M. Ali, P. Marzola, E. Nicolato, S. Fiorini, M. de las Heras Guillamón, R. Piñol, L. Gabilondo, A. Millán and F. Palacio, *Future Science OA*, 2019, FSO235.
45 Y. Gossuin, P. Gillis, A. Hocq, Q. L. Vuong and A. Roch, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2009, **1**, 299–310.
46 Q. L. Vuong, P. Gillis, A. Roch and Y. Gossuin, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, ,
47 M.-A. Fortin, in *Magnetic Characterization Techniques for Nanomaterials*, ed. C. S. S. R. Kumar, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2017, pp. 511–555.
48 A. Roch, R. N. Muller and P. Gillis, *The Journal of chemical physics*, 1999, **110**, 5403–5411.

Supplementary information of

SPIONs magnetic nanoparticles for MRI applications: microwave synthesis and physicochemical, magnetic and biological characterizations

Thomas Girardet,[a] Emilie Bianchi,[a] Christel Henrionnet,[b] Astrid Pinzano,[b] Sabine Bouguet-Bonnet,[c] Corentin Boulogne, [c] Sébastien Leclerc,[d] Franck Cleymand [a] and Solenne Fleutot [a]

a Institut Jean Lamour, CNRS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France
b IMoPA, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France
c CRM2, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France
d LEMTA, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France

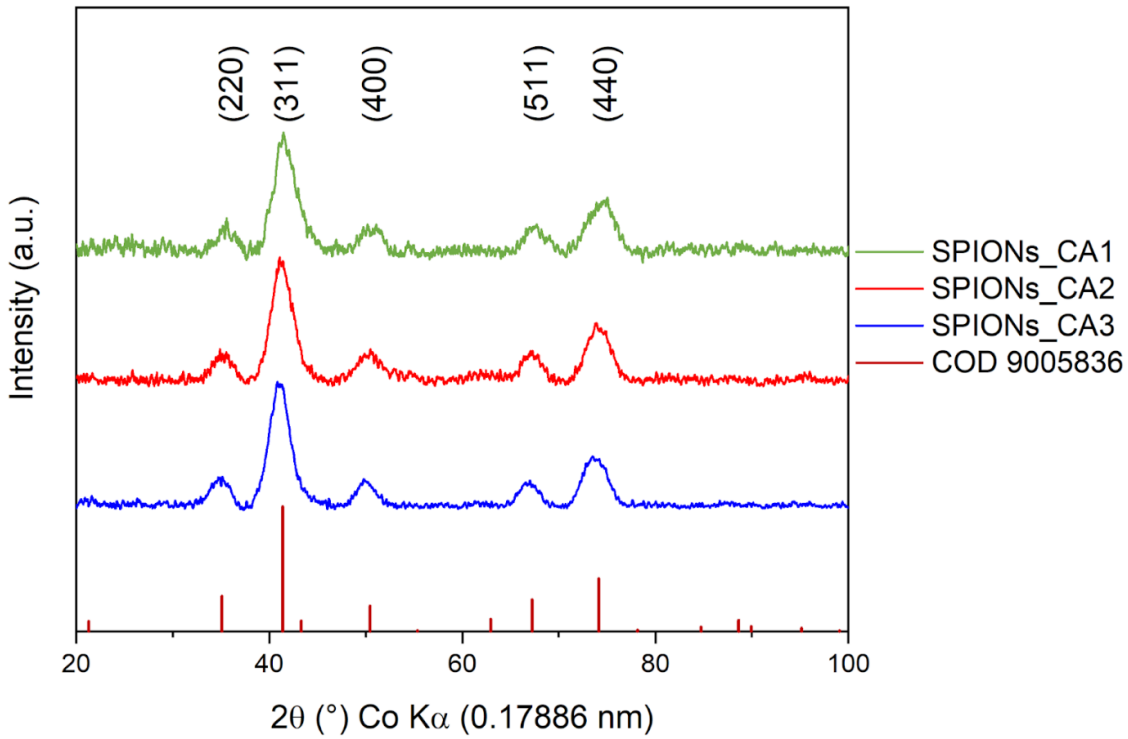


Figure S1: XRD pattern of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 which are compared with a reference of magnetite (COD 9005836).

Debye-Scherrer equation:

$$t = \frac{k \times \lambda}{\sqrt{H^2\text{-}s^2} \times \cos(\theta)}$$

With t the crystallite size (nm), λ the wavelength (λ= 0.178886 nm), k a correction factor (0.9), H the FWHM of the main peak (311) in radian, s the FWHM of a main peak of a Si reference (s = 0.323°) and θ the position of the main peak (°).

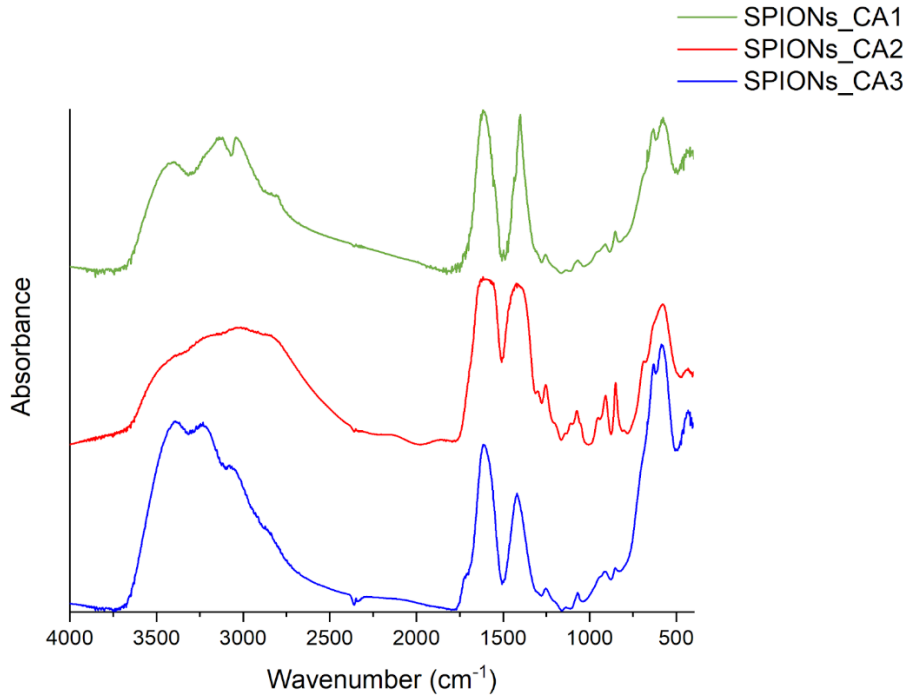


Figure S2: FTIR spectra of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3.

