



HAL
open science

**Élaboration de nanoparticules hybrides
multifonctionnelles à base de silice par microémulsion
inverse : application à la conception d'un agent
antibactérien**

Bocar Noël Diop

► **To cite this version:**

Bocar Noël Diop. Élaboration de nanoparticules hybrides multifonctionnelles à base de silice par microémulsion inverse : application à la conception d'un agent antibactérien. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10281 . tel-00838729

HAL Id: tel-00838729

<https://theses.hal.science/tel-00838729>

Submitted on 26 Jun 2013

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE de CHIMIE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 16 décembre 2010

par

Monsieur Bocar Noël DIOP

**Élaboration de nanoparticules hybrides multifonctionnelles à
base de silice par microémulsion inverse.
Application à la conception d'un agent antibactérien**

Directeur de thèse : Professeur Thierry HAMAIDE

Jury :

M. Didier LE CERF (Rapporteur), Université de Rouen

M. Jean-Luc SIX (Rapporteur), ENSIC Nancy

M. Thierry HAMAIDE (Directeur de thèse), Université Claude Bernard Lyon 1

M. Olivier TILLEMENT (Examinateur), Université Claude Bernard Lyon 1

M. Thierry DELAIR (Examinateur), Université Claude Bernard Lyon 1

M. Stéphane ROUX (Examinateur), Université Besançon

Remerciements

Je voudrais remercier les personnes qui ont permis, d'une manière ou d'une autre, l'existence de ce travail.

J'exprime d'abord ma reconnaissance à M. Thierry HAMAIDE pour la confiance qu'il m'a témoignée, son absence d'apriori et la patience dont il a fait preuve durant la rédaction de cette thèse. Je lui dois aussi mon initiation à la Click Chemistry.

Je remercie également M. Olivier TILLEMENT de m'avoir accueilli au début dans son équipe et M. Stéphane ROUX pour sa confiance lors de mes premiers pas en recherche et surtout pour les nombreuses discussions que nous avons eues.

Je remercie M. Didier LE CERF et M. Jean-Luc SIX d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également M. Thierry DELAIR d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail de thèse.

Je suis également redevable à M. Frédéric CHAPUT pour ses remarques pertinentes lors de l'écriture de cette thèse.

Je souhaite remercier M. Pascal PERRIAT, Meigui OU pour l'accès au microscope électronique à transmission ainsi qu'à Samir BENLECBIR.

Merci encore à tous les doctorants et autres membres et ex-membres de l'équipe FENNEC pour leur bonne humeur et particulièrement à Anne-Charlotte FAURE.

Au LMB, je souhaite remercier Sylvie, Aline, Christelle et Siam pour leur accueil et pour mes problèmes administratifs et bureautiques qu'elles ont toujours su résoudre avec bonne humeur.

Je remercie grandement M. Michael Burnet de la société Sinovo pour les tests antibactériens.

Je tiens également à remercier M. NDIAYE ainsi que M. Cheikh Mbacké SAMB, consul général du Sénégal à Lyon.

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait probablement jamais été réalisé si je n'avais pas eu le soutien de ma famille. L'incitation au dépassement et le respect de mes choix dont ils ont toujours fait preuve leur réservent une place des plus particulières.

Je remercie également tous mes amis en France ou à l'étranger. Je pense à Pape Moussa DIALLO, Modou SECK, Hyane, Oumar, Serge, Modou DIALLO, Simon, Bernard, Steve et à notre très regretté Samba Diama KAMARA.

Résumé

Cette thèse a pour objectif l'élaboration de nanoparticules hybrides à base de silice par microémulsion inverse. Les nanoparticules de silice constituent une matrice de base permettant de confiner et de protéger des molécules organiques et/ou des nanoparticules métalliques. L'incorporation combinée de différentes entités dans la silice ouvre ainsi de larges perspectives de par l'introduction de nouvelles propriétés liées à la structure hybride.

Afin d'élaborer de tels objets, nous avons utilisé des micelles inverses à base d'eau, de Triton X-100, d'hexanol et de cyclohexane comme milieu réactionnel. L'influence des conditions opératoires sur le contrôle de la taille des micelles inverses a d'abord été étudiée. Ces micelles inverses ont ensuite été mises à profit comme nanoréacteurs pour la synthèse de nanoparticules de silice par procédé sol-gel en utilisant les précurseurs alcoxysilanes adéquats. Nous avons regardé dans quelle mesure il était possible de contrôler la taille des nanoparticules de silice en fonction du pourcentage d'eau par rapport au tensioactif. Il a ainsi été possible d'accéder de façon reproductible à des nanoparticules avec de tailles variables, de 30 nm à 200 nm.

Nous avons ensuite regardé qu'il était possible d'encapsuler au sein de cette matrice nanométrique des fluorophores et des nanoparticules d'or et d'argent de façon contrôlée. En vue d'assurer une bonne stabilisation colloïdale en solution, ces nanoparticules hybrides ont été fonctionnalisées d'une part par ajout d'un silane fonctionnel et d'autre part par click chemistry. Nous avons ainsi pu montrer qu'il est possible d'effectuer dans un même milieu micellaire l'ensemble des processus de fabrication de la nanoparticule hybride, de la matrice de silice à sa fonctionnalisation en passant par l'incorporation d'entités fonctionnelles. Cette méthode de synthèse séquentielle nous a ainsi permis de supprimer les étapes de purification et de redispersion qui peuvent s'avérer problématiques dans les procédés classiques.

L'ensemble de ce travail a été mis à profit pour la conception d'un agent antibactérien à base de nanoparticules argent/silice capables d'empêcher la prolifération bactérienne grâce au relargage progressif des ions argent. Les tests effectués en solution comme sur le coton et le polyéthylène téréphtalate imprégnés montrent effectivement un caractère antibactérien certain de ces systèmes.

Mots clefs : *Micelle inverse, Nanoparticules, Silice, Or, Argent, Fluorescent, Cœur/coquille, Encapsulation, One-pot, Click chemistry, Multifonctionnel, Coton, PET, Antibactérien*

**Elaboration of multifunctional silica-based hybrid nanoparticles by reverse microemulsion.
Application to the design of an antibacterial agent.**

Abstract

This thesis aims at developing hybrid nanoparticles based on silica by reverse microemulsion. The silica nanoparticles are the basic matrix containing and protecting organic molecules and/or metallic nanoparticles. The combined incorporation of different entities within the silica opens wide prospects for the introduction of new properties related to the hybrid structure.

To develop such objects, we used reverse micelles based on water, Triton X-100, hexanol and cyclohexan as reaction medium. The influence of operating conditions on the control of the size of reverse micelles was first studied. These micelles were then set to be used as nanoreactors for the synthesis of silica nanoparticles by sol-gel using suitable alkoxysilanes precursors. We monitored how it was possible to control the size of silica nanoparticles based on the water to surfactant ratio. It was thus possible to prepare in a reproducible way nanoparticles with sizes varying from 30 nm to 200 nm

We then investigated the possibility to encapsulate, in this nanoscaled matrix, fluorophores and nanoparticles of gold and silver in a controlled manner. To ensure a good colloidal stability in solution, these hybrid nanoparticles were, on the one hand, modified by adding a functional silane and, on the other hand, by click chemistry. We have thus shown that it is possible to perform, in a same micellar media, all of manufacturing process of the hybrid nanoparticle, from the silica matrix to its functionalization passing by the incorporation of functional entities. This method of sequential synthesis allowed us to bypass the purification and redispersion steps that can be problematic in the conventional methods.

All this work has been extended to the design of an antibacterial agent based of silver/silica nanoparticles, capable of preventing bacterial growth through the gradual release of silver ions. Tests conducted in solution on the impregnated cotton and polyethylene terephthalate indeed show an interesting antibacterial character of these systems.

Liste des abréviations

- (Ag@SiO₂-FITC)-MPEG** = Ag@SiO₂-FITC fonctionnalisée avec du MPEG
- ADN** = acide désoxyribonucléique
- Ag@SiO₂** = nanoparticules de silice dans lesquelles sont encapsulées des nanoparticules d'argent
- Ag@SiO₂-COOH** = Ag@SiO₂ fonctionnalisée avec le TESPAS
- Ag@SiO₂-FITC** = nanoparticules de silice dans lesquelles sont encapsulées conjointement des nanoparticules d'argent et de la FITC
- Ag@SiO₂-NH₂** = Ag@SiO₂ fonctionnalisée avec l'APTES
- Ag-DTDTPA** = nanoparticules d'argent stabilisées par des molécules de DTDTPA
- Ag-DTDTPA@SiO₂** = nanoparticules de silice dans lesquelles sont encapsulées des nanoparticules Ag-DTDTPA
- AOT** = bis(2-éthylhexylsulfosuccinate)
- APTES** = 3-aminopropyltriéthoxysilane
- APTES-FITC** = molécules d'APTES couplée à une molécule de FITC
- Au@SiO₂** = nanoparticules de silice dans lesquelles sont encapsulées conjointement des nanoparticules d'or
- Au@SiO₂-COOH** = Au@SiO₂ fonctionnalisées avec le TESPAS
- Au@SiO₂-FITC** = nanoparticules de silice dans lesquelles sont encapsulées conjointement des nanoparticules d'or et de la FITC
- Au@SiO₂-NH₂** = Au@SiO₂ fonctionnalisées avec l'APTES
- Au-DTDTPA** = nanoparticules d'or stabilisées par des molécules de DTDTPA
- Au-DTDTPA@SiO₂** = nanoparticules de silice dans lesquelles sont encapsulées des nanoparticules Au-DTDTPA
- B. pumilus*** = *Bacillus pumilus*
- CI** = conversion interne
- CIS** = conversion inter-système
- cmc** = concentration micellaire critique
- CuAAC** = Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
- CVD** = dépôt plasma
- D.O_{600nm}** = densité optique à 600 nm
- DHL** = Différence Hydrophile-Lipophile
- DIPEA** = N,N' diisopropyl éthylamine
- DLS** (Dynamic Light Scattering) = diffusion dynamique de la lumière
- DMF** = Diméthylformamide
- DTDTPA** = Dithiol diéthylénetriaminepentacétique Acide
- DTPA** = diéthylénetriaminepentacétique Acide
- E. coli*** = *Escherichia coli*
- FITC** = isothiocyanate de fluorescéine
- FITC@SiO₂** = nanoparticules de silice dans lesquelles sont encapsulées des molécules de FITC

flavine@SiO₂ = nanoparticules de silice dans lesquelles sont encapsulées des molécules de flavine

Gram - = bactéries Gram-négatives

Gram + = bactéries Gram-positives

HAADF = High Angle Annular Dark Field

HLB = Balance Hydrophile-Hydrophobe

ICP = plasma à couplage inductif

IFTH = Institut Français du Textile et de l'Habillement

IRM = Imagerie par Résonance Magnétique

K. pneumoniae = *Klebsiella pneumoniae*

MEB = microscopie électronique à balayage

mélange E/H = mélange eau dans huile

mélange H/E = mélange huile dans eau

MET = microscopie électronique à transmission

MIC = concentration minimale inhibitrice

milieu LB = milieu Lysogeny Broth

MPEG = méthoxy poly(éthylèneglycol)

MPEG-N₃ = méthoxy poly(éthylèneglycol) modifié par une fonction azoture terminale

MPTMS = mercaptopropyltriméthoxysilane

Nps = nanoparticules

OPNTC = o-(propargyloxy)-N-(triéthoxysilylpropyl) carbamate

PEG = poly(éthylèneglycol)

PET = polyéthylène téréphtalate

PVD = dépôt par pulvérisation cathodique

PVP = poly(vinylpyrrolidone)

QDots = Quantum Dots = nanoparticules à base de matériaux de type semi-conducteur

S. aureus = *Staphylococcus aureus* = staphylocoque doré

SARM = *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline

SAXS = diffusion des rayons X aux petits angles

SERS = spectroscopie Raman exaltée de surface

STEM = scanning transmission electron microscopy

TEOS = tétraéthoxysilane

TESPAS = 3-(triéthoxysilylpropyl) anhydride succinique

théorie DLVO = théorie de Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek

TIP = température d'inversion de phase

UFC = nombre d'unités ayant formé une colonie bactérienne

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	4
CHAPITRE I SYSTEME MICELLAIRE «NANOREACTEUR» POUR NANOPARTICULES	8
I.1 Introduction	9
I.2 Concepts généraux des émulsions et microémulsions	9
I.2.1 Les tensioactifs et la formation d'agrégats	10
I.3 Procédé sol-gel	16
I.3.1 L'hydrolyse	17
I.3.2 La condensation	17
I.4 Synthèse de nanoparticules de silice	18
I.4.1 Utilisation des microémulsions	19
I.4.2 Préparation des nanoparticules de silice	23
I.5 Conclusion	35
CHAPITRE II ENCAPSULATION DE MOLECULES ET DE NANO-OBJETS DANS LA MATRICE DE SILICE	36
II.1 Introduction	37
II.2 Les fluorophores organiques	37
II.2.1 Principe de la fluorescence	37
II.2.2 Caractéristiques des fluorophores	39
II.3 Encapsulation de fluorophores organiques dans la matrice de silice	41
II.3.1 Encapsulation de la flavine Maxilon 10GFF (flavine).....	42
II.3.2 Encapsulation de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).....	45
II.4 Encapsulation de nano-objets dans la matrice de silice	55
II.4.1 Méthodes de préparation et d'encapsulation de nanoparticules d'or et d'argent	55
II.4.2 Encapsulation en deux étapes.	58
II.4.3 Synthèse One-pot séquentielle de structure cœur@coquille métal@silice.	64
II.4.4 Propriétés et caractérisations spectroscopiques.....	71
II.5 Mélange métallique/organique dans la matrice de silice	75
II.6 Conclusion	78
CHAPITRE III FONCTIONNALISATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES	80
III.1 Introduction	81
III.2 Stabilité colloïdale des nanoparticules	81

III.3 Stabilisation par greffage d'organosilanes chargés	85
III.3.1 Caractérisation morphologique	87
III.3.2 Mesure de potentiel zêta	88
III.4 Stabilisation par greffage de macromolécules par click chemistry	90
III.4.1 La réaction de Click Chemistry	91
III.4.2 Greffage de molécule de polyéthylèneglycol in situ dans la microémulsion par CuAAC.....	93
III.5 Conclusion et perspectives	99
 CHAPITRE IV EFFET ANTIBACTERIEN DES NANOPARTICULES AG@SiO₂ : GREFFAGE SUR	
TEXTILE MEDICAL	101
IV.1 Introduction	102
IV.2 Activité antimicrobienne de l'argent	103
IV.2.1 Mécanisme d'action	103
IV.2.2 Les produits antibactériens à base d'argent	104
IV.3 Effet antibactérien des nanoparticules : Ag-DTDTPA, Ag-DTDTPA@SiO₂ et Ag@SiO₂	105
IV.3.1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne des nanoparticules Ag@SiO ₂	105
IV.3.2 Concentration minimale inhibitrice (MIC)	108
IV.4 Textile antibactérien	114
IV.4.1 Incorporation des nanoparticules Ag@SiO ₂ sur une bande médicale de coton.	114
IV.4.2 Tests antibactériens.....	115
IV.4.3 Nature du greffage et tenue au lavage	123
IV.5 Greffage des nanoparticules antibactériennes sur des fibres de polyéthylène téréphtalate (PET)	127
IV.5.1 Procédure de greffage des nanoparticules.....	128
IV.6 Conclusion	130
CONCLUSION	131
ANNEXES	134
ANNEXE A PARTIE EXPERIMENTALE	135
A.I Origine des réactifs de synthèse	135
A.II Synthèses des nanoparticules : Description pour %W = 90,8%	136
A.II.1 Nanoparticules de silice	136
A.II.2 Nanoparticules de flavine@SiO ₂	136
A.II.3 Nanoparticule FITC@SiO ₂	137
A.II.4 Nanoparticule Au et Ag-DTDTPA@SiO ₂	137
A.II.5 Nanoparticule Ag@SiO ₂ one pot	138
A.II.6 Nanoparticule Au@SiO ₂	138
A.II.7 Nanoparticule Ag-FITC@SiO ₂ et Au-FITC@SiO ₂	138
A.II.8 Nanoparticule Ag@SiO ₂ -NH ₂ et Ag@SiO ₂ -COOH	138

A.II.9 Nanoparticule Au@SiO ₂ -NH ₂ et Au@SiO ₂ -COOH.....	139
A.II.10 Nanoparticule Ag@SiO ₂ -FITC fonctionnalisée par un MPEG par click chemistry.....	139
A.III Techniques expérimentales	140
A.III.1 Viscosité.....	140
A.III.2 Diffusion Dynamique de Lumière (DLS)	140
A.III.3 Analyses élémentaire par plasma à couplage inductif (ICP).....	141
A.III.4 Mesures électrochimiques	141
A.III.5 Spectroscopie infrarouge.....	141
A.III.6 Spectroscopie UV-visible	141
A.III.7 Spectroscopie de fluorescence	141
A.III.8 Microscopies Electroniques.....	141
A.III.9 Potentiel ζ	142
ANNEXE B DOSAGE PAR FLUORESCENCE DE LA QUANTITE DE FITC NON ENCAPSULEE.....	143
ANNEXE C MASSE D'UNE NANOPARTICULE FITC@SIO₂ (0,4%)	145
ANNEXE D DOSAGE ELECTROCHIMIQUE DES IONS ARGENT	146
BIBLIOGRAPHIE.....	147

Introduction générale

A l'heure où le débat sur les impacts sociaux, économiques et environnementaux des nanotechnologies s'installe dans le domaine public ^(1; 2), les matériaux de dimension nanométrique (nanomatériaux) tendent à prendre une part de plus en plus importante dans notre quotidien. Cet essor est directement lié au fait que la synthèse à l'échelle nanométrique de matériaux étudiés jusqu'alors exclusivement à l'état massif a révélé des changements originaux de leurs propriétés. En effet, la forte diminution de la taille du matériau entraîne à la fois une augmentation considérable du rapport surface/volume qui confère une surface spécifique importante à l'objet ainsi que le confinement du mouvement électronique à une échelle de longueur comparable ou inférieure au rayon de Bohr ou au libre parcours moyen des électrons. Ces changements créent donc des phénomènes quantiques susceptibles d'influencer les propriétés optiques, électroniques, magnétiques, catalytiques, et photochimiques des nanomatériaux.

Les exemples les plus frappants sont les matériaux semi-conducteurs qui, à une taille nanométrique, présentent une fluorescence intrinsèque dépendante de la taille de l'objet ainsi que les métaux nobles, pour lesquels est observée l'apparition d'un pic d'absorption dans le domaine du visible lorsqu'ils sont stabilisés à une taille nanométrique. Ce phénomène, appelée absorption plasmon de surface, résulte de l'oscillation collective des électrons de la bande de conduction et donne lieu à des colloïdes colorés.

Toutefois parmi les différents matériaux synthétisés à l'échelle nanométrique, la silice est incontestablement celui qui a le plus attiré l'attention en particulier depuis la description par Stöber et *al* ⁽³⁾ en 1968 de sa synthèse par voie sol-gel. Plusieurs raisons permettent d'expliquer cet engouement. La synthèse par polycondensation hydrolytique de précurseurs alcoxysilanes est aisée à mettre en œuvre et les nanoparticules de silice obtenues peuvent être chimiquement fonctionnalisées grâce aux groupements silanol présents en surface. Le caractère non hydrolysable de la liaison silicium-carbone permet de plus d'introduire au sein du réseau de polysiloxane des molécules organiques par l'intermédiaire d'organosilanes. En outre la silice est considérée comme un matériau non toxique et jouit également d'une bonne stabilité thermique et chimique. Dans ce contexte les nanoparticules de silice se sont avérées particulièrement attractives pour l'encapsulation d'entités fonctionnelles dans le but de former des composés hybrides. Ces nanoparticules hybrides possèdent de nouvelles propriétés ou combinent, le cas échéant, différentes

propriétés. Elles ont notamment été utilisées pour des applications en biologie ^(4; 5), en optique ⁽⁶⁾ et en électronique ⁽⁷⁾.

L'exploitation des propriétés des nanomatériaux nécessite des méthodes d'élaboration performantes. En effet, dans le cadre de la valorisation des nanomatériaux, l'approche théorique de leurs propriétés ne peut être dissociée des défis que posent leur synthèse, stabilisation et caractérisation ⁽⁸⁾. Sur ces bases, les méthodes de synthèse mises au point doivent permettre un contrôle effectif des paramètres tels que la taille, la morphologie, la composition ainsi que le degré d'agrégation des nanoparticules dans le cas de systèmes dispersés ⁽²⁾.

De nombreuses techniques d'élaboration ont été développées dans ce sens avec plus ou moins de réussite ^(9; 10; 11). Néanmoins certains procédés chimiques en particulier ceux qui peuvent être réalisés dans des conditions dites douces se sont montrés très performants, notamment dans l'élaboration de nanomatériaux hybrides. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés au cours de cette thèse aux synthèses en milieu liquide faisant appel à des agents de contrôle de taille et de forme. Ceux-ci peuvent être des molécules qui viennent s'adsorber à la surface des nanoparticules ou des espèces capables de s'organiser sous forme de « nanoréacteurs » à l'intérieur desquels pourront se dérouler les réactions.

Dans ce contexte, l'objectif du travail présenté dans ce manuscrit est d'utiliser les potentialités des milieux organisés que sont les microémulsions pour mettre au point une méthode de synthèse de nanoparticules en vue d'applications biomédicales, et plus particulièrement pour la conception d'un nouvel agent antibactérien composé de nanoparticules d'argent encapsulées dans une matrice nanométrique de silice. Ce type de matériau, imaginé comme un réservoir d'ions Ag^+ est particulièrement intéressant dans la mesure où il permet de combiner les propriétés antibactériennes des ions Ag^+ largement décrites dans la littérature à la possibilité de les relarguer progressivement et donc d'envisager une action dans le temps. Cette propriété est en effet particulièrement recherchée pour accéder à une action biocide optimale.

En pratique la voie de synthèse choisie nous permettra en différentes étapes successives d'accéder à des nanoparticules à base de silice de taille, de forme, de composition et d'état de surface contrôlés puis de leur conférer des propriétés modulables en vue de leur utilisation.

Dans le premier chapitre seront décrites les propriétés structurales et thermodynamiques qui caractérisent les émulsions et les microémulsions ainsi que les caractéristiques du procédé sol-gel et son utilisation pour l'obtention de nanoparticules de silice en particulier en milieu de microémulsion inverse. Ce premier chapitre sera ensuite consacré à une étude détaillée du système micellaire inverse triton X 100/hexanol/eau-/cyclohexane en vue de discerner les différents paramètres qui nous permettront d'élaborer par hydrolyse-condensation de précurseurs alcoxysilanes des nanoparticules de silice avec un contrôle optimal de la taille.

La matrice de silice ainsi synthétisée sera ensuite utilisée pour encapsuler des espèces moléculaires et/ou nanoparticulaires, à savoir deux types de molécules fluorescentes et des nanoparticules d'or et d'argent. Le chapitre II sera consacré à l'obtention puis aux caractéristiques générales de ce type de nanoparticules hybrides. À la description des techniques mises en œuvre pour encapsuler de façon contrôlée ces différentes espèces s'ajoutera l'étude des propriétés de chacune des nanoparticules hybrides élaborées. En vue de leur stabilisation colloïdale et à plus long terme de leur application, l'étape suivante consistera à modifier leur surface.

Le chapitre III concernera ainsi les deux stratégies développées pour une fonctionnalisation in situ des nanoparticules au sein de la microémulsion. Notre attention se portera particulièrement sur les effets induits par l'addition de ces groupements fonctionnels de surface, à la fois sur l'intégrité physique, la taille et la stabilité colloïdale des nanoparticules.

Enfin, la dernière partie de cette thèse sera consacrée à l'application visée, à savoir la mise au point d'un agent antibactérien basé sur la structure cœur@coquille argent@silice. Au cours du chapitre IV sera donc exposée l'étude des propriétés antibactériennes des nanoparticules Ag@SiO₂ que ce soit en solution ou après greffage sur support textile en fonction de différents paramètres.

En raison des domaines très divers abordés au cours de ce travail, nous avons choisi de traiter l'état de l'art relatif à ces différents domaines au début de chaque chapitre au cours d'une étude bibliographique.

Chapitre I Système micellaire «nanoréacteur» pour nanoparticules

I.1 Introduction

La synthèse de nanoparticules par voie micellaire appartient à la catégorie des synthèses de nanoparticules en phase liquide ⁽¹¹⁾, jugées très performantes pour l'obtention de nanoparticules de tailles, de formes et de composition bien contrôlées. Cependant l'une des limites de cette technique réside certainement dans l'utilisation de grand volume de solvant organique. Toutefois, les domaines d'application que nous visons peuvent s'affranchir dans un premier temps de cette contrainte en raison de la faible quantité de matériau nécessaire pour une action significative.

La première partie de ce chapitre sera consacrée aux concepts généraux relatifs aux émulsions et microémulsions. Au cours d'une deuxième partie, nous décrirons la synthèse de nanoparticules de silice par la méthode usuelle de Stöber. Préalablement nous rappellerons les fondements du procédé sol-gel afin d'explicitier les phénomènes mis en jeu lors de la synthèse des nanoparticules de silice. Nous aborderons alors le cas spécifique des micelles inverses à travers leurs propriétés structurales et thermodynamiques. Nous nous intéresserons ensuite à l'adaptation des systèmes micellaires inverses, pour l'élaboration de nanoparticules de silice par hydrolyse-condensation de précurseurs alcoxysilanes. Nous terminerons ce chapitre par l'étude détaillée de la synthèse reproductible de nanoparticules de silice de taille contrôlée.

I.2 Concepts généraux des émulsions et microémulsions

Les émulsions ainsi que les microémulsions sont des dispersions de type «liquide-liquide». En prenant l'eau et l'huile comme phases de référence, deux cas de figure peuvent être distingués : les émulsions huile dans eau, (H/E), pour lesquelles l'eau constitue le milieu extérieur continu et leurs symétriques c'est-à-dire eau dans huile, E/H, pour lesquelles l'huile est le milieu dispersant.

Pour les émulsions, la taille de la phase dispersée est généralement comprise entre 200 et 10000 nm. Elles sont caractérisées par le grand nombre d'interfaces qui sépare les deux milieux liquides non miscibles. Ce sont donc des systèmes thermodynamiquement instables qui tendent à revenir à la situation où coexistent deux phases distinctes séparées par une zone interfaciale limitée. Pour les rendre stables, il est donc nécessaire d'ajouter un tensioactif ou un couple tensioactif/cotensioactif dont le rôle est d'abaisser la tension interfaciale γ en s'adsorbant à l'interface entre les deux liquides ⁽¹²⁾. Selon les conditions

expérimentales, le mélange eau/tensioactif(s)/huile qui apparaît désormais visuellement monophasique, devient isotrope et de faible viscosité.

Dénoté microémulsion par Schulman et al ⁽¹³⁾, ce type de mélange n'a été mis en évidence que lorsque Hoar et Schulman ont obtenu en 1943 une solution translucide en rajoutant progressivement un cotensioactif, l'hexanol, au mélange eau/tensioactif/huile turbide ⁽¹⁴⁾. Thermodynamiquement stables, les microémulsions sont composées d'une phase continue qui contient une phase dispersée de dimensions faibles, inférieures à 100 nm, dont la coalescence se trouve freinée par la présence du film de tensioactifs à l'interface avec la phase continue. La taille et la morphologie de la phase dispersée ainsi que les propriétés macroscopiques de la microémulsion comme la stabilité, la viscosité ou la conductivité sont principalement gouvernées par deux types de variables ⁽¹⁵⁾ :

- ✚ Les variables de composition : pourcentages relatifs des trois constituants principaux du système à savoir la phase aqueuse, la phase huileuse et le(s) tensioactif(s).
- ✚ Les variables de formulation : nature du tensioactif et de l'huile, force ionique de l'eau, température, par exemple.

I.2.1 Les tensioactifs et la formation d'agrégats

Une molécule est dite tensioactive lorsqu'elle est capable d'abaisser la tension superficielle ou interfaciale entre deux milieux (liquide/gaz, liquide/liquide, liquide/solide). Elle favorise de la sorte l'affinité de deux phases non miscibles et dans certains cas la dispersion de l'une dans l'autre. Ce comportement typique des tensioactifs est dû à leur caractère amphiphile. Leur structure est constituée d'une partie soluble dans des solvants aqueux et d'une autre partie présentant une forte affinité pour les solvants organiques.

En solution aqueuse ou organique, les molécules tensioactives s'associent de manière à procurer un environnement favorable à chacune de leurs deux parties. La Figure I-1 décrit l'évolution empirique de la tension superficielle (γ) en fonction de la concentration du tensioactif (C_{TA}). Elle montre que γ diminue dans un premier temps, jusqu'à atteindre une valeur minimale lorsque C_{TA} devient égale à une concentration appelée la concentration micellaire critique (cmc). Ensuite au-delà de la cmc, la tension superficielle reste quasiment constante.

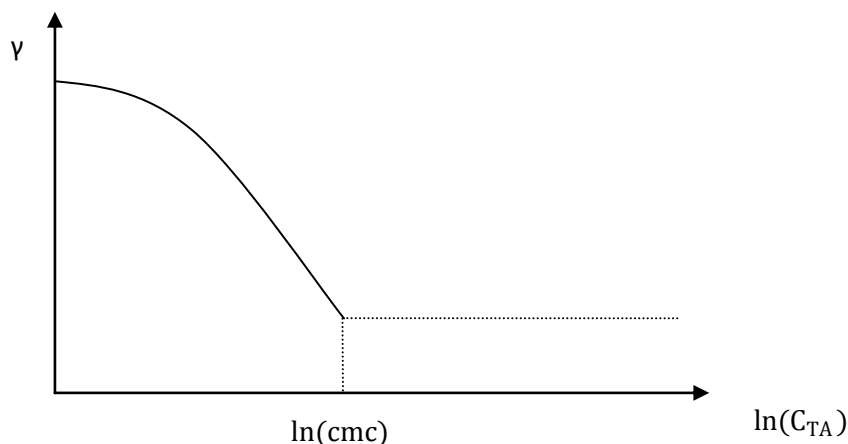


Figure I-1 : Variation de la tension superficielle en fonction de la concentration en tensioactifs

D'après l'équation fondamentale des effets de surface de Gibbs ⁽¹⁶⁾ (Équation I-1), la valeur minimale de γ est égale à $\Gamma_{TA}RT$ avec R constante des gaz parfaits et T la température.

$$\frac{d\gamma}{d(\ln C_{TA})} = -\Gamma_{TA}RT$$

Équation I-1

Cette relation signifie que la concentration surfacique du tensioactif Γ_{TA} devient invariante lorsque C_{TA} est égal à la cmc. Au delà de la cmc les molécules tensioactives ne peuvent plus, par conséquent, s'intercaler à l'interface et s'organisent spontanément en agrégats appelés micelles.

De même quand des molécules tensioactives sont introduites dans un mélange H/E ou E/H, elles vont s'intercaler à l'interface eau/huile ⁽¹⁷⁾, les têtes polaires restant au contact de l'eau et les queues lipophiles au contact de l'huile favorisant ainsi la dispersion d'un des liquides dans l'autre. Selon les conditions expérimentales, la tension interfaciale entre les deux liquides peut devenir très basse ($\gamma \ll 10^{-3}N/m$), de sorte que très peu d'agitation suffit pour transformer spontanément le mélange en une dispersion très fine, translucide et stable appelée microémulsion ⁽¹⁸⁾. Cette transformation peut être considérée comme la génération d'une pseudo-phase ⁽¹⁹⁾ constituée d'agrégats issus de l'auto-assemblage des molécules tensioactives.

Le diagramme ternaire eau/tensioactif/huile de la Figure I-2 montre qu'à faible proportion de tensioactif et aux fortes concentrations d'eau, il se forme des agrégats sphériques ou cylindriques appelés micelles directes constitués d'huile stabilisée par une couche interfaciale de tensioactif. Symétriquement, aux fortes concentrations d'huile, il se forme des agrégats sphériques ou cylindriques appelés micelles inverses constitués cette fois-ci

d'eau entourée et stabilisée par une couche interfaciale de tensioactif. Entre les régions de formation des micelles directes et indirectes, il existe une phase bicontinue dans laquelle les domaines d'eau et d'huile sont interconnectés sous la forme de microstructures spongieuses. En dessous de la zone qui s'étend des micelles directes aux indirectes, le mélange eau/tensioactif/huile présente une séquence d'équilibres de phases connue sous le nom de zone Winsor^(20; 21; 15). La microémulsion monophasée (Winsor IV) coexiste tantôt avec la phase huile (Winsor I), tantôt avec la phase eau (Winsor II) ou avec les deux à la fois (Winsor III).