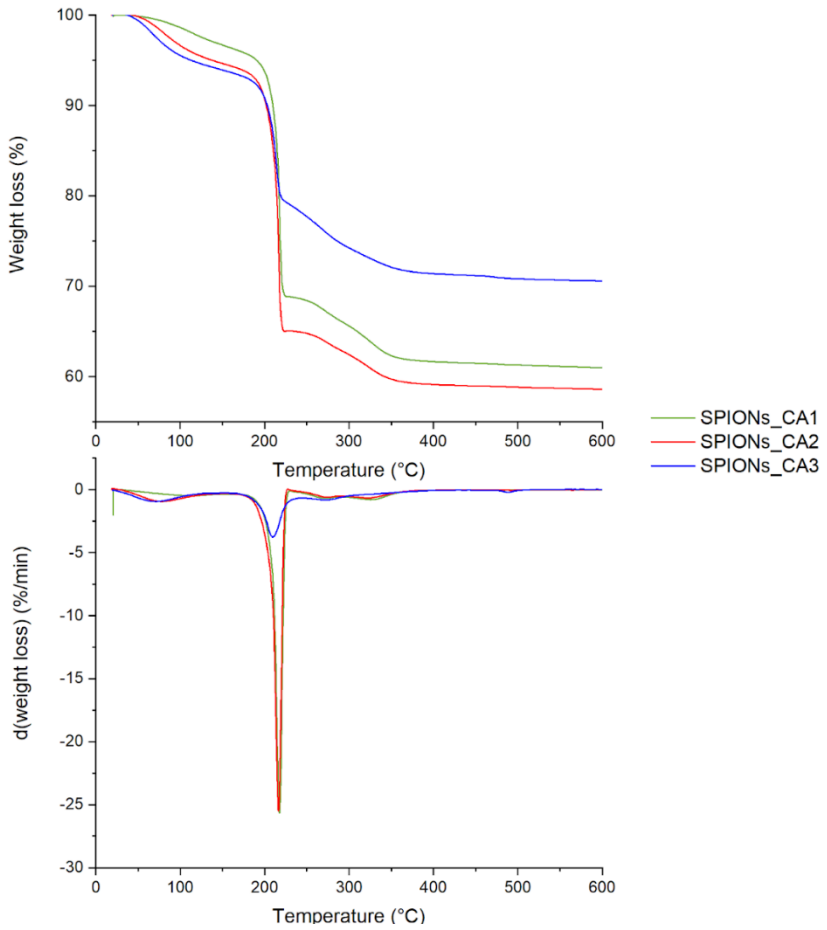


Figure S3: TGA curves with the derivate of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3.

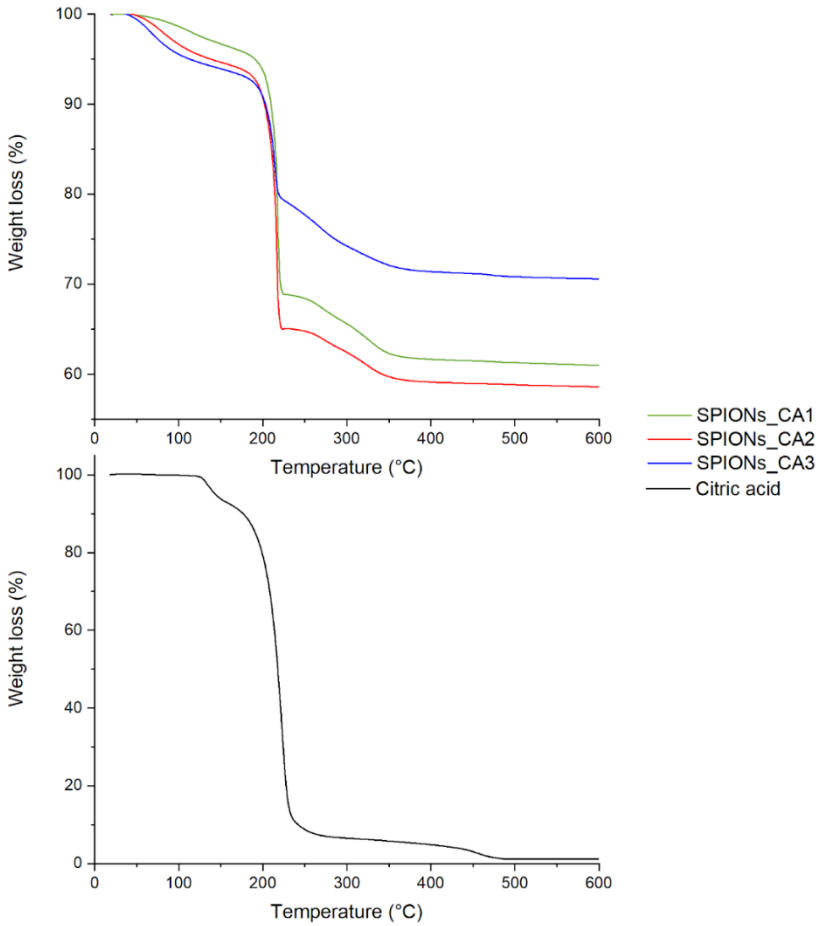


Figure S4: TGA curves of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 compared to a TGA curve of citric acid.

Table S1: Table of weight loss in percentage.

Sample	Iron oxide	Ligand	Water
SPIONs_CA1	61	37	2
SPIONs_CA2	59	37	4
SPIONs_CA3	71	24	5

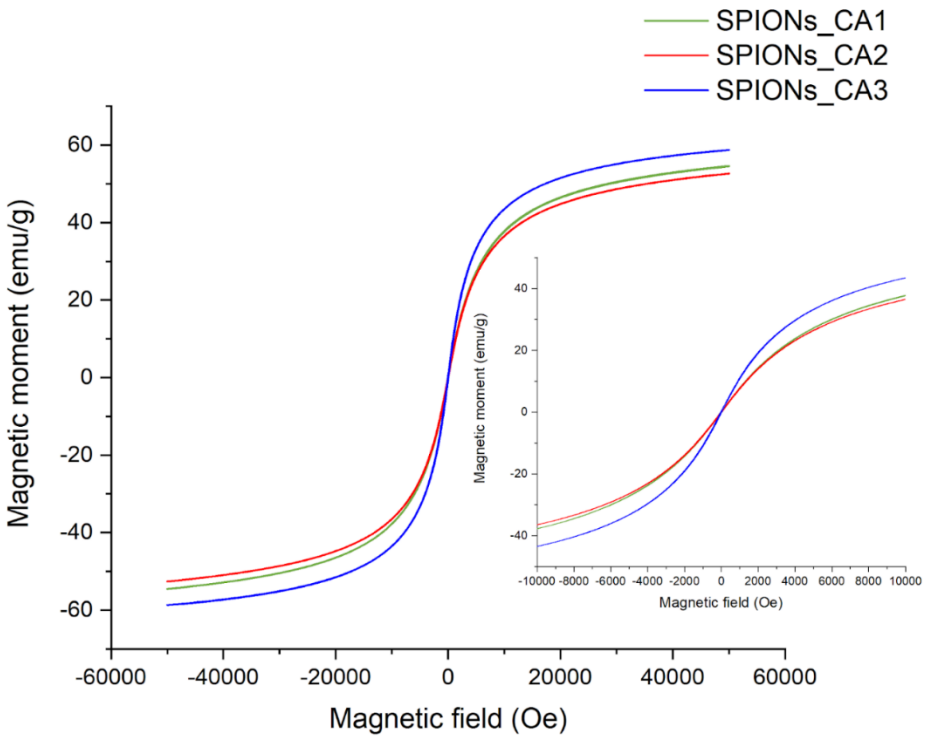


Figure S5: Magnetization as a function of magnetic field at room temperature (300K) of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3. The inset shows the magnetization between – 1 Tesla to 1 Tesla (1 Tesla = 10 000 Oe).

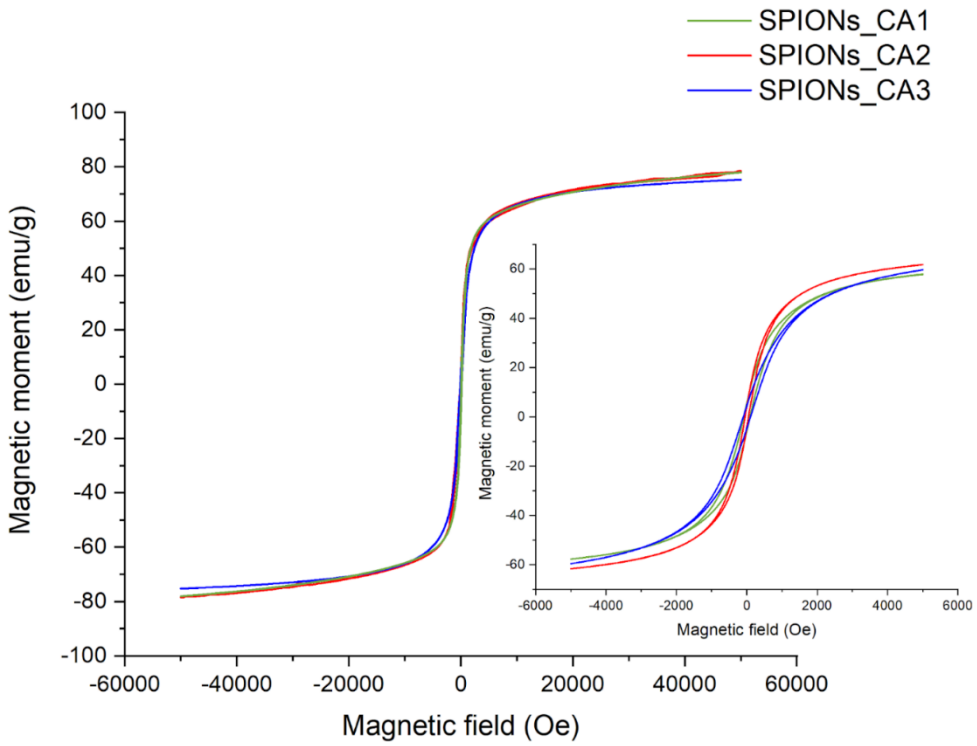


Figure S6: Magnetization as a function of magnetic field at 5K of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3. The inset shows the magnetization between – 1 Tesla to 1 Tesla (1 Tesla = 10 000 Oe).

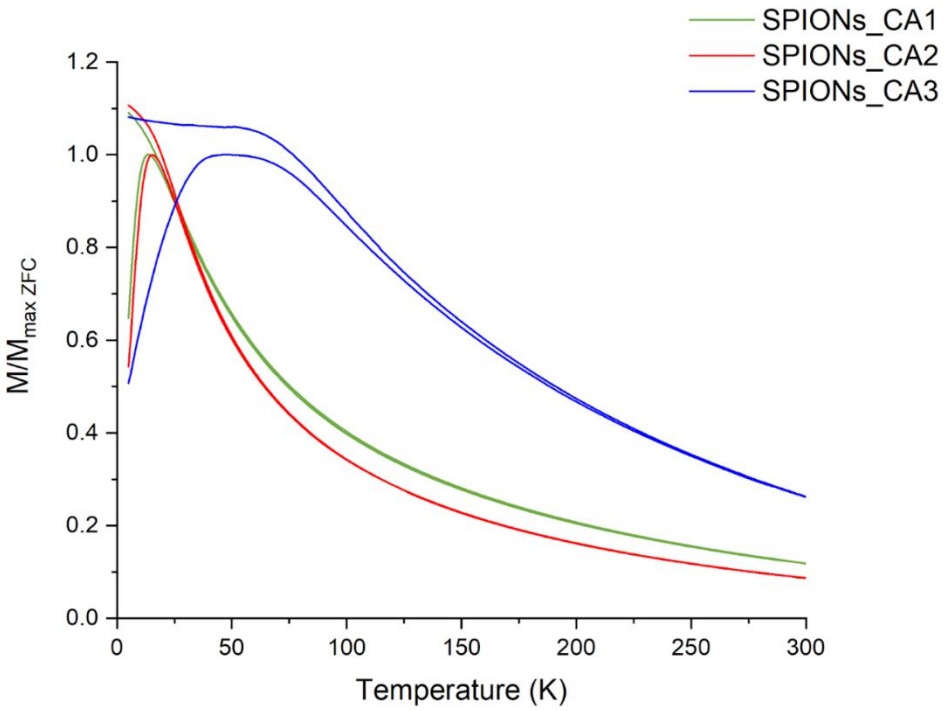


Figure S7: ZFC/FC curves of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3.