Avec l'augmentation de la concentration en tensioactif d'autres structures de dimensions supérieures apparaissent. Ce sont les structures lamellaire, cubique et hexagonale.

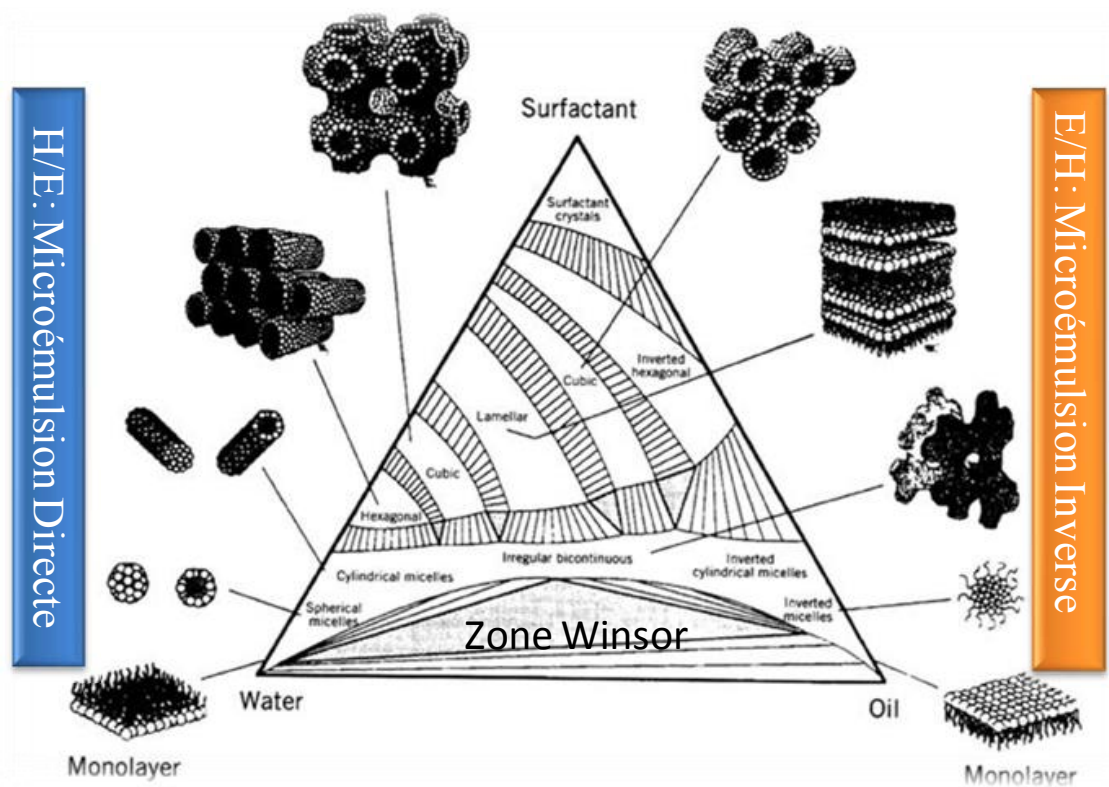


Figure I-2 : Diagramme ternaire eau/tensioactif/huile⁽²²⁾

Hormis la proportion des constituants, d'autres paramètres sont susceptibles d'influer sur l'auto-assemblage des molécules tensioactives dans le mélange. Parmi eux il y a la structure chimique des parties hydrophile et lipophile du tensioactif, leur forme géométrique ainsi que l'importance relative de chacune d'elle.

1.2.1.1 Nature et structure des parties hydrophile et hydrophobe du tensioactif

La manière dont les tensioactifs s'associent lorsqu'ils sont introduits dans une solution est affectée par différents facteurs, notamment la nature chimique des parties hydrophile et hydrophobe. Selon la nature de la partie polaire nous pouvons distinguer deux familles de tensioactifs, divisées elles-mêmes en sous-ensembles (Tableau I-1).

✚ Les tensioactifs ioniques : ils sont anioniques ou cationiques suivant que la charge portée par la partie hydrophile est positive ou négative. En outre il existe un sous-ensemble dans cette famille, les tensioactifs zwitterioniques ou amphotères. La charge de la partie hydrophile de ces derniers varie en fonction du pH. Elle est négative à pH basique, positive à pH acide et près de leur point isoélectrique, les deux types de charge coexistent.

✚ Les tensioactifs non ioniques : ils ne présentent pas de charges électriques. Le caractère hydrophile de leur tête est dû à la formation de liaisons hydrogène avec les molécules d'eau.

Tableau I-1 : Tensioactifs usuels

Nom	Formule développée	Classe
sodium bis(2-éthylhexyl sulfosuccinate (AOT))	$C_{20}H_{37}O_4SO_3^- Na^+$	Anionique
dodecyltriméthylammonium bromide (DDAB)	$C_{15}H_{34}N^+ Br^-$	Cationique
Dérivé de betaine	$RN^+(CH_3)_2CH_2COO^-$	Zwitterionique
Polyoxyéthylène alkyl éthers (C_nE_m)	$C_nH_{2n+1}(OC_2H_4)_mOH$	Nonionique

La partie hydrophobe est constituée d'une chaîne carbonée qui peut être saturée ou non, linéaire, ramifiée, éventuellement aromatique. La chaîne carbonée peut porter des atomes de fluor ce qui rend la partie hydrophobe plus contrastée avec la partie hydrophile et permet ainsi d'ouvrir de nouvelles perspectives de formulation⁽²³⁾.

1.2.1.2 Facteurs géométriques

La géométrie des agrégats que les molécules tensioactives forment en solution est régie par la compétition entre l'affinité hydrophobe de la chaîne carbonée, les répulsions électrostatiques et les contraintes stériques des têtes polaires hydrophiles. Les structures qui découlent de cette compétition peuvent être prédites par les paramètres du tensioactif^(24; 25) tels que l'aire optimale a_0 par tête polaire, le volume effectif V_s du tensioactif et la longueur maximale l_c de la queue hydrophobe (Figure I-3).

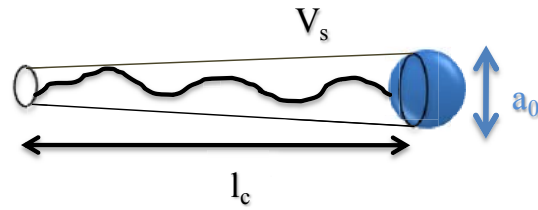


Figure I-3 : Paramètres géométriques de la molécule tensioactive

Israelachvili ⁽²⁴⁾ a ainsi défini une courbure optimale C_0 nommée « paramètre de courbure instantanée ». Elle est égale à $\frac{V_s}{a_0 l_c}$ et sa valeur conditionne la forme de l'agrégat (Tableau I-2).

Tableau I-2 : Arrangements géométriques en fonction de la valeur du paramètre de courbure C_0

	$C_0 < 1/3$	$1/3 < C_0 < 1/2$	$1/2 < C_0 < 1$	$C_0 \approx 1$	$C_0 > 1$
formes	micelles sphériques directes	micelles cylindriques infinies	bicouches	lamelles planes	micelles inverses
Phase continue	Eau				Huile

Cette règle ne s'applique toutefois que pour les systèmes binaires, tensioactif/eau et elle ne tient compte que de la nature du tensioactif. Pour l'élargir aux systèmes ternaires, eau/tensioactif(s)/huile, il est nécessaire de prendre en considération les facteurs comme la nature de l'huile ou la force ionique de l'eau qui peuvent affecter respectivement V_s et a_0 ainsi que d'autres variables que nous décrirons dans la partie suivante.

1.2.1.3 Balance Hydrophile-Lipophile

La Balance Hydrophile-Lipophile (Hydrophilic Lipophilic Balance ; HLB) est une échelle empirique qui établit un autre type de classification des tensioactifs. Elle permet d'estimer le caractère lipophile ou hydrophile d'un tensioactif à partir de sa structure moléculaire et de prédire l'application pour laquelle il est le mieux adapté. Cette approche est basée sur le pourcentage en masse de chacune des deux parties constituant la molécule tensioactive (partie hydrophile et partie hydrophobe). Cette notion fut d'abord établie pour les tensioactifs non ioniques par Griffin ^(26; 27). Elle est définie comme étant égale au rapport entre la masse molaire de la partie hydrophile M_H et la masse molaire totale M de la molécule (Équation I-2).

$$HLB = 20 \times \left(\frac{M_H}{M} \right)$$

Équation I-2

Selon cette formule, la HLB varie de 0 à 20. Les tensioactifs qui ont une HLB inférieure à 9 sont considérés plutôt lipophiles. Lorsque leur HLB est comprise entre 3 et 6, ils stabilisent bien les émulsions de type E/H et sont utilisés comme agents mouillant quand elle est comprise entre 7 et 9.

Les molécules dont l'indice HLB est supérieur à 11 sont plutôt hydrophiles. Elles sont de bons stabilisateurs d'émulsions de type H/E lorsque leur HLB est comprise entre 8 et 18, sont adéquates comme détergent entre 13 et 16 et comme solubilisant de matières organiques dans l'eau entre 15 et 18 (Tableau I-3).

Tableau I-3 : Applications en fonction de la HLB : échelle Griffin⁽²⁸⁾

HLB	3,5-6	7-9	8-18	13-16	15-18
Applications	Emulsifiant (E/H)	Agent mouillant	Emulsifiant (H/E)	Détergent	Solubilisant

Une autre méthode empirique de calcul de la HLB a également été proposée par Davies et Rideal⁽²⁹⁾ qui attribuent des contributions de HLB à tous les groupes chimiques qui constituent la molécule tensioactive (Tableau I-4). La HLB de la molécule est obtenue suivant la formule :

$$HLB = 7 \sum \text{contributions groupes hydrophiles} - \sum \text{contributions groupes hydrophobes}$$

Tableau I-4 : Valeurs associées aux groupes chimiques pour le calcul de la HLB : échelle Davies et Rideal⁽²⁹⁾

Groupes	-COOR	-COOH	-OH	-O-	-CH ₂ -CH ₂ -O-	=CH-	-CH ₂ -	-CH ₃
Valeurs	2,4	2,1	1,9	1,3	0,33	-0,475	-0,475	-0,475

Le Tableau I-5 décrit la relation qualitative qui relie la HLB définie selon cette dernière échelle, la courbure instantanée C₀, la phase préférentielle du tensioactif ainsi que le type de microémulsion favorable.

Tableau I-5: Propriétés du tensioactif en fonction du HLB : échelle Davies et Rideal

Courbure spontanée C ₀	<0	0	>0
HLB	2-8	8-10-12	>12
Microémulsion favorable	E/H Micelle indirecte	Lamellaire Bicouche	H/E Micelle directe
Phase continue	Huile		Eau

Pour effectuer leurs ajustements, la notion de HLB a beaucoup aidé les formulateurs qui ne disposaient avant que de la règle empirique de Bancroft⁽³⁰⁾ qui stipule que l'émulsion est d'autant plus stable que le tensioactif est soluble dans la phase continue. Néanmoins la

HLB reste un concept empirique avec ses limites car il ne tient pas compte de l'environnement physico-chimique de la molécule tensioactive dans le mélange.

1.2.1.4 Point de trouble et température d'inversion de phase

Le point de trouble et la température d'inversion de phase (TIP) sont deux variables qui caractérisent plus particulièrement les tensioactifs non ioniques, très sensibles en général à la température. Le point de trouble est la température au-dessus de laquelle les molécules tensioactives ne sont plus solubles dans l'eau et forment une phase distincte ⁽³¹⁾. La température d'inversion de phase est quant à elle la température au-dessus de laquelle les molécules tensioactives migrent de la phase aqueuse vers la phase huileuse dans le cas des systèmes eau/tensioactif/huile. Ce concept introduit par Shinoda et al ⁽³²⁾ en 1969 dépend beaucoup de l'environnement physico-chimique de la molécule tensioactive dans le mélange ⁽³³⁾ et constitue une autre approche pour la formulation des microémulsions ⁽³⁴⁾ (Tableau I-6).

Tableau I-6: Propriétés du tensioactif en fonction de la TIP

Température	T > TIP	T = TIP	T < TIP
Courbure spontanée C_0	<0	0	>0
HLB	2-8	8-10-12	>12
Microémulsion favorable	E/H Micelle indirecte	Lamellaire Bicouche	H/E Micelle directe
Phase continue	Huile		Eau

De ces concepts découle le développement par Salager et al ⁽³⁵⁾ d'une approche plus globale qui repose sur la notion de DHL (Différence Hydrophile-Lipophile). Contrairement à la HLB, ce concept prend en compte la contribution des facteurs tels que la nature de l'huile ⁽³⁶⁾, la force ionique de l'eau ⁽³⁷⁾, la température ^(38; 39) et l'ajout de cotensioactif ^(31; 40). La DHL fournit ainsi aux formulateurs davantage de précisions sur l'adéquation entre les systèmes de microémulsions et leurs applications.

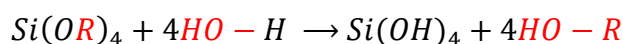
I.3 Procédé sol-gel

De nombreuses études traitent de la synthèse en phase liquide de nanoparticules de silice sphériques de diamètre compris entre 10 nm et quelques microns. La plupart sont basées sur le procédé sol-gel décrit par le français Ebelmen en 1845 qui permet de préparer des « polymères d'oxyde » tels que la silice ⁽⁴¹⁾.

La réaction sol-gel repose sur une succession de réactions d'hydrolyse-condensation de précurseurs, principalement des alkoxydes $M(OR)_n$, dans lesquels l'atome métallique M est lié à des groupements alkoxy OR où R est un groupement alkyle. Dans le cas de la silice, les réactions d'hydrolyse-condensation de précurseurs alcoxysilanes de formule générale $Si(OR)_4$ entraînent la formation d'espèces de plus en plus condensées qui conduisent à des particules de silice colloïdales. Elles sont susceptibles de former des sols puis des gels d'où le nom du procédé « sol-gel ».

I.3.1 L'hydrolyse

Le processus de formation des nanoparticules de silice par voie sol-gel est amorcé par l'hydrolyse du précurseur alcoxysilane par addition d'eau ou d'un mélange alcool/eau. Elle conduit à la formation de groupements silanols Si-OH (Équation I-3).

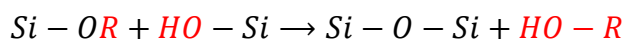


Équation I-3

Le mécanisme réactionnel est une substitution nucléophile qui peut être accélérée par l'ajout d'un catalyseur acide ou basique.

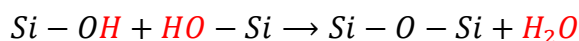
I.3.2 La condensation

Après l'hydrolyse les groupements hydroxyle formés réagissent pour former par condensation des ponts Si-O-Si. Ce processus commence souvent avant que l'hydrolyse ne soit complètement achevée. Ainsi deux réactions peuvent être en concurrence selon le degré d'hydrolyse des précurseurs alcoxysilane. Dans la première, appelée alcoxolation, la réaction se produit entre un groupement alkoxy et un groupement silanol pour libérer une molécule de l'alcool parent (Équation I-4).



Équation I-4

Dans la deuxième, appelée oxolation, la réaction se produit entre deux groupements silanols et le groupe partant est cette fois-ci une molécule d'eau (Équation I-5).



Équation I-5

Comme pour l'hydrolyse le mécanisme réactionnel de la condensation est une substitution nucléophile qui peut être accélérée par l'ajout d'un catalyseur, acide ou basique.

I.4 Synthèse de nanoparticules de silice

Stöber *et al* ⁽³⁾ ont été les premiers à utiliser le procédé sol-gel pour l'élaboration de nanoparticules de silice. Ils ont montré qu'en présence d'eau et d'ammoniaque, l'hydrolyse puis la condensation du tétraéthoxysilane (TEOS) mis en solution dans l'éthanol conduit à la formation de particules de silice.