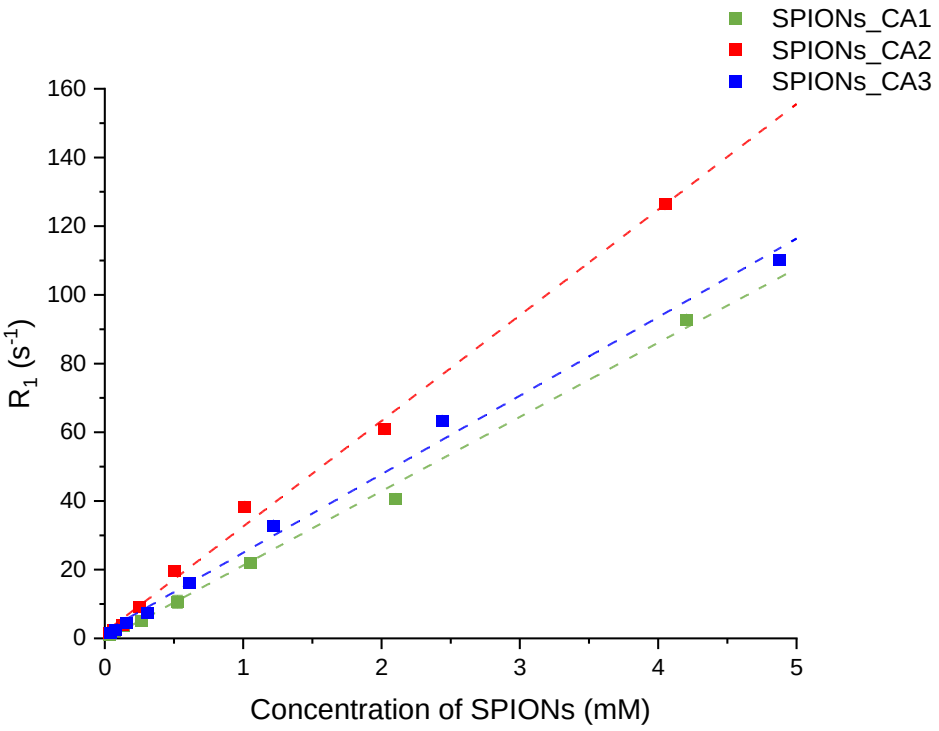


Figure S8: Longitudinal rate as a function of concentration of SPIONs_CA1, SPIONs_CA2 and SPIONs_CA3 at 25°C.

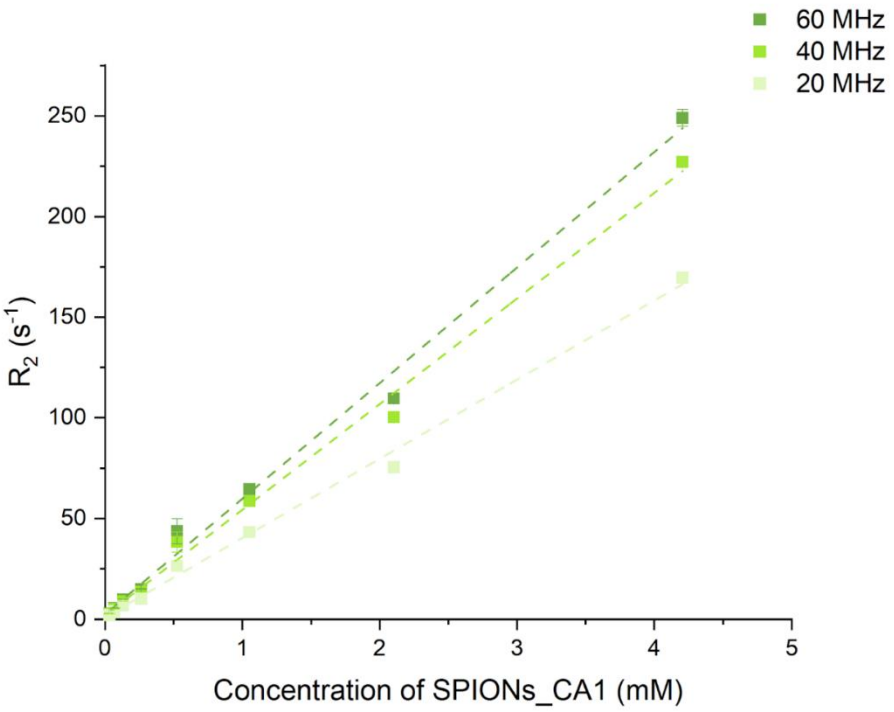


Figure S9: Transverse rate as a function of concentration of SPIONs_CA1 at 60 MHz, 40 MHz and 20 MHz at 25°C.

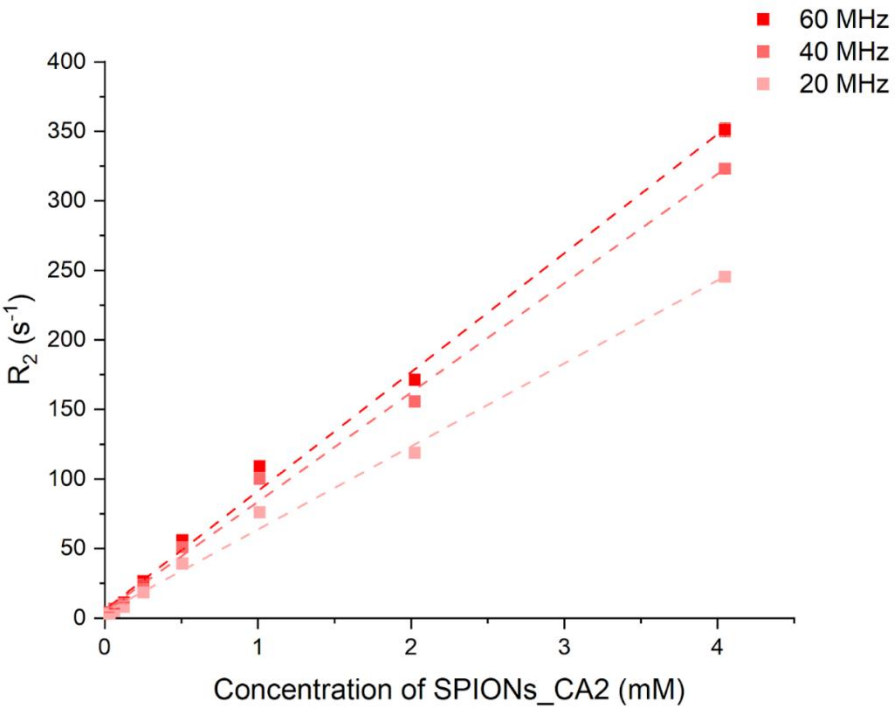


Figure S10: Transverse rate as a function of concentration of SPIONs_CA2 at 60 MHz, 40 MHz and 20 MHz at 25°C.

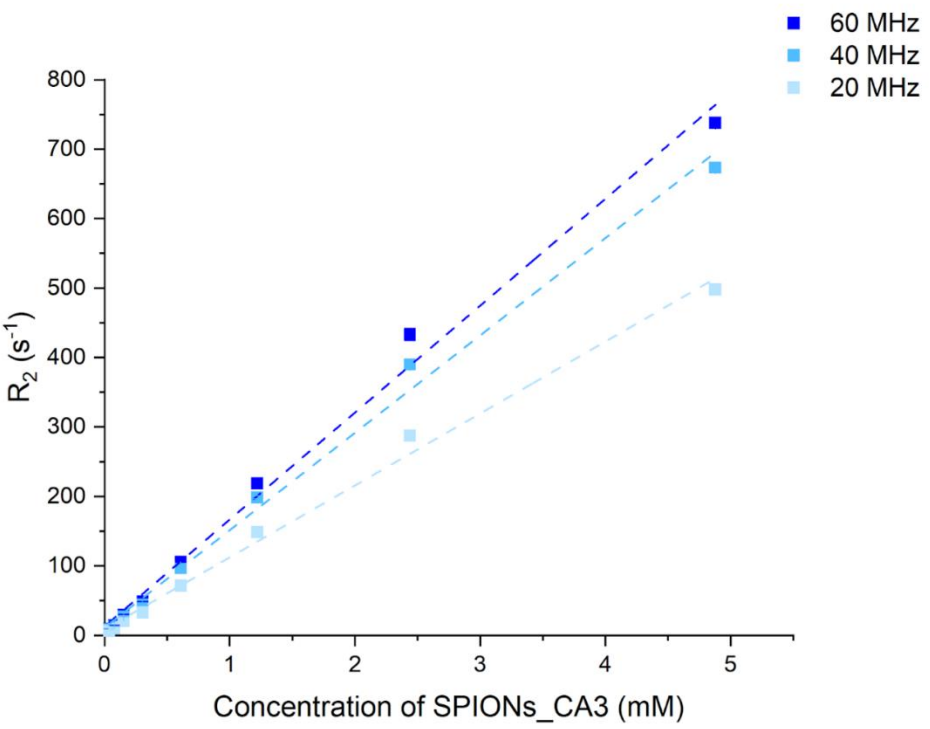


Figure S11: Transverse rate as a function of concentration of SPIONs_CA3 at 60 MHz, 40 MHz and 20 MHz at 25°C.

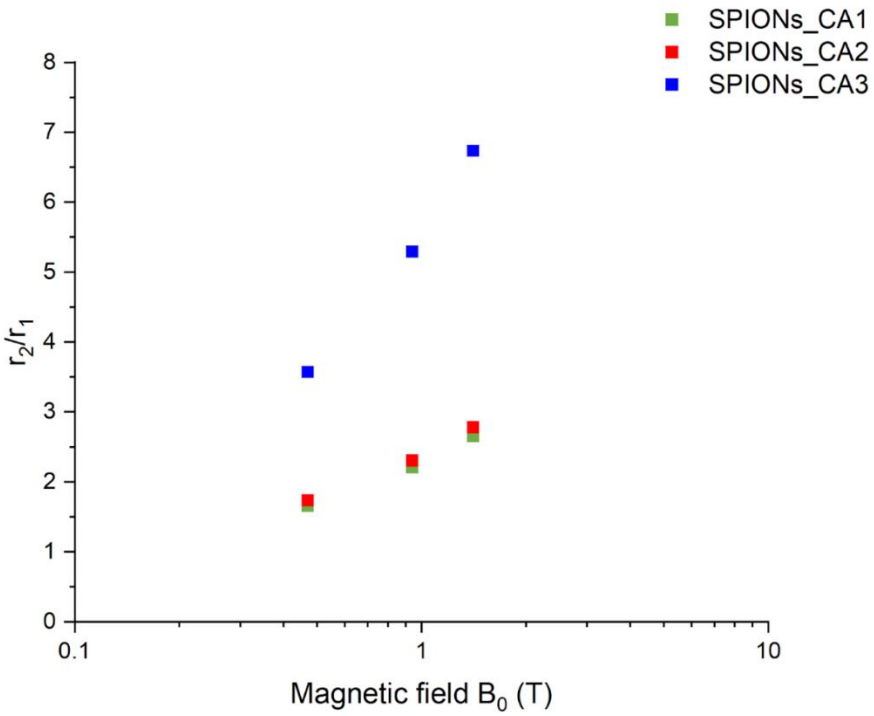


Figure S12: Ratio between transverse and longitudinal relaxivity (r_2/r_1) as a function magnetic field.

Conclusion générale

L'objectif des travaux de cette thèse consistait à développer et à optimiser une synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer dans une solution aqueuse pour des applications possibles dans le domaine biomédical. Parmi les applications du domaine biomédical, l'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer en tant qu'agent de contraste en IRM nécessite qu'elles présentent un comportement superparamagnétique. Pour ce faire, différentes méthodes de synthèse existent pour élaborer des nanoparticules avec un diamètre inférieur à 20 nm (afin de satisfaire la condition pour engendrer du superparamagnétisme). Les méthodes de synthèse décrites dans la littérature permettent, pour la plupart, l'obtention de nanoparticules d'oxyde de fer monodisperses fonctionnalisées stables en solvant organique ou avec une tendance à l'agrégation en solution aqueuse.

Dans ce contexte, une nouvelle méthode de synthèse a été développée au sein de notre équipe de recherche pour obtenir les nanoparticules voulues, c'est-à-dire de taille contrôlée, fonctionnalisées et stables en milieu aqueux. Il s'agit de la voie de synthèse micro-ondes.

Grâce aux ondes micro-ondes, une vibration des molécules du solvant au sein du réacteur apparaît et génère un échauffement local. La température au sein du réacteur de synthèse est alors homogène, permettant d'éviter un gradient de température important entre les bords du réacteur et le cœur : les nanoparticules d'oxyde de fer vont alors toutes croître à la même vitesse, diminuant ainsi la distribution de taille des nanoparticules. De plus, la méthode micro-ondes permet de réduire le temps de synthèse et d'assurer une grande répétabilité et reproductibilité des synthèses.

La première étape a consisté à comparer cette synthèse par voie micro-ondes avec une synthèse par coprécipitation classique. Pour les deux méthodes, un ajout d'un ligand, le citrate, est réalisé durant la synthèse afin de permettre d'augmenter la monodispersité des nanoparticules ainsi que leur stabilité dans la solution aqueuse. Le citrate a été sélectionné en raison de son abondance et de sa forte affinité via ses groupements carboxylates avec la surface d'oxyde de fer. Pour les deux voies, des nanoparticules d'oxyde de fer avec des propriétés superparamagnétiques sont obtenues. Cependant, avec la synthèse par coprécipitation, une agrégation des nanoparticules est toujours présente malgré la fonctionnalisation de surface par les citrates et la distribution de taille demeure assez large comparativement à la synthèse par voie micro-ondes. L'utilisation des micro-ondes permet ainsi d'augmenter la monodispersité des nanoparticules.