Deux modèles ont été proposés pour décrire le processus de formation des nanoparticules. Ils sont tous deux basés sur les phénomènes de nucléation et de croissance de germes de silice. Le premier décrit par Matosoukas and Gulari ^(42; 43) est similaire au mécanisme de La Mer comme illustré par la Figure I-4. Une étape de nucléation induite par une sursaturation de monomères de TEOS hydrolysés ($\text{Si}(\text{OH})_4$) est suivie d'une période de croissance qui s'effectue par adjonction de monomères de TEOS hydrolysés à la surface des germes.

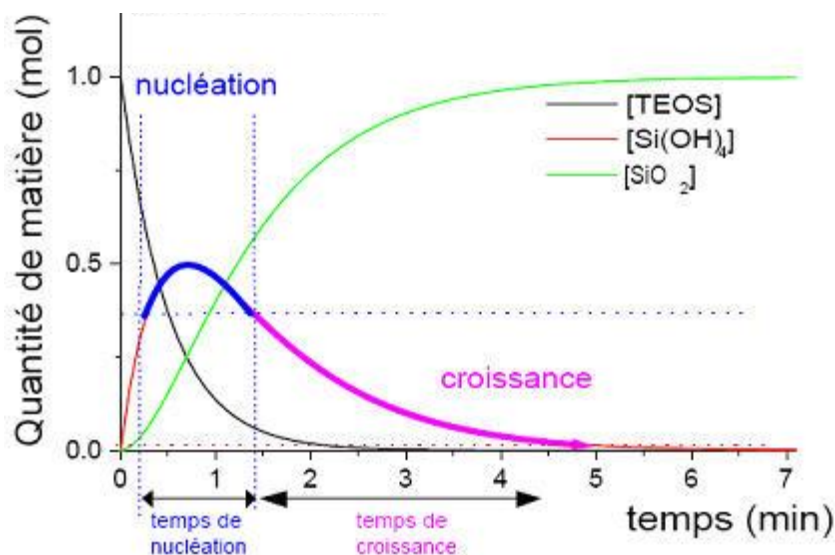


Figure I-4 : Evolution des concentrations en TEOS, $\text{Si}(\text{OH})_4$ et SiO_2 en fonction du temps ⁽⁴⁴⁾

Le second modèle proposé par Bogush et Zukoski ⁽⁴⁵⁾ s'appuie sur la théorie de Flory-Stockmayer qui propose que la « nucléation » se produit quand une chaîne en croissance devient insoluble et précipite. Dans ce modèle, la « nucléation » se produit en permanence et la croissance des billes de silices est le résultat de l'agrégation des chaînes entre elles et/ou avec de plus gros agrégats.

D'autres comme van Blaaderen ^(46; 47) et Harris ^(48; 49; 50) *et al* et Herbert Giesche ⁽⁵¹⁾ pensent que les deux mécanismes sont responsables de la croissance : le phénomène d'agrégation est le premier à se mettre en place mais il est suivi par l'adjonction de monomères de TEOS hydrolysés à la surface des agrégats.

Les différentes investigations menées sur la formation des billes de silice par la méthode Stöber s'accordent toutefois sur le fait que le diamètre des particules de silice dépend des paramètres suivants : les concentrations en TEOS, eau et ammoniacque, la température, la nature de l'alcool ainsi que la force ionique de l'eau. En revanche le premier modèle stipule que la distribution en taille est d'autant plus étroite que la zone de nucléation est courte devant celle de croissance, tandis que le second modèle préconise plutôt un contrôle de l'agrégation pour limiter la polydispersité. Cependant, malgré le nombre d'études effectuées et les prévisions en général empiriques⁽⁵²⁾ qui ont été établies, il est difficile de prédire la taille finale et la distribution en taille des particules obtenues par cette méthode. La difficulté repose particulièrement sur le fait qu'il est difficile de contrôler le processus de nucléation des germes d'autant que dans la plupart des cas les réactifs sont mélangés d'un seul coup. Plusieurs variantes ont alors été proposées comme l'ajout progressif de TEOS⁽⁵³⁾. L'utilisation de milieux organisés comme les microémulsions a également été proposée afin de mieux contrôler la fabrication des nanoparticules de silice.

I.4.1 Utilisation des microémulsions

Les émulsions et les microémulsions ont d'abord présenté un intérêt pour les domaines industriels tels que la pétrochimie, l'imprégnation et la finition de textile, la pharmacie, la cosmétique, la peinture comme l'illustre la revue de Schwuger et *al*⁽³⁸⁾. En outre à partir de la description en 1973 par Menger de l'accélération de l'hydrolyse des esters grâce aux microémulsions, leur utilisation pour les réactions chimiques a connu un fort engouement. Elles ont notamment été utilisées pour des réactions biochimiques, électrochimiques, catalytiques, organiques et en ce qui nous concerne pour la préparation de nanoparticules.

Depuis la synthèse de nanoparticules métalliques⁽⁵⁴⁾ au début des années 80 divers autres nanomatériaux ont été synthétisés en microémulsion : des nanoparticules de matériaux isolants (oxydes et non oxydes)^(55; 11), des alliages ainsi que des semi-conducteurs. Ce type de synthèse a également permis d'obtenir des structures géométriques non sphériques ou complexes comme celle « cœur@coquille » dans laquelle des nano-objet(s) sont immergés dans une matrice sphérique.

La préparation de nanoparticules de silice par voie micellaire n'a été décrite que vers les années 1990 par Osseasare et Arrigada⁽⁵⁶⁾ qui ont réalisé la réaction d'hydrolyse-condensation du TEOS dans un système micellaire inverse en présence d'ammoniacque.

Cette méthode s'est montrée particulièrement intéressante pour l'élaboration de nanoparticules de taille et de forme contrôlées car elle offre la possibilité d'agir sur deux ensembles de paramètres : premièrement, la formulation de la microémulsion et deuxièmement, les quantités de réactifs. De plus il a été montré que cette voie de synthèse permet de combiner faible taille et monodispersité contrairement à la méthode Stöber classique^(56; 47).

1.4.1.1 Propriétés des micelles inverses

Il paraissait en effet intéressant d'utiliser les micelles inverses comme des nanoréacteurs car lorsqu'une réaction est réalisée dans les microémulsions, le produit formé devrait de fait acquérir des dimensions nanométriques semblables à celle des micelles.

La plupart des études effectuées suggèrent que les micelles inverses sphériques sont des gouttelettes d'eau de taille nanométrique entourées d'une monocouche de tensioactif(s) comme représenté schématiquement sur la Figure I-5.

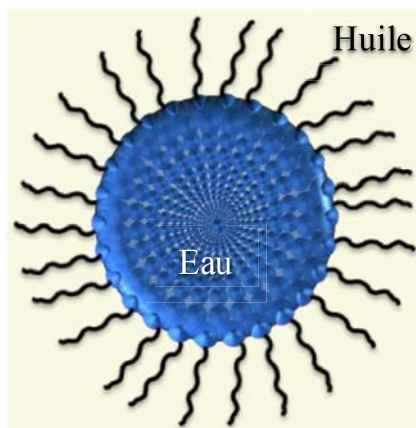


Figure I-5: Structure transversale d'une micelle inverse sphérique

Ce film de tensioactif se comporte comme un écran qui isole les nanogouttelettes d'eau les unes des autres et empêche leur coalescence définitive. Ainsi dans la phase micellaire inverse, les nanogouttelettes d'eau sont bien distinctes et leur dimension varie principalement selon la quantité d'eau solubilisée et peut être soigneusement contrôlée en ajustant le rapport W entre la concentration molaire d'eau et celle du tensioactif⁽⁵⁷⁾ (Équation I-6).

$$W = \frac{[H_2O]}{[\text{tensioactif}]}$$

Équation I-6

Les micelles inverses sont d'autre part soumises au mouvement brownien. Cette diffusion brownienne conduit à des collisions au cours desquelles les interfaces peuvent s'interpénétrer pour former des structures transitoires d'une durée de vie de l'ordre de la microseconde, ce qui permet un échange de contenu entre nanogouttelettes sans passer par la phase continue d'huile⁽⁵⁸⁾. Toutefois lorsque les particules atteignent une certaine taille l'échange de contenu est entravé parce qu'il nécessiterait un grand changement dans la courbure du film de tensioactif entourant les micelles inverses, qui n'est pas favorable énergétiquement. Les molécules tensioactives s'adsorbent à la surface des particules, donc les stabilise et les protège contre une nouvelle croissance⁽⁵⁴⁾. Par conséquent, les nanoparticules obtenues dans un tel milieu sont généralement bien distinctes et caractérisées par une faible distribution en tailles.

1.4.1.2 Formation des nanoparticules de silice

Le schéma général de la formation des billes de silice lors de la synthèse par microémulsion inverse suggéré dans la littérature⁽⁵⁹⁾ est le suivant. Les molécules de TEOS hydrophobes viennent d'abord s'hydrolyser à l'interface huile/eau des micelles inverses. Les entités chimiques produites deviennent alors hydrophiles et pénètrent dans la phase aqueuse du nanoréacteur dans laquelle elles amorcent, selon leur degré d'hydrolyse, l'une des deux réactions de condensation.

Il se forme à l'intérieur des micelles des nucléides, ou germes, qui vont ensuite croître pour donner au final les nanoparticules de silice. Comme avec la méthode Stöber, la croissance peut s'effectuer suivant deux mécanismes : d'une part, par addition de monomères sur des particules existantes, et d'autre part par agrégation notamment lors des contacts intermicellaires.

1.4.1.3 Système micellaire inverse eau/Triton X-100/hexanol/cyclohexane

Les nanoparticules élaborées dans ce manuscrit ont été préparées en utilisant le système micellaire inverse eau/Triton X-100/hexanol/cyclohexane. Dans ce mélange le tensioactif de nom usuel Triton X-100 est l'éther de poly(éthylène glycol) et d'octylphénol. C'est un tensioactif nonionique de la famille des polyoxyéthylène alkylphénol éthers (Figure I-6). Sa formule générale est $C_n\phi E_m$, avec n le nombre d'atomes de carbone de la partie alkylphénol hydrophobe et m le nombre d'unités d'oxyde d'éthylène qui constituent la partie hydrophile.

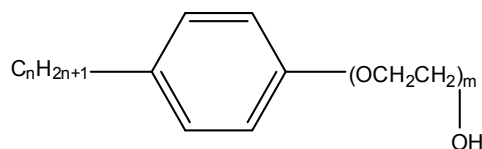


Figure I-6 : Structure chimique du Triton X-100 (n=8 et m≈9-10)

Le Triton X-100 (HLB= 13,6) est très utilisé dans le domaine de la chimie analytique, la pharmacie ainsi que la biochimie pour la solubilisation des protéines membranaires^(60; 61). En ce qui nous concerne il se présente comme un bon candidat pour les synthèses développées dans ce manuscrit car en tant que tensioactif nonionique, il sera moins sensible à la présence de réactifs et notamment d'électrolytes qui ont tendance à interagir avec la tête polaire des tensioactifs chargés.

Le deuxième composant très important du mélange est l'hexanol désigné par le terme de cotensioactif. Introduits dans une solution micellaire, les cotensioactifs, entraînent l'abaissement de la tension interfaciale ainsi que de la concentration micellaire critique⁽²²⁾. Peu soluble dans l'eau et l'huile, ils s'incorporent dans la structure des micelles et ont des effets importants sur la stabilité et la perméabilité des agrégats formés. Leur présence conduit à l'augmentation du nombre de micelles et à une meilleure pénétration des additifs entre les chaînes aliphatiques du tensioactif.

En outre, les cotensioactifs permettent d'augmenter la quantité d'eau solubilisée dans les solvants organiques non polaires par des agents tensioactifs^(40; 62). La Figure I-7 montre que dans notre cas l'hexanol est le cotensioactif le plus efficace pour jouer ce rôle. Ce comportement de l'hexanol peut être expliqué par le fait qu'il abaisse fortement le point de trouble du Triton X-100⁽³¹⁾. En d'autres termes, il le rend moins hydrophile entraînant un abaissement de sa balance Hydrophile-Lipophile. Par conséquent la présence de l'hexanol dans le mélange favorise l'obtention de l'état d'équilibre entre l'affinité hydrophobe du Triton X-100 pour le cyclohexane et le caractère hydrophile des fractions polaires destinées à la solubilisation de la phase aqueuse du mélange.

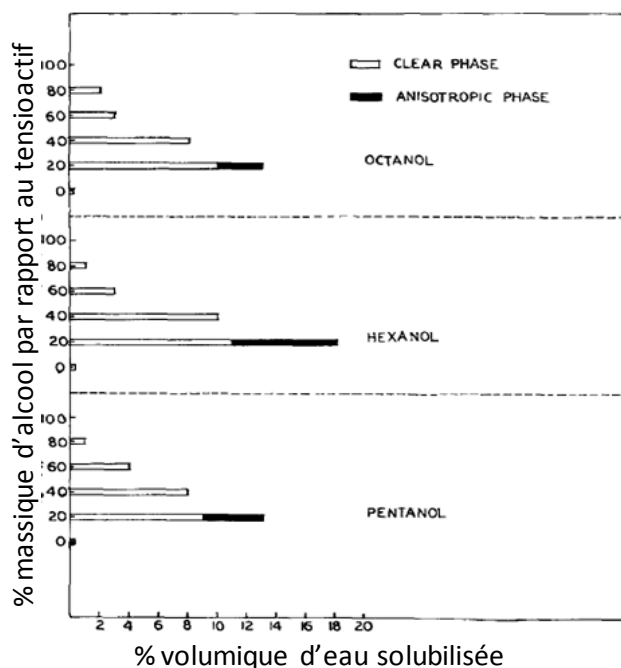


Figure I-7: Absorption d'eau par le mélange Triton X 100/alcool dans le cyclohexane ⁽⁴⁰⁾

Toutes ces caractéristiques intrinsèques au Triton X-100 et à l'hexanol permettent de générer à partir du mélange eau/Triton X-100/hexanol/cyclohexane un système micellaire inverse efficace pour réaliser la réaction d'hydrolyse condensation de précurseur alkoxy silane qui va conduire à la fabrication de nanoparticules de silice.

I.4.2 Préparation des nanoparticules de silice

Le protocole utilisé pour la synthèse des nanoparticules de silice s'inspire des travaux de Tan et al ⁽⁵⁾. Les composants de la microémulsion inverse, Triton X-100, hexanol, cyclohexane et eau, sont introduits à température ambiante et sous agitation magnétique dans un flacon de 30 mL. Nous obtenons une solution limpide, isotrope dans laquelle est introduit le TEOS. Après 30 min d'agitation, l'ammoniaque qui sert à la fois de réactif (H₂O) et de catalyseur (NH₃) pour la réaction d'hydrolyse-condensation du TEOS est ajoutée au mélange que l'on laisse sous agitation une nuit. Les nanoparticules sont séparées du milieu réactionnel par addition d'un volume égal d'éthanol et centrifugation. Le surnageant retiré, elles sont lavées quatre fois avec de l'éthanol avant d'être laissées à sécher à l'air libre. Le Tableau I-7 décrit les quantités de réactifs utilisés.

Selon Tan et al ⁽⁵⁹⁾ le rapport de concentration Eau/Triton X-100 (W) est l'un des principaux paramètres qui influe sur le diamètre final des nanoparticules de silice.

Tableau I-7: Réactifs de la microémulsion inverse

Composés	volume (ml)	masse molaire (g/mol)
Triton X-100 (tensioactif)	1,77	646,85
hexanol (cotensioactif)	1,8	102,18
cyclohexane	7,5	84,16
solution aqueuse pH 2	0,48	-
TEOS	0,10	208,33
NH ₄ OH (25%= 13,38 M)	0,06	35,05

1.4.2.1 Contrôle de la taille des nanoparticules

Nous souhaitons dans cette partie étudier l'évolution de la taille et la morphologie des nanoparticules de silice en fonction de la dimension des micelles. L'objectif est de pouvoir contrôler la taille des nanoparticules de silice.

Pour faire évoluer la dimension des micelles, nous avons choisi d'utiliser le pourcentage entre la concentration molaire d'eau et celle du tensioactif %W (Équation I-7).

$$\%W = \frac{[H_2O]}{[H_2O] + [\text{tensioactif}]} \times 100$$

Équation I-7

Nous avons fait varier %W entre 80 et 98% en gardant constants les autres rapports de concentration consignés dans le Tableau I-8.