La synthèse par voie micro-ondes a ainsi été privilégiée dans ce travail pour obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques pour une utilisation en tant qu'agent de contraste pour l'IRM. L'apport des micro-ondes sur la synthèse étant peu décrit dans la littérature, pour mieux appréhender cette synthèse, une étude de l'influence des paramètres du micro-ondes sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques a été réalisée. Pour cela, plusieurs paramètres ont été sélectionnés comme le temps de chauffage (temps de la rampe de température et temps du plateau de chauffage), la température au sein du micro-ondes, la puissance du micro-ondes et le moment d'agitation de la solution. Pour chacun de ces paramètres, quatre valeurs ont été choisies. Pour vérifier toutes les combinaisons possibles, c'est-à-dire les cinq paramètres avec leurs quatre niveaux différents, un total de 1024 expériences aurait dû être réalisé (4^5 combinaisons). Pour réduire

ce nombre d'expériences, un plan d'expériences hyper gréco-latin a été mis en œuvre, permettant de passer de 1024 expériences à 16 expériences. Pour justifier la répétabilité et la reproductibilité de la synthèse, ce plan d'expériences a été réalisé trois par le même opérateur à des moments différents et une fois par un deuxième opérateur.

Pour chaque synthèse, une caractérisation systématique des propriétés des nanoparticules obtenues a été réalisée : la taille et la distribution de taille ont été déterminées par Microscopie Electronique en Transmission (MET), le diamètre hydrodynamique par la diffusion dynamique de la lumière (DLS), le paramètre de maille et la taille des cristallites grâce à la diffraction des rayons X (DRX). La présence de la couche organique a été caractérisée par des mesures en spectroscopie infra-rouge ainsi que des analyses thermogravimétriques (ATG). Enfin, des cycles d'aimantation (M(H)) et des mesures de l'aimantation en fonction de la température (ZFC-FC) ont été effectués pour accéder aux propriétés magnétiques. Chacune de ces techniques de caractérisation a conduit à une réponse pour le plan d'expériences. Puis, grâce à la loi d'additivité des réponses, une simulation des 1024 combinaisons a pu être générée afin de déterminer les paramètres optimums du micro-ondes : grâce à ces paramètres, les nanoparticules obtenues seront donc les plus optimisées pour des éventuelles applications dans le domaine biomédical. Pour confirmer le plan d'expériences, des expériences choisies au hasard ont été menées pour vérifier l'accord modèle – résultat de l'expérience. Sur les six expériences tirées au hasard, quatre présentaient des réponses proches des valeurs simulées et les deux autres essais montraient des différences en raison d'un paramètre important non considéré à ce stade : le taux de ligand. Un nouveau plan d'expériences a donc été réalisé sur le lavage des nanoparticules. En effet, cette étape de la synthèse est très peu décrite dans la littérature. Pour l'étudier, quatre paramètres d'un lavage par centrifugation (la vitesse de centrifugation, le temps de centrifugation, la nature du mauvais solvant et le ratio entre le bon et le mauvais solvant) ont été sélectionnés pour être optimisés. Puis, des caractérisations de la stabilité en solution aqueuse des nanoparticules obtenues ainsi que de leur quantité de ligands ont été réalisées via la DLS, la spectroscopie infra-rouge et les mesures d'ATG. Le lavage optimum consiste à réaliser une centrifugation pendant 5 minutes à 10 000 tours/min avec de l'éthanol à 99% et un ratio eau ultra-pure et éthanol de 1/3. Cependant, ce plan d'expérience n'a été réalisé qu'une seule fois et ne peut donc constituer une preuve statistique sur la répétabilité du lavage.

Ces différents plans d'expériences ont permis d'aboutir à une meilleure compréhension de la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques par micro-ondes et l'apport de ceux-ci a été mis en évidence.

En complément des paramètres physico-chimiques déterminés pour chaque échantillon dans les plans d'expériences, la composition en oxydes de fer au sein des nanoparticules a été déterminée. En effet, la synthèse étudiée met en jeu un mélange d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} pour pouvoir obtenir majoritairement de la magnétite Fe_3O_4 aux propriétés magnétiques recherchées pour l'application visée. Or, les nanoparticules sont stables dans un milieu aqueux pouvant générer une oxydation des ions ferreux en ions ferriques et, par conséquent, oxyder la magnétite en maghémite γ-Fe_2O_3. Pour distinguer ces deux formes d'oxyde de fer, il existe différentes techniques de caractérisation comme la diffraction des rayons X et la spectroscopie infra-rouge. Mais, ces techniques ne permettent pas de quantifier la proportion entre la magnétite et la maghémite. Pour pouvoir définir cette proportion, la spectroscopie Mössbauer a été utilisée : les nanoparticules synthétisées sont constituées de 54 à 65% de magnétite. Pour pouvoir déterminer cette quantité sur plusieurs échantillons et avec plus de facilité, la spectroscopie Raman a été envisagée. En effet, la magnétite et la maghémite ne présentent pas les

mêmes spectres Raman et une quantification peut être établie grâce à l'intensité de leurs bandes caractéristiques. En utilisant ce procédé, les pourcentages de magnétite présents dans nos échantillons sont compris entre 49% et 63%. Ces valeurs sont proches de celles obtenues en spectroscopie Mössbauer. Ainsi, grâce à la spectroscopie Raman, une estimation rapide du pourcentage de magnétite peut être obtenue sur un nombre d'échantillons conséquent avant une quantification plus précise par la spectroscopie Mössbauer d'échantillons sélectionnés.

Après avoir étudié les propriétés physico-chimiques de nos nanoparticules synthétisées, une éventuelle utilisation dans le domaine biomédical en tant qu'agent de contraste peut être envisagée sous réserve d'appliquer des étapes préliminaires de traitement des échantillons. En effet, une stérilisation des nanoparticules doit être effectuée pour éviter toutes contaminations avec les cellules. Plusieurs méthodes de stérilisation existent comme l'irradiation par les UV, la filtration, l'autoclave. Cette dernière méthode a été choisie pour stériliser nos échantillons et une étude a été menée pour s'assurer de la préservation des propriétés physico-chimiques des nanoparticules suite à cette étape. Les caractérisations menées ont démontré que la stérilisation par autoclave ne modifie ni le cœur inorganique des nanoparticules, ni la fonctionnalisation par la couche de ligands autour des nanoparticules. De plus, si ces nanoparticules sont utilisées en tant qu'agent de contraste, elles seront administrées au patient par voie intra-veineuse entraînant des interactions entre la solution de nanoparticules et le milieu biologique contenant des protéines et autres électrolytes (Na^+, K^+, Cl^-, …). Une étude de la stabilité des nanoparticules dans différents milieux de synthèse et de dispersion (eau ultra-pure et sérum physiologique) a donc été conduite. Les nanoparticules synthétisées directement dans du sérum physiologique et dispersées dans cette solution sont dans une matrice de NaCl et peuvent subir une agrégation : la synthèse directe en milieu physiologique n'est donc pas envisageable pour une application biomédicale. Au contraire, pour les nanoparticules synthétisées dans de l'eau ultra-pure et dispersées dans du sérum physiologique, une bonne stabilité est observée sans phénomène d'agrégation. Pour ce protocole, les nanoparticules présentent les mêmes propriétés physico-chimiques que celles synthétisées et dispersées dans de l'eau ultra-pure. Elles peuvent être utilisées dans des milieux biologiques sans subir de modifications physico-chimiques.

La dernière étape avant une utilisation sur des êtres vivants est une vérification de leur cytotoxicité. En effet, même si le corps humain possède du fer pour permettre le transport du dioxygène dans le corps par exemple, il existe une possible formation de radicaux à partir de nanoparticules d'oxyde de fer pouvant générer du stress oxydatif. Pour vérifier cette toxicité, l'internalisation cellulaire et l'activité mitochondriale ont été étudiées en collaboration avec le laboratoire IMoPA (Vandœuvre-lès-Nancy). Grâce à la formation d'un complexe bleu de Prusse, une visualisation du devenir des nanoparticules a pu être réalisée : les nanoparticules d'oxyde de fer s'internalisent bien dans les cellules sans l'aide d'agent facilitant l'endocytose (comme le PLL pour Poly-L-Lysine). Pour vérifier la mort des cellules, les premiers tests d'activité mitochondriale réalisés étaient des tests MTT. Pour les différents échantillons testés, une augmentation de l'activité mitochondriale au cours du temps (de 24h à 72h) avec des faibles concentrations en nanoparticules dans le milieu de culture a été observée. Pour une concentration élevée, une diminution de l'activité des mitochondries a été mise en évidence pouvant se traduire par une toxicité possible des nanoparticules. Pour confirmer cette hypothèse, des tests LDH (pour Lactate DésHydrogénase) ont été réalisés. Pour les échantillons étudiés, le

pourcentage de toxicité n'excède pas les 15% quelque soit la concentration en nanoparticules (Elle est même inférieure à 10% pour des concentrations en nanoparticules allant de 12,5 $\mu g.mL^{-1}$ à 400 $\mu g.mL^{-1}$.). Nos nanoparticules ne présente donc pas de toxicité apparente lors de leur mise en contact avec des cellules.

Enfin, une étude de la relaxivité des nanoparticules a été menée en collaboration avec le laboratoire CRM² (Vandœuvre-lès-Nancy). En effet, afin de pouvoir comparer l'efficacité de nos nanoparticules avec les agents de contraste commerciaux en IRM, les valeurs de relaxivité longitudinale (r_1) et transverse (r_2) doivent être définies considérant que les nanoparticules d'oxyde de fer qui permettent d'améliorer le contraste sur des images IRM pondérées en T_2 du fait de leur caractère superparamagnétique. Pour cela, des mesures de la vitesse de relaxation en fonction de la concentration en nanoparticules ont été réalisées. Les valeurs obtenues pour nos nanoparticules sont proches de celles des agents de contraste en IRM commercialisés comme l'Endorem®. La relaxivité longitudinale de nos nanoparticules en fonction de la fréquence du proton (et donc, de manière équivalente du champ magnétique) a été mesurée à champ cyclé. Grâce à ces mesures à champ cyclé, une prédiction de cette valeur de relaxivité longitudinale selon le champ magnétique peut être obtenue. En effet, les champs magnétiques utilisés en IRM augmentent de plus en plus pour améliorer la résolution. Or, la relaxivité est dépendante de ce champ magnétique et peut fortement être modifiée : plus le champ augmente, plus la relaxivité longitudinale diminue alors que la relaxivité transverse reste constante. Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont alors de bonnes candidates pour des examens IRM à haut champs.

Durant ce travail de thèse, une méthode de synthèse utilisant les micro-ondes a ainsi été développée au sein de notre équipe de recherche pour permettre l'élaboration de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques stables dans une solution aqueuse à des fins biomédicales. Cependant, plusieurs pistes d'améliorations peuvent être envisagées. En effet, une étude plus approfondie de la statistique des plans d'expériences menés pourrait être réalisée afin de déterminer au mieux les paramètres voulus pour nos nanoparticules. De plus, des techniques de caractérisations complémentaires pourraient être utilisées. Par exemple, des études de spectroscopie XPS permettraient de comparer la proportion de magnétite au sein de nos échantillons avec les valeurs obtenues en spectroscopie Raman et Mössbauer. Des mesures de potentiel Zêta permettraient de déterminer au mieux la charge au niveau de la couche de Stern et donc de connaître les interactions possibles entre nos nanoparticules et les différentes protéines présentes au sein d'un organisme vivant. Enfin, des mesures PDF pourraient être réalisées afin de déterminer de manière précise l'environnement chimique local des différents atomes de fer.

D'un point de vue biologique, des études sur des petits organismes (comme des souries) sont envisageables pour vérifier d'une part la toxicité des nanoparticules selon la concentration et d'autre part pour mesurer leur potentiel en tant qu'agent de contraste.

Les travaux menés dans cette thèse ont permis de montrer le potentiel des nanoparticules synthétisées en tant qu'agent de contraste négatif en IRM. Pour améliorer ces résultats, plusieurs solutions peuvent être envisagées. La première serait d'augmenter la taille du cœur inorganique d'oxyde de fer. En effet, en augmentant la taille des nanoparticules (passant ainsi de 3-4 nm à 15 nm environ), les valeurs d'aimantation à saturation seraient grandement augmentées, permettant d'avoir

une meilleure efficacité en IRM. De plus, les nanoparticules seraient mieux cristallisées et une meilleure quantification de la magnétite pourrait être réalisée. Pour arriver à ce résultat, le moment d'ajout du ligand est identifié comme le paramètre à moduler. En ajoutant le ligand quelques minutes après le début de synthèse, les nanoparticules d'oxyde de fer commenceront à croître sans contrainte dues aux ligands et la taille du cœur inorganique augmentera. Un cliché MET d'un premier essai est présenté en Figure C. 1 et montre l'augmentation de la taille des nanoparticules et une tendance à l'agrégation. La réalisation et l'exploitation d'un plan d'expériences relatif au lavage en fonction de la quantité de ligand introduite et du moment d'ajout devrait permettre de moduler significativement la taille des nanoparticules en assurant leur stabilité et en limitant leur agrégation.