Tableau I-8: Rapports des réactifs sol-gel et des composants de la microémulsion

[TEOS]/[H ₂ O]	[TEOS]/[NH ₃]	[Triton X-100]/[hexanol]	[Triton X-100]/[cyclohexane]
0,0155	0,5584	0,2039	0,0421

Pour chaque valeur de %W, la concentration d'eau correspondante est déduite de celle du Triton X-100 qui est conservée égale à 0,249 mol/l. Les autres concentrations sont quant à elles déterminées à partir des rapports présentés dans le Tableau I-8.

1.4.2.2 Caractérisation morphologique

Les caractéristiques morphologiques des nanoparticules de silice récupérées après synthèse ont été étudiées en microscopie électronique à transmission (MET). Les clichés présentés dans la Figure I-8 montrent que pour %W > 85%, les nanoparticules sont de forme sphérique, bien distinctes les unes des autres et assez homogènes. En revanche, deux populations sont identifiées lorsque %W ≤ 85%.

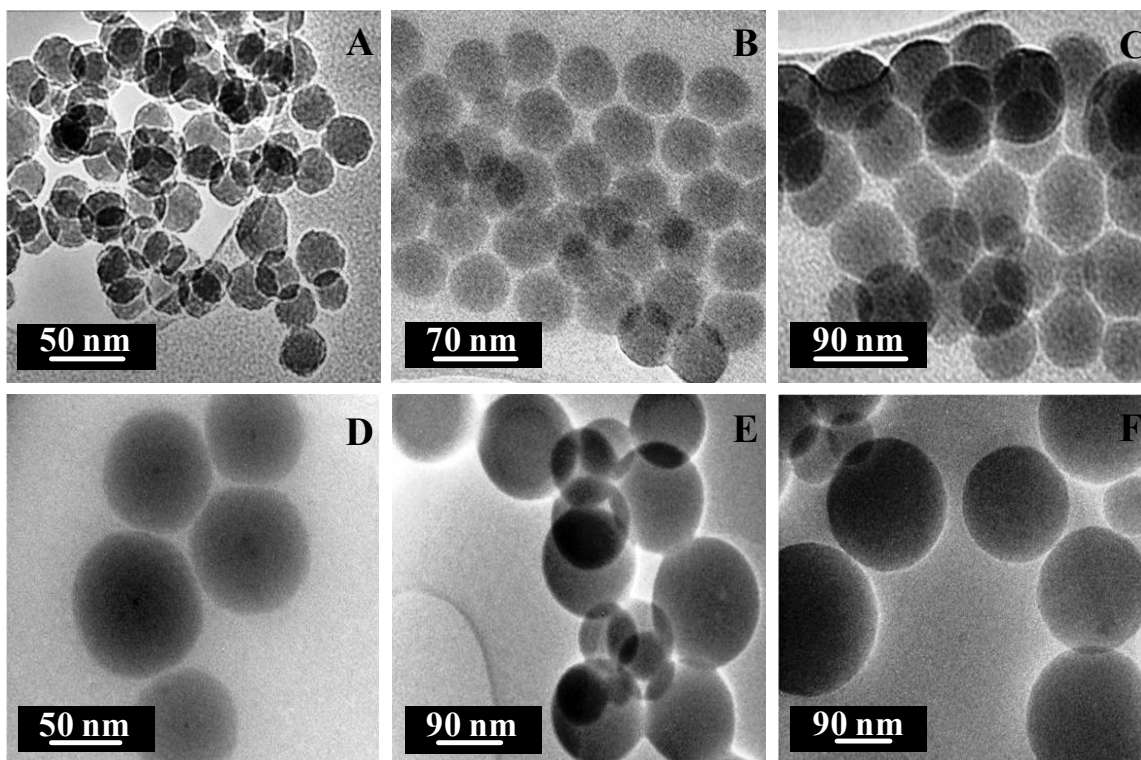


Figure I-8 : Micrographies MET de nanoparticules de silice. Variation de %W : A) 96%, B) 95% C) 92,8%, D) 90,8%, E) 85%, F) 80%

La détermination du diamètre moyen des nanoparticules obtenues par la mesure de plus d'une centaine de nanoparticules (Tableau I-9) montre d'une part que le diamètre des nanoparticules diminue lorsque %W augmente. D'autre part la distribution en taille, étroite pour les fortes valeurs de %W tend à s'élargir quand %W baisse. Ainsi nous avons pu produire des nanoparticules de moins de 40 nm avec un écart type en dessous de 3%, un résultat difficile à obtenir dans le cas de la synthèse par la méthode Stöber⁽⁵⁶⁾.

Tableau I-9 : Diamètre des nanoparticules de silice en fonction de %W

Image MET	A	B	C	D	E	F
%W	96%	95.0%	92.80%	90.8%	85.0%	80.0%
Diamètre (nm)	36±3%	56±3%	76±5%	97±8%	155 ^a	204 ^b

^aMoyenne de la population de plus grande taille

^bMoyenne de la population de plus grande taille

De plus, l'évolution du diamètre des nanoparticules de silice en fonction de %W suit une décroissance continue (Figure I-9) qui devrait nous permettre de prévoir leur taille dans cet intervalle.

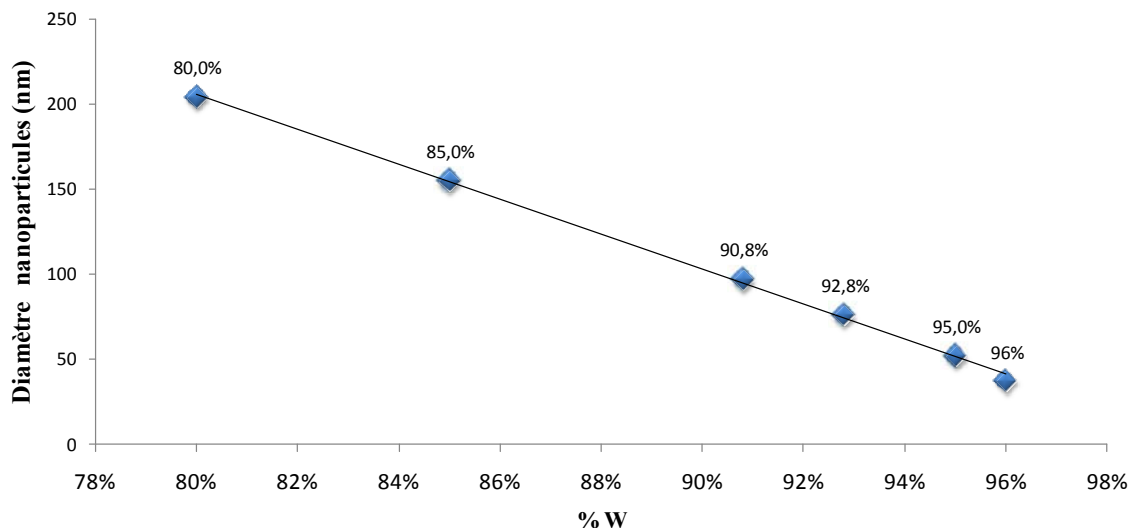


Figure I-9 : Variation de la taille des nanoparticules de silices en fonction du % W

Cette diminution du diamètre des nanoparticules de silice lorsque %W augmente est en accord avec les observations de Tan *et al*⁽⁵⁹⁾ ainsi que d'Osseasare et Arrigada⁽⁵⁶⁾ qui l'expliquent par un changement de la dynamique des réactions d'hydrolyse et de condensation du TEOS.

Une interprétation de la relation entre la taille des nanoparticules de silice et %W nécessiterait donc une étude de l'évolution de la structure et de la dynamique des micelles inverses en fonction de %W.

1.4.2.3 Analyse de la loi de croissance des nanoparticules de silice

En prélude à l'étude de la formation des nanoparticules de silice il est nécessaire d'obtenir des informations sur la dimension et la forme des micelles inverses, leur coefficient de diffusion et leur dynamique de coalescence, l'état de l'eau solubilisée, ...etc. Pour acquérir ces informations, diverses méthodes d'analyse peuvent être utilisées. Parmi elles figurent la polarisation de fluorescence⁽⁶³⁾, la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)⁽⁵⁷⁾, la radiolyse pulsée⁽⁶⁴⁾, la conductivité⁽⁶⁵⁾ et pour notre part, la viscosimétrie⁽⁶⁶⁾ et la diffusion dynamique de lumière^(39; 62).

Les mesures de viscosité sont reconnues comme un moyen d'étude de la structure des macromolécules ou des assemblages colloïdaux⁽⁶⁶⁾. La viscosité d'une solution est en effet directement reliée à la forme et aux dimensions des agrégats contenus dans cette dernière. L'étude de la viscosité de la microémulsion constitue dans ce sens un outil adéquat d'analyse des micelles inverses. De plus la diffusion des micelles, qui contrôle

partiellement la compétition entre la croissance et la nucléation des germes durant la formation des nanoparticules⁽⁶⁷⁾, dépend elle aussi de la viscosité.

La technique d'analyse par diffusion dynamique de lumière (DLS) a l'avantage d'être une technique d'une grande précision même pour des particules de très petites dimensions⁽³⁹⁾. Employée conjointement aux mesures de viscosité, elle permettra de déterminer les coefficients de diffusion des micelles inverses.

Nous chercherons à évaluer à travers ces deux types de caractérisation les effets de la variation du pourcentage d'eau par rapport au tensioactif (%W) sur la structure et la dynamique des micelles inverses ainsi que leur répercussion sur la cinétique des réactions d'hydrolyse et de condensation du TEOS.

1.4.2.4 Viscosité du système micellaire inverse

D'un point de vue hydrodynamique, les micelles inverses sont assimilables à des sphères rigides avec une structure semblable à celle de la Figure I-5. L'expression de la viscosité d'une suspension diluée de sphères rigides a été déterminée par Einstein en 1906. Il a montré que la viscosité relative (η_{rel}), qui est égale au rapport entre la viscosité η de la suspension et la viscosité du solvant (η_0), augmente linéairement avec la fraction volumique (φ) des sphères, selon la formule :

$$\eta_{rel} = 1 + 2,5\varphi$$

Équation I-8

Cette formule est cependant limitée aux dispersions de sphères de fraction volumique $\varphi \ll 1$. C'est la raison pour laquelle de nombreuses équations ont été développées pour étendre la formule d'Einstein d'une part à des suspensions de forme non sphérique et d'autre part à des concentrations plus élevées⁽⁶⁸⁾. Nous pouvons citer par exemple la formule établie par Roscoe⁽⁶⁹⁾ (Équation I-9), que Kumar et Balasubramanian⁽⁴⁰⁾ ont utilisée dans une étude similaire à celle rapportée dans ce travail et sur laquelle nous allons baser le traitement théorique de l'étude de la taille des micelles inverses par viscosimétrie.

$$\eta_{rel} = (1 - 1,35\varphi)^{-2,5}$$

Équation I-9

Les mesures de viscosité ont été réalisées par le biais d'un vibro-viscosimètre et les microémulsions inverses sont préparées selon le même protocole que celui décrit au

chapitre I.4.2 mais en l'absence de TEOS. La courbe d'évolution de la viscosité en fonction de %W représentée sur la Figure I-10 montre une évolution très faible de la viscosité entre 0 et 80%, puis une augmentation progressive à partir de 80-85% jusqu'à 96%, valeur à laquelle il se produit un important saut.

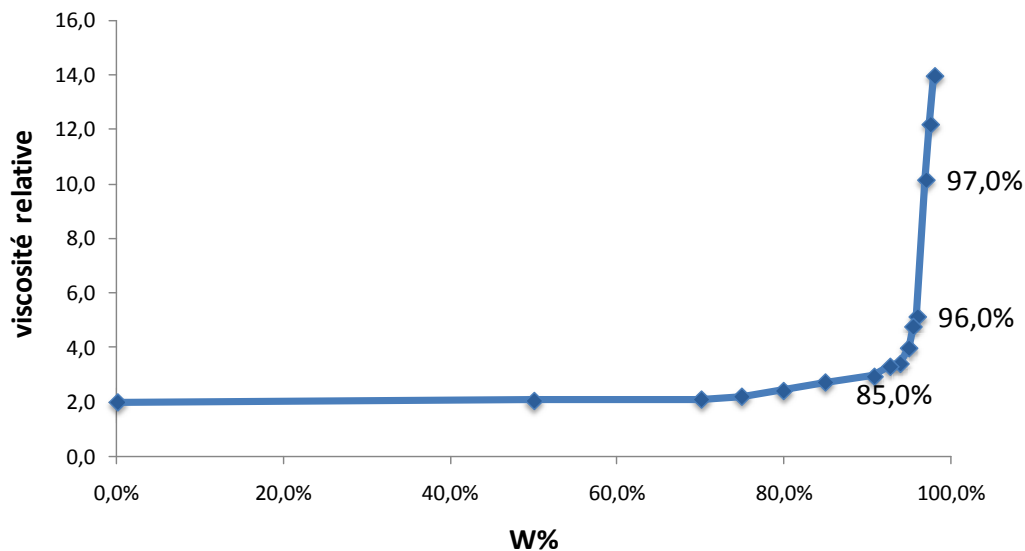


Figure I-10 : Variation de la viscosité relative de la microémulsion en fonction du pourcentage d'eau par rapport au tensioactif (W%)

Ces mesures sont en corrélation avec des observations effectuées lors de la préparation des microémulsions. En effet nous avons constaté qu'entre 0 et 97% les microémulsions inverses sont fluides et limpides y compris sans agitation. En revanche au-delà de 97%, les microémulsions inverses au repos (sans agitation) ont l'aspect d'un solide viscoélastique (viscosité infinie) alors que sous une agitation suffisamment élevée pour casser la structure formée au repos, elles se déstructurent jusqu'à devenir fluide (viscosité faible). Inversement, lorsque la contrainte cesse, elles se restructurent et retrouvent leur aspect viscoélastique d'origine. Ce comportement de fluide thixotrope de la microémulsion inverse au delà de 97% traduit une dissymétrie dans la forme des micelles⁽⁴⁰⁾. En effet au fur et à mesure que la proportion d'eau dans la microémulsion augmente la phase micellaire sphérique laisse progressivement place à une phase cylindrique, puis lamellaire et finalement à une phase continue d'eau⁽⁷⁰⁾. Cela suggère que la microémulsion existe seulement jusqu'à ce point de 97%.

1.4.2.5 Dimensions et dynamique des micelles inverses

Toujours dans l'hypothèse de micelles inverses sphériques, nous avons analysé l'évolution de leur taille en fonction du pourcentage d'eau par diffusion dynamique de lumière (DLS).

Les expériences ont été réalisées sur un analyseur de particules et les microémulsions inverses ont été directement préparées dans les cuves en quartz de mesure en adaptant le volume total.

La courbe d'évolution du diamètre des micelles en fonction de %W est reportée sur la Figure I-11. Elle a la même allure que celle observée pour la viscosité (Figure I-10). Une très faible variation au début suivie d'une monotone augmentation à partir de 80-85%, puis un important saut à 95%.