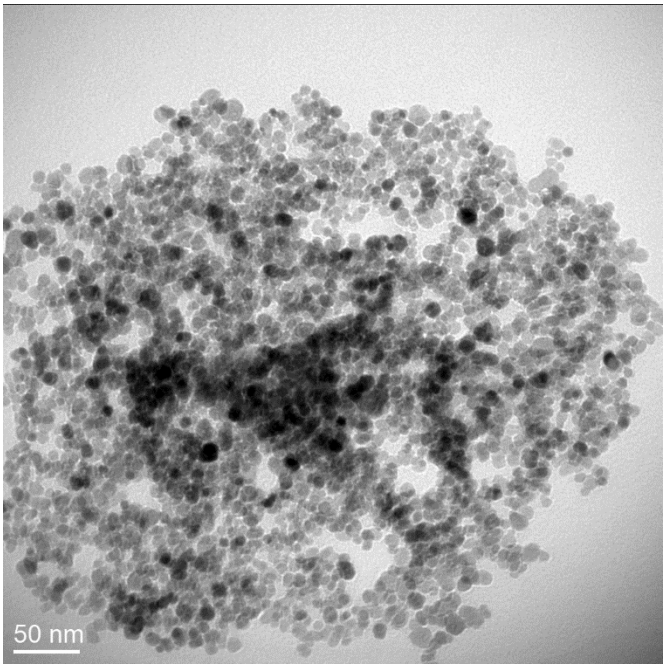


Figure C. 1 : Micrographie MET de nanoparticules d'oxyde de fer avec un diamètre de 14nm.

Une autre solution pour améliorer le contraste IRM serait une augmentation du diamètre hydrodynamique par la fonctionnalisation. En effet, la relaxivité des agents de contraste est dépendante du diamètre hydrodynamique, c'est-à-dire de la somme du diamètre du cœur inorganique du diamètre de la couche de ligands et du diamètre de la couche de solvatation. Pour augmenter ce diamètre hydrodynamique, l'utilisation d'autres ligands peut être envisagée. Par exemple, en utilisant un ligand avec une longueur plus grande que l'acide citrique, le diamètre doit augmenter. Cependant, les interactions entre les différentes nanoparticules et avec le milieu seront alors modifiées. Afin de pouvoir synthétiser les nanoparticules fonctionnalisées en une étape et les utiliser dans des milieux aqueux (en évitant une étape de transfert de phase), les molécules utilisées doivent permettre une solubilité dans l'eau. Une solution alternative au remplacement des citrates lors de la synthèse est le greffage sur ceux-ci de molécules via la « click chemistry » après la synthèse présentée dans cette thèse. En effet, au moins un groupement carboxylate par ligand n'est pas lié au cœur d'oxyde de fer et peut donc faire l'objet d'une modification : une molécule peut alors être attachée à ce groupement pour augmenter le diamètre hydrodynamique. La dernière solution peut être une encapsulation d'un

ensemble de nanoparticules dans des microsphères organiques. En effet, un ensemble de nanoparticules permettrait d'atteindre les mêmes propriétés qu'une nanoparticule de diamètre plus élevée tout en évitant une agrégation au sein de la solution. Par cette encapsulation, tout phénomène d'oxydation des nanoparticules et tout phénomène d'interaction électrostatique avec des protéines pouvant générer une agrégation seraient éviter. Enfin, dans ces microsphères organiques, des agents anti-cancéreux pourraient être ajoutés. Ainsi, par ce système, nous passerions de nanoparticules d'oxyde de fer pour du diagnostic (IRM) à des nanoparticules pour du théranostique. Différentes coquilles de molécules organiques pourraient être considérées comme des microsphères de PLGA (acide poly lactique co glycolique) de plus en plus utilisées pour le transport de médicaments dans les organismes ou des coquilles de squalène couplé avec de la vitamine E.

Les nanomatériaux deviennent de plus en plus courants dans la vie quotidienne et dans des domaines différents comme l'environnement pour la dépollution des eaux et des sols, le stockage de l'énergie pour les batteries ou le stockage de l'information pour la spintronique. Parmi les nanomatériaux, ceux présentant un caractère magnétique sont particulièrement étudiés notamment pour des applications dans le domaine biomédical. Ainsi, les nanoparticules d'oxyde de fer suscitent un grand intérêt scientifique pour le domaine biomédical du fait de leur biocompatibilité, de la simplicité de leur synthèse ainsi que de son faible coût. Leurs propriétés superparamagnétiques (pas d'aimantation à température ambiante) permettent leur utilisation à des fins de diagnostic (agent de contraste en IRM), thérapie (hyperthermie, vectorisation) ou les deux.

Au cours de ces travaux de thèse, la première étape a consisté à développer une nouvelle méthode de synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques fonctionnalisées et stables dans une solution aqueuse : la synthèse micro-ondes. Pour permettre un développement optimisé de cette synthèse, un plan d'expériences a été réalisé. Les synthèses ont ensuite été caractérisées par différentes techniques (MET, DLS, DRX, IRTF, spectroscopie Raman, spectroscopie Mössbauer, ATG, caractérisations magnétiques) pour déterminer au mieux leurs propriétés physico-chimiques : les nanoparticules obtenues d'un diamètre compris entre 2,5 et 4 nm sont stables dans des solutions aqueuses. Dans une deuxième étape le comportement biologique de ces nanoparticules (internalisation cellulaire, cytotoxicité, activité mitochondriale) a été étudié. Puis, une étude de la relaxivité des nanoparticules synthétisées a été menée afin de pouvoir comparer leur efficacité à celle des agents de contraste commerciaux comme l'Endorem®.

Mots clés : nanoparticules, oxyde de fer, micro-ondes, agent de contraste

Nanomaterials are becoming more and more common in everyday life and in different fields such as the environment for water and soil decontamination, energy storage for batteries or information storage for spintronics. Among the nanomaterials, those with a magnetic character are particularly studied for applications in the biomedical field. Thus, iron oxide nanoparticles are of great scientific interest in the biomedical field because of their biocompatibility, the simplicity of their synthesis and their low cost. Their superparamagnetic properties (no magnetisation at room temperature) allow them to be used for diagnosis (MRI contrast agent), therapy (hyperthermia, vectorisation) or both.

During this thesis, the first step was to develop a new method for the synthesis of superparamagnetic functionalized iron oxide nanoparticles that are stable in an aqueous solution: microwave synthesis. To allow an optimised development of this synthesis, an experimental design was carried out. The syntheses were then characterised by different techniques (TEM, DLS, XRD, FTIR, Raman spectroscopy, Mössbauer spectroscopy, TGA, magnetic measurements) to determine their physico-chemical properties as well as possible: the nanoparticles obtained with a diameter between 2.5 and 4 nm are stable in aqueous solutions. In a second step, the biological behaviour of these nanoparticles (cellular internalisation, cytotoxicity, mitochondrial activity) was studied. Then, a study of the relaxivity of the synthesised nanoparticles was carried out in order to be able to compare their effectiveness with that of commercial contrast agents such as Endorem®.

Keywords: nanoparticles, iron oxide, microwave, contrast agent