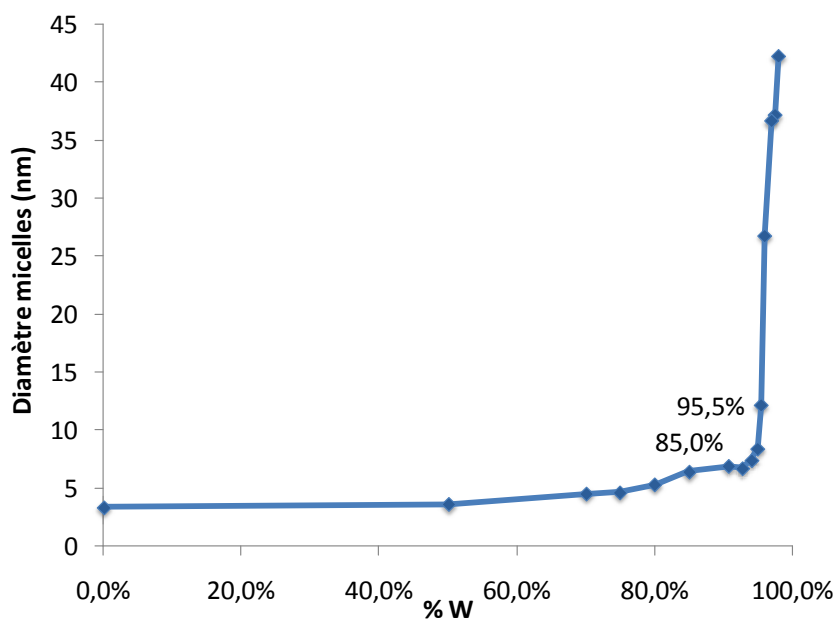


Figure I-11 : Variation du diamètre des micelles en fonction du pourcentage d'eau par rapport au Triton X-100 (%W). Mesures effectuées en DLS

À faible teneur en eau la tête polaire du tensioactif introduit des contraintes géométriques de sorte que des structures à l'intérieur desquelles les chaînes poly(oxyéthylène) s'interpénètrent sont plus favorisées empêchant ainsi tout mouvement de l'eau. D'après Osseoasare et Arrigada ⁽⁵⁶⁾ le rapport W à partir duquel de l'eau non liée (électrostatiquement aux têtes polaires des molécules tensioactives) commence à être présente dans les micelles est de 5,8, valeur qui correspond à une valeur de %W d'environ 85%. La présence de cette eau libre indique que la structure des agrégats devient semblable à des gouttelettes d'eau sphériques entourées de molécules de tensioactif, expliquant le changement observé sur la courbe à partir de cette valeur. Quand %W a encore été augmenté, le saut à 95% peut être interprété par un changement de structure des micelles qui apparaît plus tôt que la valeur obtenue par les mesures de viscosité (97%).

Par ailleurs la fraction volumique φ des micelles est égale par définition au rapport entre le volume total des micelles et le volume de la microémulsion. Si N_m est le nombre de micelles, V_m le volume d'une micelle et V_M le volume total de la microémulsion nous obtenons l'équation suivante :

$$\varphi = \frac{N_m \times V_m}{V_M}$$

Équation I-10

En assumant que la totalité de l'eau est répartie uniformément entre les différentes nanogouttelettes et que la masse volumique de l'eau est toujours égale à 1, le nombre de micelles N_m est donné par :

$$N_m = \frac{V_{H_2O}}{v_{H_2O}}$$

Équation I-11

Avec V_{H_2O} volume total d'eau de la microémulsion et v_{H_2O} celui contenu dans une micelle

En remplaçant dans l'Équation I-10 nous obtenons :

$$\varphi = \frac{\frac{V_{H_2O}}{v_{H_2O}} \times V_m}{V_M}$$

Équation I-12

D'après le schéma de la Figure I-12, $v_{H_2O} = \frac{4\pi}{3} (r_m - l)^3$ et $V_m = \frac{4\pi}{3} r_m^3$, avec r_m rayon de la micelle et l l'épaisseur de la couche de tensioactif.

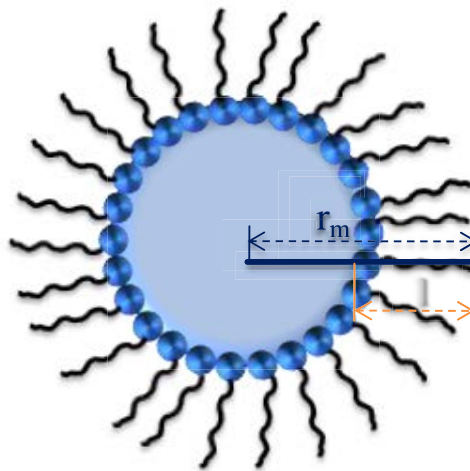


Figure I-12 : Coupe transversale de la micelle inverse

D'où

$$\varphi = \frac{\frac{V_{H_2O}}{\frac{4\pi}{3}(r_m - l)^3} \times \frac{4\pi}{3} r_m^3}{V_M} = \frac{V_{H_2O} \times r_m^3}{V_M \times (r_m - l)^3}$$

Équation I-13

Finalement, à partir de l'Équation I-13 nous obtenons :

$$r_m = \frac{l}{1 - \sqrt[3]{\frac{V_{H_2O}}{\varphi \times V_M}}}$$

Équation I-14

Les valeurs de φ requises pour le calcul sont obtenues à partir des mesures expérimentales de viscosité en fonction de %W et en utilisant l'Équation I-15 dérivée de l'expression de la viscosité relative établie par Roscoe (Équation I-9) :

$$\varphi = \frac{1 - (\eta_{rel})^{\frac{-1}{2,5}}}{1,35}$$

Équation I-15

La valeur de l correspond d'après l'Équation I-14 au rayon de la micelle en absence d'eau et elle vaut 1,7 nm d'après les mesures DLS réalisées. Les valeurs de V_{H_2O} et V_M sont quant à elles fixées par les conditions expérimentales. Au moyen de ces valeurs nous avons effectué à l'aide de l'Équation I-14 des estimations sur l'évolution de la dimension des micelles en fonction de %W que nous avons représentées sur la Figure I-13.

Nous constatons une concordance correcte entre les deux méthodes d'analyse entre 0 et 95% d'eau. Puis apparaît un décalage pour lequel nous proposons deux explications. A partir de 95% d'eau la fraction volumique φ devient supérieure à 0,35, valeur à partir de laquelle l'équation de Roscoe s'écarte de manière significative des données expérimentales ⁽⁷¹⁾. Ou comme évoqué précédemment dans les analyses de tailles par DLS, le décalage peut être du à un changement de structure des micelles à partir de 95% d'eau qui ne rend plus valable le modèle de sphères rigides.

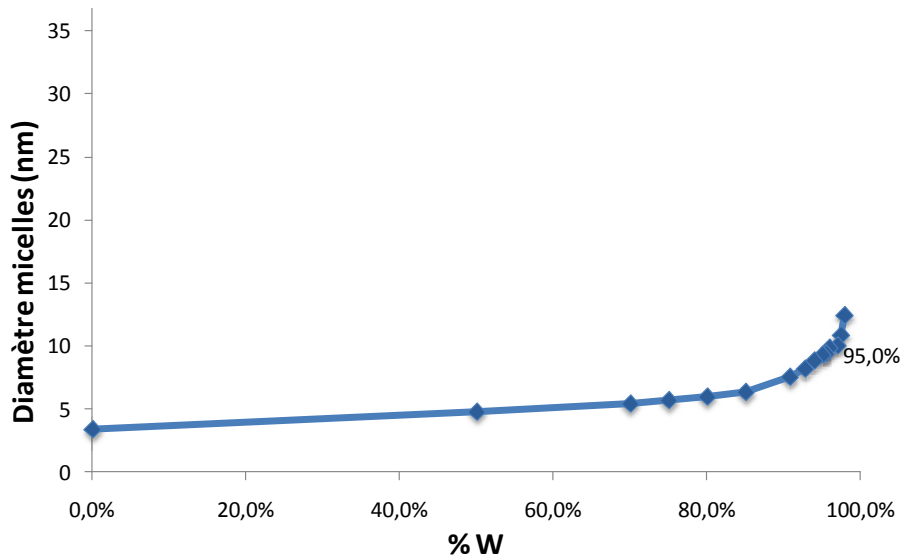


Figure I-13 : Variation du diamètre des micelles en fonction du pourcentage d'eau par rapport au Triton X-100 (%W). Mesures viscosimétriques

En plus de fournir la taille des micelles inverses, les mesures de DLS ont ensuite permis de calculer leur coefficient de diffusion D_0 (Tableau I-10) en utilisant la relation de Stokes-Einstein (Équation I-16).

$$D_0 = \frac{kT}{6\pi r\eta}$$

Équation I-16

Où k est la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité de la solution et r le rayon de la particule.

Dans cette section nous avons pu, à partir de nos résultats expérimentaux corrélés à ceux de la littérature, obtenir les paramètres de structure des micelles inverses tels que le diamètre et le nombre de micelles ainsi qu'un paramètre dynamique, le coefficient de diffusion des micelles. Les valeurs obtenues rassemblées dans le Tableau I-10 vont être utilisées pour évaluer la cinétique des réactions sol-gel dans les microémulsions en fonction de %W et son impact sur la taille et la polydispersité des billes de silices.

1.4.2.6 Mécanismes de formation des nanoparticules

Dans le schéma de formation des nanoparticules de silice, l'étape d'hydrolyse du TEOS est chronologiquement précédée par «l'accessibilité» des molécules de TEOS à l'interface huile/eau. Les résultats du Tableau I-10 indiquent que lorsque %W augmente, la fraction volumique des micelles inverses croît. Cela signifie qu'il se crée une plus grande surface de contact entre les molécules de TEOS et les micelles inverses. En outre la taille

croissante des micelles peut entraîner un changement vers une structure plus «ouverte» dans laquelle l'interaction entre l'eau et des molécules de TEOS est facilitée ⁽⁵⁶⁾. Dans ces conditions la vitesse d'hydrolyse va s'en trouver accélérée pour les valeurs plus grandes de %W et nous pouvons nous attendre à la formation d'un plus grand nombre de nucléides et donc de plus petites particules.

Tableau I-10 : Paramètres de structure des micelles inverses

$\frac{\%W=[\text{H}_2\text{O}]}{[\text{Triton X-100}]+[\text{H}_2\text{O}]}$	Viscosité relative η_{rel}	Volume spécifique φ	Diamètre ^a des micelles (nm)	Nombre ^b de micelles/ml	Coefficient de diffusion D_0 ($10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)
98,0%	14,0	0,48	42	$5,4 \cdot 10^{18}$	0,1
97,0%	10,2	0,45	37	$9,6 \cdot 10^{18}$	0,1
96,0%	5,2	0,36	27	$8,2 \cdot 10^{18}$	0,4
95,0%	4,0	0,32	8	$8,6 \cdot 10^{18}$	1,4
92,8%	3,3	0,28	7	$1,2 \cdot 10^{19}$	2,2
90,8%	3,0	0,26	7	$1,4 \cdot 10^{19}$	2,4
85,0%	2,7	0,25	6	$2,1 \cdot 10^{19}$	2,8
80,0%	2,4	0,22	5	$2,3 \cdot 10^{19}$	3,8
75,0%	2,2	0,20	5	$2,4 \cdot 10^{19}$	4,7
70,0%	2,1	0,19	4	$2,6 \cdot 10^{19}$	5,1
50,0%	2,1	0,19	4	$3,9 \cdot 10^{19}$	6,5
0,0%	2,0	0,18	3	$1,1 \cdot 10^{20}$	7,2

^aMesures DLS

^bDéduit de l'Équation I-10

La deuxième étape du processus de formation des nanoparticules de silice est la réaction de condensation des molécules de TEOS hydrolysées. Selon les conditions expérimentales de synthèse des nanoparticules de silice et les valeurs du nombre de micelles (Tableau I-10), il y a plus de molécules de TEOS par micelle inverse pour les valeurs hautes de %W (Tableau I-11). Statistiquement, après hydrolyse le nombre de groupements silanols par micelle inverse est donc plus important. Par conséquent, pour les grandes valeurs de %W, il existe une plus grande probabilité d'interaction entre voisins silanols dans une même micelle pour former le pont siloxane Si – O – Si. Dans ces conditions, le taux de nucléation intramicellaire est plus important, ce qui laisse prévoir la formation d'un plus grand nombre de germes et une diminution du taux de croissance, qui conduiraient encore une fois à des particules plus petites.

Tableau I-11 : Quantité d'eau et de TEOS en fonction de %W

$\%W = \frac{[H_2O]}{[Triton\ X-100] + [H_2O]}$	Volume H ₂ O (mL) ^a	Nombre de molécules H ₂ O/micelle	Nombre de molécules de TEOS/micelle ^b
98,0%	2,12	13004	201
97,0%	1,51	5282	82
96,0%	1,17	4780	74
95,0%	0,95	3679	57
92,8%	0,67	1929	30
90,8%	0,52	1281	20
85,0%	0,30	488	8
80,0%	0,22	314	5
75,0%	0,16	227	4
70,0%	0,13	164	3
50,0%	0,06	48	1
0,0%	0,00	0	0

$$b \frac{[TEOS]}{[H_2O]} = 0.0155$$

Comme noté plus haut, le processus de croissance des nanoparticules de silice peut être régi par deux mécanismes, le premier, par adjonction de monomères de TEOS hydrolysés à la surface des germes déjà existants et le deuxième par l'agrégation des germes entre eux et/ou avec de plus gros agrégats lors des échanges intermicellaires. La concentration et la diffusion des micelles inverses plus élevées pour les faibles valeurs de %W (Tableau I-10) conduit à un taux de collisions intermicellaire plus important. Par conséquent, aux faibles valeurs de %W, il est évident que le processus de croissance par l'intermédiaire de transferts micellaires est favorisé. Il en résulterait, comme observé expérimentalement aux petites valeurs de %W, des nanoparticules de silice plus grosses et plus polydisperses en raison du phénomène d'agrégation. En revanche, aux fortes valeurs de %W, le premier mécanisme semble être favorisé car la diminution relative de la cinétique de diffusion et de la concentration des micelles tend à freiner le processus de collision voire le rendre inexistant selon Robert *et al*⁽⁶⁶⁾. Ainsi la réduction du diamètre et de la polydispersité des nanoparticules de silice observée aux fortes valeurs de %W peut se justifier par le fait que dans le cas d'une diffusion faible, les entités de TEOS hydrolysées contenues dans une micelle sont plus prédisposées à une condensation et une croissance intramicellaire puisqu'elles subissent peu ou pas d'agrégation intermicellaire.

La structure et de la dynamique d'échange des micelles inverses lorsque %W varie est en accord avec les changements observés sur la taille et la polydispersité des nanoparticules de silice. Toutefois d'autres facteurs comme la quantité de cotensioactif ou de catalyseur peuvent aussi jouer des rôles très importants dans la formation et la croissance des nanoparticules ⁽⁵⁹⁾ car ils influent respectivement sur la perméabilité de l'interface eau-cyclohexane et les vitesses d'hydrolyse et de condensation du TEOS.

I.5 Conclusion

Ce premier chapitre a été l'occasion d'exposer les propriétés des tensioactifs notamment leur aptitude d'auto-assemblage en solution. Nous avons montré comment en modifiant la formulation du mélange pseudo ternaire eau/tensioactif(s)/huile il est possible de favoriser l'apparition de différentes mésophases. En l'occurrence nous utilisons dans cette thèse la phase micellaire inverse sphérique constituée de nanogouttelettes d'eaux distinctes comme nanoréacteurs.

Des nanoparticules de silice de taille contrôlée ont pu être produites en adaptant de la littérature le système micellaire inverse eau/Triton X-100/hexanol/cyclohexane. Nous avons montré que nous étions en mesure de prédire leur taille finale en fonction de %W, le pourcentage d'eau par rapport au Triton X-100. Comparé à la méthode classique Stöber, des nanoparticules de petites tailles monodisperses ont pu être élaborées, jusqu'à moins de 40 nm de diamètre avec un écart type inférieur à 3%.

L'étude des mécanismes conduisant à la formation des nanoparticules de silice dans le système micellaire inverse par viscosimétrie et DLS semble indiquer que la croissance des particules est fortement dépendante des caractéristiques dynamiques du système micellaire. Des travaux supplémentaires, par exemple sur la perméabilité des micelles, seraient nécessaires pour élucider l'ensemble des facteurs déterminants dans la formation des nanoparticules.

Cette étude d'optimisation de la taille des nanoparticules de silice nous a fourni une base sur laquelle nous allons nous appuyer pour le développement de nanostructures hybrides à base de silice de taille, de composition et d'état de surface contrôlés. Nous prévoyons d'effectuer en une seule étape, l'encapsulation individuelle ou conjointe de molécules organiques et de nano-objets métalliques dans cette matrice de silice.

Chapitre II Encapsulation de molécules et de nano-objets dans la matrice de silice

II.1 Introduction

Dans le premier chapitre, nous avons vu que les systèmes micellaires constituaient un milieu réactionnel performant pour l'élaboration d'une matrice de silice de taille et de forme contrôlées. Dans ce deuxième chapitre, nous utiliserons cette méthode pour obtenir des nanomatériaux hybrides mêlant des natures (organique/inorganique) et des phases (oxyde/métallique) différentes. L'intérêt est de disposer de plateformes associant diverses fonctionnalités ou permettant d'accéder à de nouvelles propriétés^(72; 73; 74).

Nous chercherons à encapsuler de façon contrôlée des molécules organiques fluorescentes (fluorophores) et des nanoparticules métalliques dans la matrice de silice conçue au premier chapitre. Nous décrirons successivement les stratégies développées pour réaliser chaque encapsulation et nous étudierons les différentes propriétés qui caractérisent chacune des structures hybrides obtenues.

II.2 Les fluorophores organiques

Les fluorophores organiques sont souvent employés comme sondes afin de suivre ou de détecter l'espèce ou le support auxquels ils sont attachés. Leurs propriétés de fluorescence ont été mises à profit par exemple dans des études quantitatives et structurales des micelles inverses^(56; 63; 75), ou encore pour étudier le mouvement de rotation de molécules et observer des changements de structure de protéine⁽⁷⁶⁾.

Après un rappel sur la fluorescence nous décrirons les caractéristiques des fluorophores puis leur encapsulation dans une nanoparticule de silice.

II.2.1 Principe de la fluorescence

La fluorescence correspond à l'émission de lumière par une substance à partir d'un état électronique excité peuplé après absorption d'énergie émise par une onde lumineuse. Les différents processus électroniques engendrés par l'absorption de lumière par une substance fluorescente sont illustrés par le diagramme de Jablonski (Figure II-1).

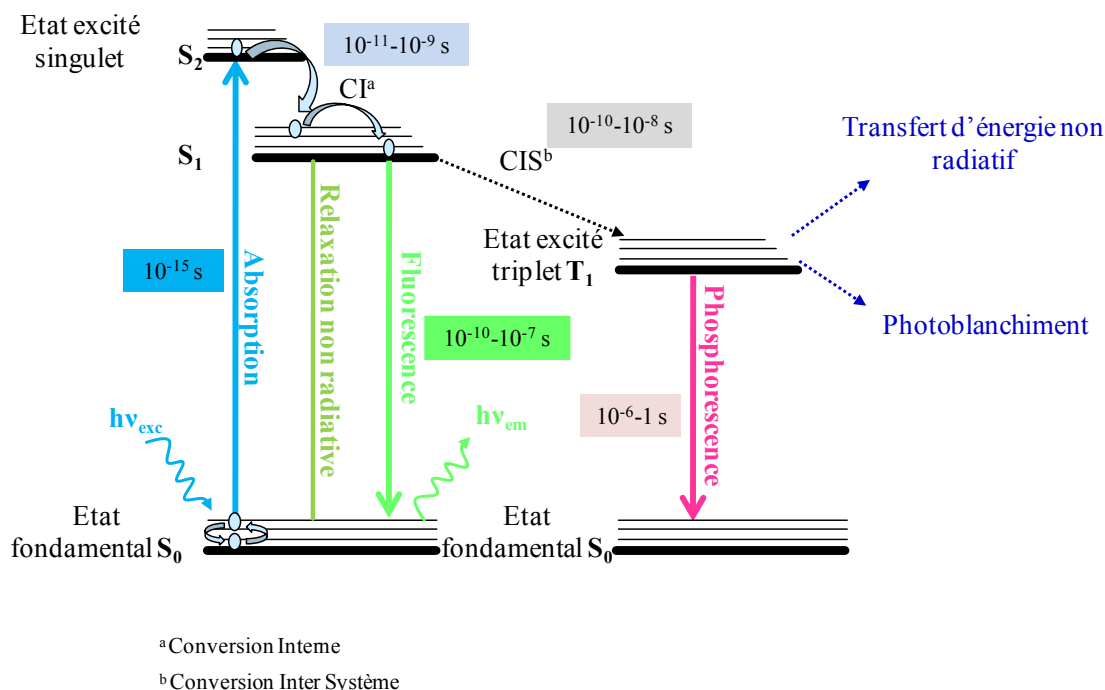


Figure II-1 : Diagramme de Jablonski

L'état électronique singulet fondamental ainsi que les états électroniques singulets excités sont respectivement représentés par S_0 , S_1 et S_2 . Chacun de ces niveaux d'énergie électronique, ainsi que l'état excité triplet (T_1), comprend plusieurs niveaux d'énergie vibrationnelle.

A température ambiante, l'énergie thermique n'est pas suffisante pour peupler les états énergétiques S_1 et S_2 . C'est l'absorption de l'énergie lumineuse apportée par un photon qui permet de peupler ces états excités. L'absorption a généralement lieu depuis les niveaux vibrationnels les plus bas de l'état fondamental car ce sont les plus peuplés. Un fluorophore est généralement excité jusqu'aux niveaux vibrationnels élevés, S_1 ou S_2 . Les molécules excitées se relaxent ensuite rapidement par conversion interne jusqu'au niveau vibrationnel le plus faible (0) de l'état excité S_1 . Le retour à l'état fondamental S_0 depuis le niveau vibrationnel 0 de l'état S_1 peut alors avoir lieu par émission d'un photon, ce qui correspond à la fluorescence, ou par désexcitation non radiative (principalement par dégagement de chaleur lors des collisions avec les molécules environnantes). D'autre part, des phénomènes concurrents comme le transfert d'énergie entre fluorophores ou vers un inhibiteur de fluorescence peuvent également avoir lieu à l'état excité. Ces processus concurrents de l'émission de fluorescence font que le nombre de photons émis est inférieur aux nombre de photons absorbés. L'énergie libérée lors de l'émission de fluorescence est

généralement inférieure à celle ayant permis l'excitation car de l'énergie est dissipée lors des phénomènes de conversion interne qui suivent l'absorption. Les longueurs d'onde étant inversement proportionnelles à l'énergie du photon, la longueur d'onde d'émission est donc décalée vers le rouge (vers les plus grandes longueurs d'ondes) par rapport à la longueur d'onde d'excitation. Pour certaines molécules, un processus de conversion intersystème autorise le peuplement de l'état excité triplet T_1 depuis l'état excité singulet S_1 . Le retour à l'état S_0 peut dans ce cas s'effectuer soit par émission de lumière, on parle alors de phosphorescence, soit par désexcitation non radiative. L'état excité triplet T_1 étant moins énergétique que S_1 , l'énergie libérée par la phosphorescence est plus faible que celle liée au processus de fluorescence. L'émission de phosphorescence est ainsi décalée vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport à l'émission de fluorescence.

II.2.2 Caractéristiques des fluorophores

II.2.2.1 Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission de fluorescence

Le spectre d'absorption rend compte du nombre de photons absorbés à chaque longueur d'onde d'excitation. Pour chaque longueur d'onde associée aux photons absorbés, il est possible de définir une probabilité de transition électronique. A partir de celle-ci est définie une constante, le coefficient d'extinction ou d'absorption molaire ϵ_λ (L/mol.cm) qui permet de relier la quantité de lumière absorbée sur une longueur de cuve l (cm), pour une longueur d'onde donnée, à la concentration C (mol/L) du fluorophore en solution, selon la loi de Beer-Lambert. Ainsi, pour une longueur d'onde donnée, il est possible de mesurer l'absorbance A ; celle-ci varie linéairement avec la concentration C suivant l'Équation II-1.

$$A = \epsilon_\lambda \times C \times l$$

Équation II-1

Le spectre d'excitation de fluorescence est obtenu par la mesure du nombre de photons émis à une longueur d'onde choisie (de préférence au maximum d'émission) lorsque la longueur d'onde d'excitation varie.

Le spectre d'émission de fluorescence rend compte du nombre de photons émis aux différentes longueurs d'onde par un fluorophore excité. Le spectre d'émission de fluorescence sera le symétrique du spectre d'absorbance par rapport au point de croisement entre les spectres d'absorption et d'émission. Le décalage entre le maximum d'émission et le maximum d'absorption est appelé déplacement de Stokes⁽⁷⁷⁾.

II.2.2.2 Rendement quantique et durée de vie de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence ϕ_F correspond au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Il rend compte de la compétition entre la fluorescence et les autres voies de relaxation d'une molécule excitée.

La durée de vie de fluorescence τ_F correspond quant à elle à la durée moyenne pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état fondamental. A titre d'exemple, cette durée est de l'ordre de la nanoseconde pour un fluorophore organique.

II.2.2.3 Effet de l'environnement : photoblanchiment et solvatochromie

Les propriétés de luminescence des fluorophores organiques sont souvent sensibles au milieu dans lequel ils se trouvent. En effet, l'émission de fluorescence dépend étroitement des paramètres tels que le pH⁽⁷⁸⁾, l'interaction inter et extra-moléculaires⁽⁷⁹⁾, la viscosité⁽⁸⁰⁾. Elle peut également être affectée par deux phénomènes.

Le photoblanchiment

À l'état excité, il existe une certaine probabilité pour qu'elle participe à des réactions chimiques (on parle alors de réactions photochimiques), en particulier avec l'oxygène⁽⁵⁾. Le fluorophore perd alors ses propriétés de fluorescence (photoblanchiment). En conséquence une proportion d'entre elles peut être détruite à chaque instant par ces réactions photochimiques, ce qui engendre une diminution de l'intensité de fluorescence au cours du temps lors d'une irradiation continue.

La solvatochromie

En solution, la position, l'intensité et la forme des bandes d'absorption et de fluorescence des fluorophores diffèrent selon le solvant^(81; 82). Ces changements traduisent une modification de l'interaction qui existe entre le solvant et le fluorophore, notamment lors du passage de ce dernier de l'état fondamental à l'état excité.

En effet lorsque le moment dipolaire du fluorophore diminue lors de son passage à l'état excité. L'état fondamental sera alors plus stabilisé par des solvants polaires. Ceci aura pour effet de nécessiter plus d'énergie pour provoquer la transition électronique d'où un déplacement du maximum d'absorption correspondant vers les courtes longueurs d'ondes (effet hypsochrome). En revanche lorsque le moment dipolaire du fluorophore augmente au cours de la transition vers l'état excité. Il en résulte une stabilité accrue de la forme excitée par des solvants polaires, ce qui favorise la transition d'où un déplacement du

maximum d'absorption correspondant vers les grandes longueurs d'ondes (effet bathochrome).

Cette sensibilité des fluorophores organiques envers les variations chimiques ou physiques de leur environnement peut limiter à terme leur application pratique. Ce qui a poussé entre autre à leur encapsulation dans des matrices en latex^(83; 84) ou silice⁽⁸⁵⁾.

II.3 Encapsulation de fluorophores organiques dans la matrice de silice.

Les nanoparticules de silice encapsulant des fluorophores organiques ont montré des avantages indéniables. Elles présentent un signal de luminescence élevé due à la quantité de fluorophores qu'elles encapsulent et aussi une photostabilité accrue car la matrice de silice protège du milieu environnant^(86; 87). Cela permet d'améliorer la sensibilité de la détection et aussi de lutter contre le photoblanchiment qui survient lors d'exposition prolongée de certains fluorophores organiques à une lumière d'excitation. De plus, la chimie du silicium permet d'effectuer des modifications de surface avec différents groupements chimiques en fonction des besoins spécifiques de l'application. Ces nanoparticules hybrides aux propriétés nouvelles sont utilisées, dans des dispositifs optiques par exemple en bio-imagerie⁽⁸⁸⁾ où il existe une demande importante en matériaux luminescents ultrasensibles, biocompatibles et photostables.

Bien que la préparation de nanoparticules de silice encapsulant des fluorophores organiques soit bien décrite dans la littérature^(86; 87), il n'en demeure pas moins que l'encapsulation des fluorophores organiques qui présentent en général un caractère hydrophobe à l'intérieur de la matrice de silice plutôt hydrophile, n'est pas toujours évidente.

Nous exposerons les techniques mises en œuvre pour encapsuler dans la silice deux types de fluorophores, la flavine Maxilon 10GFF (flavine) et l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Nous examinerons l'effet de certains paramètres de synthèse sur la taille, la polydispersité et les propriétés spectroscopiques (absorption, fluorescence, photoblanchiment, solvatochromie).

II.3.1 Encapsulation de la flavine Maxilon 10GFF (flavine)

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un projet industriel de teinture des fibres aramides communément nommées Nomex®, Kevlar® ou Kermel® et a été breveté⁽⁸⁹⁾. L'objectif était, entre autres, d'améliorer la qualité des colorants luminescents comme la flavine (Figure II-2) utilisés pour la teinture des fibres aramides.

Cette volonté d'améliorer la qualité des colorants fluorescents utilisés pour la teinture des aramides, est liée à une faible tenue de coloration due en partie à la fragilité des fluorophores organique face aux agressions extérieures (lumière solaire, humidité, solvants...) et qui se traduit par une perte rapide de fluorescence.

La solution que nous proposons pour limiter cette dégradation consiste à encapsuler les molécules de flavine dans une matrice de silice qui servira de couche protectrice face aux agressions extérieures.

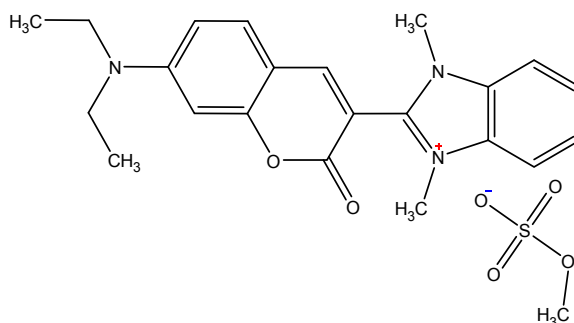


Figure II-2 : Structure chimique de la molécule de flavine

II.3.1.1 Synthèse

La procédure d'encapsulation de la flavine schématisée sur la Figure II-3 consiste à remplacer la phase aqueuse de notre système micellaire inverse (chapitre I.4.1.3) par une solution aqueuse de flavine. Le réseau de silice qui se forme dans les micelles inverses après ajout du tétraéthoxysilane (TEOS) et de l'ammoniaque au mélange devrait donc se bâtir autour des molécules de flavine qui se retrouvent ainsi encapsulées sans lien covalent.

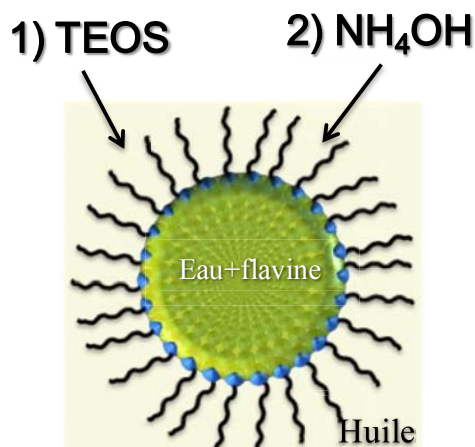


Figure II-3: Schéma de la procédure d'encapsulation de la flavine dans la silice.

Nous avons fait varier le pourcentage d'eau par rapport au triton X-100 (%W) et la concentration massique de la flavine dans la phase aqueuse de la microémulsion (C_{flavine}). Les conditions expérimentales optimales déterminées sont les suivantes : %W=96% et $C_{\text{flavine}}=5\text{g/L}$.

Pour les %W inférieurs, aucune coloration n'a été visuellement observée sur les poudres récupérées après lavage. Les molécules de flavine sont vraisemblablement davantage liées au tensioactif dans ces cas en raison de la petite taille des micelles ($\leq 8\text{ nm}$) et sont de fait difficilement captées à l'intérieur de la matrice de silice. En revanche à %W 96%, la grande taille des micelles (27 nm) et la quantité d'eau plus importante entrainerait une interaction moins forte entre le tensioactif et les molécules de flavine qui deviennent alors plus disponibles pour l'encapsulation.

II.3.1.2 Caractérisations

Les nanoparticules de silice contenant les molécules de flavine (flavine@SiO₂) ont été caractérisées par MET et spectroscopie de fluorescence.

Le cliché de MET de la Figure II-4 montre que le diamètre moyen des nanoparticules est d'environ $22\text{ nm} \pm 7\%$. Cette valeur est à comparer aux $36\text{ nm} \pm 3\%$ obtenus lors de la synthèse dans les mêmes conditions des nanoparticules de silice seule. Cette différence est certainement due à une augmentation de la taille des micelles en raison de la présence des molécules de flavine. En effet, une des conséquences de cette augmentation de taille est comme vu au chapitre I.4.2.6 une augmentation du taux d'hydrolyse des molécules de TEOS qui induit une diminution du diamètre des nanoparticules de silice. Cette faible taille est un atout pour les nanoparticules car c'est un facteur déterminant pour leur application.

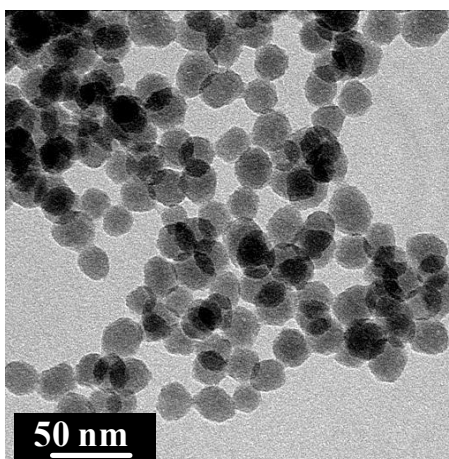


Figure II-4 : Micrographie MET des nanoparticules flavine@SiO₂

En spectroscopie de fluorescence à l'état solide, le graphe A de la Figure II-5 montre que l'encapsulation des molécules de flavine a entraîné un décalage vers le bleu de son spectre d'émission par rapport aux molécules libres. Excité à 450 nm les nanoparticules hybrides flavine@SiO₂ présentent un pic maximal d'émission vers 490 nm alors que les molécules de flavine émettent dans les mêmes conditions à 524 nm.

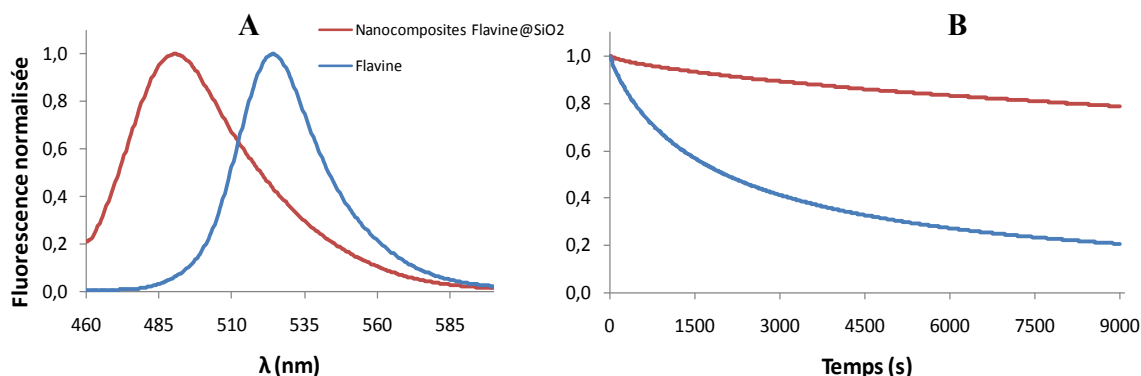


Figure II-5 : A) Spectres d'émission de fluorescence de la flavine et de la flavine@SiO₂ ($\lambda_{exc} = 450$ nm). B) Tests de photostabilité excitation à 450 nm de la flavine ($\lambda_{em} = 524$ nm) et de la flavine@SiO₂ ($\lambda_{em} = 490$ nm).

D'autre part, le graphe B de la Figure II-5 montre que l'encapsulation a également entraîné la diminution du photoblanchiment des molécules de flavine. Les nanoparticules hybrides flavine@SiO₂ perdent environ 21% de leur fluorescence lorsqu'ils sont exposés pendant 9000 secondes à une source de lumière de longueur d'onde égale à 450 nm alors que les molécules de flavine en perdent 79% dans le même intervalle de temps. Cela démontre que dans le réseau de silice, les molécules de flavine sont dans un environnement qui les protège en particulier de l'oxygène de l'air qui provoque le photoblanchiment des fluorophores organiques.

L'encapsulation de la flavine a donc permis de répondre à l'objectif visé qui correspondait à l'obtention d'objets fluorescents présentant une meilleure photostabilité que le fluorophore libre.

II.3.2 Encapsulation de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)

La FITC est une molécule fluorescente présentant une luminescence verte très intense. Elle possède un coefficient d'absorption molaire ϵ_λ très élevé (8.10^4 L/mol.cm) à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm et un haut rendement quantique (0,85). En raison de ces caractéristiques attractives, elle est très largement utilisée comme marqueur fluorescent⁽⁹⁰⁾.

L'encapsulation des molécules de FITC dans les nanoparticules de silice devrait permettre de disposer d'un nanomatériau présentant une forte fluorescence grâce à la concentration de plusieurs molécules en une seule nanoparticule ainsi qu'une plus grande photostabilité.

II.3.2.1 Synthèse

L'encapsulation des molécules de FITC dans les nanoparticules de silice a été réalisée en utilisant la microémulsion inverse à %W = 90,8%. Dans ce procédé 20% du nombre de moles de TEOS utilisées lors de la synthèse des nanoparticules de silice seule sont remplacés par l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES). Par l'intermédiaire de ce silane pourra être établi un lien covalent entre la FITC et la matrice de silice afin d'éviter les problèmes de relargage qui peuvent survenir lorsque le colorant est simplement encapsulé⁽⁹¹⁾.

Préalablement la FITC et l'APTES sont mélangés sous vive agitation pendant 30 mn. La réaction entre la fonction amine de ce silane et la fonction isothiocyanate de la FITC conduit à la formation d'une liaison stable thio-urée entre les deux composés⁽⁸⁵⁾ (Figure II-6).

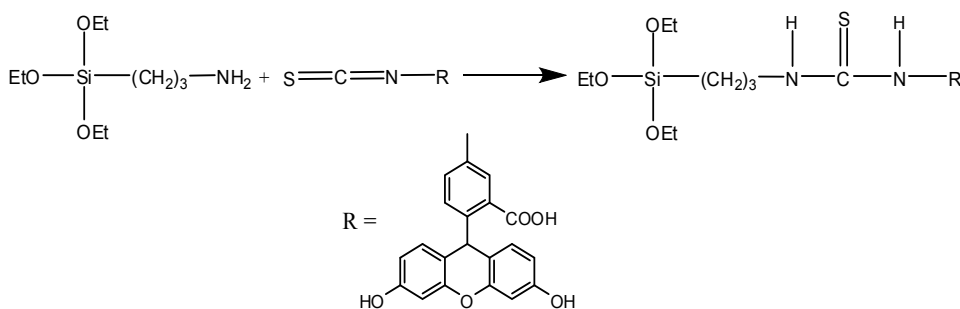


Figure II-6: Couplage APTES-FITC

Le mélange APTES, FITC est ensuite ajouté à la microémulsion inverse afin que les molécules d'APTES couplées avec celles de FITC participent par co-condensation avec le TEOS à l'architecture de la matrice de silice (Figure II-7).

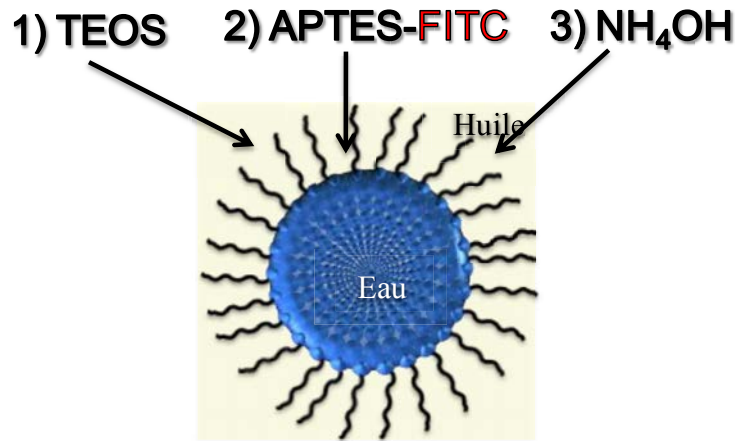


Figure II-7 : Schéma de la procédure d'incorporation de la FITC dans la silice

II.3.2.2 Variation de la quantité de FITC encapsulée dans la matrice de silice

Cette partie a pour objet l'étude de l'influence de la quantité de FITC incorporée dans la matrice de silice sur les caractéristiques morphologiques et optiques des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂.

Nous avons préparé une série de solution de couplage APTES-FITC avec des rapports molaires FITC:APTES variant de 1:472 à 1:7 (Tableau II-1). Ensuite un même volume de chaque solution de couplage est utilisé pour synthétiser des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂.

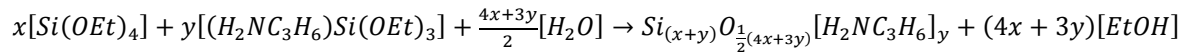
La quantité réelle de FITC encapsulée dans les nanoparticules hybrides respectives a été déterminée de manière indirecte. Nous avons dosé par fluorescence la quantité de FITC non encapsulée c'est-à-dire la quantité de fluorophores présents dans les différentes solutions de surnageant lors des étapes de lavages par centrifugation des nanoparticules hybrides (Annexe B). De cette valeur a été déduite la quantité de FITC encapsulée.

Le pourcentage de FITC par unité de masse de nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ (%m_{FITC}) est ensuite calculé en assumant que la totalité de la masse de FITC encapsulée (m_{FITC}) est répartie uniformément dans la masse de la couche de polysiloxane (m_{polysiloxane}) (Équation II-2).

$$\%m_{FITC} = \frac{m_{FITC}}{m_{FITC} + m_{polysiloxane}}$$

Équation II-2

L'expression de la masse de la couche de polysiloxane $m_{polysiloxane}$ obtenue lorsque x moles de TEOS et y moles d'APTES réagissent (Équation II-3) est donnée par l'Équation II-4.



Équation II-3

$$m_{polysiloxane} = (x + y)M_{Si} + \frac{1}{2}(4x+3y)M_O + yM_{H_2NC_3H_6}$$

Équation II-4

Avec M_{Si} , M_O et $M_{H_2NC_3H_6}$ respectivement masse molaire du silicium, de l'oxygène et de la chaîne aminopropyle. Le coefficient de l'oxygène est divisé par deux car les molécules d'oxygène sont partagées entre deux atomes de silicium (Figure II-8).

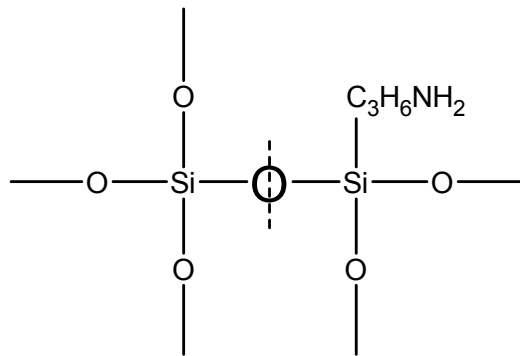


Figure II-8 : Couche de polysiloxane

Les valeurs de ($\%m_{FITC}$) obtenues en fonction du rapport molaire initial FITC:APTES sont consignées dans le Tableau II-1.

Tableau II-1 : Pourcentage de FITC encapsulé dans les nanoparticules en fonction du rapport FITC:APTES

FITC:APTES	1:472	1:236	1:113	1:56	1:28	1:14	1:7
$\%m_{FITC}$	0,05%	0,15%	0,36%	0,74%	1,70%	3,49%	4,96%

Ces valeurs seront utilisées dans la suite pour évaluer l'effet de $\%m_{FITC}$ sur la taille, la polydispersité et la fluorescence des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂.

II.3.2.2.1 Effet sur la taille

La taille et la polydispersité des nanoparticules hybrides ont été étudiées par microscopie électronique à transmission. Les différents clichés effectués ainsi que les mesures de diamètre moyen des nanoparticules hybrides et d'écart-type associés sont représentés sur la Figure II-9.

Les nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ observées sur les clichés de MET sont dans l'ensemble sphériques et bien individualisées. Les résultats des mesures de taille montrent qu'à la plus faible valeur du rapport FITC:APTES deux populations de nanoparticules existent : une d'une cinquantaine de nanomètres et une autre d'une centaine de nanomètres. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les molécules d'APTES sont plus nombreuses aux faibles rapports FITC:APTES, en considérant une quantité d'APTES initialement introduite constante. En effet lors de la réaction de couplage entre l'APTES et la FITC il en résultera statistiquement plus de molécules d'APTES non modifiées lorsqu'il y a moins de molécules de FITC. Or les molécules d'APTES ont tendance à augmenter ou à perturber la taille et l'uniformité des nanoparticules qui se forment lorsqu'elles réagissent avec des molécules de TEOS^(92; 93). Ensuite lorsque ce rapport augmente la polydispersité des nanoparticules diminue et leur taille plus petite au début s'approche de plus en plus de la taille des nanoparticules de silice seules qui est de 97 nm.

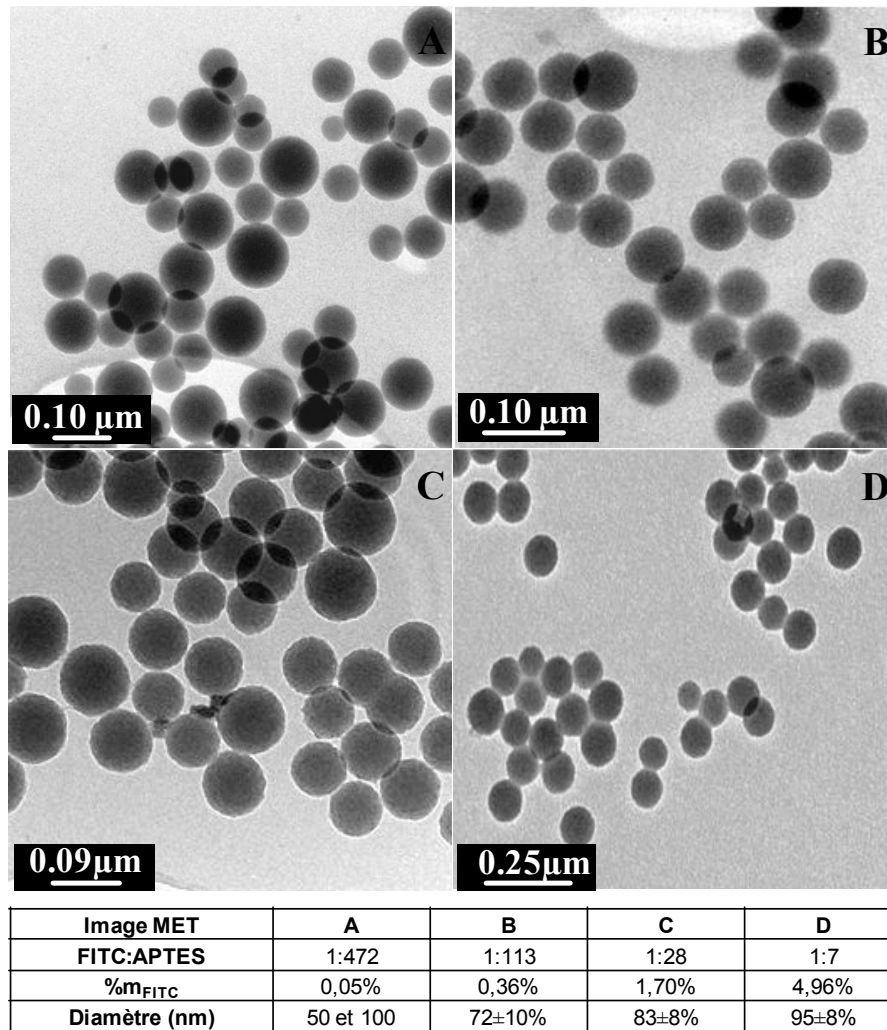


Figure II-9 : Micrographies MET et taille des nanoparticules FITC@SiO₂ en fonction du rapport FITC:APTES

Cette étude nous montre que pour obtenir des nanoparticules monodisperses il est nécessaire de se placer dans une gamme de rapport FITC:APTES supérieur ou égal à 1:113.

II.3.2.2.2 Propriétés optiques des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂

Les propriétés optiques des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ en fonction du taux d'encapsulation ont été étudiées par spectroscopie de fluorescence. Les nanoparticules ont été dispersées dans l'éthanol et les échantillons de concentration identique (0,5g/L) ont été passés aux ultrasons avant chaque acquisition de donnée. Les spectres de fluorescence des différentes dispersions de nanoparticules dans l'éthanol représentés sur la Figure II-10 montrent que l'intensité de fluorescence des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ n'est pas proportionnelle à %m_{FITC}. D'autre part les pics d'émission se décalent de 525 à 543 nm lorsque %m_{FITC} augmente.

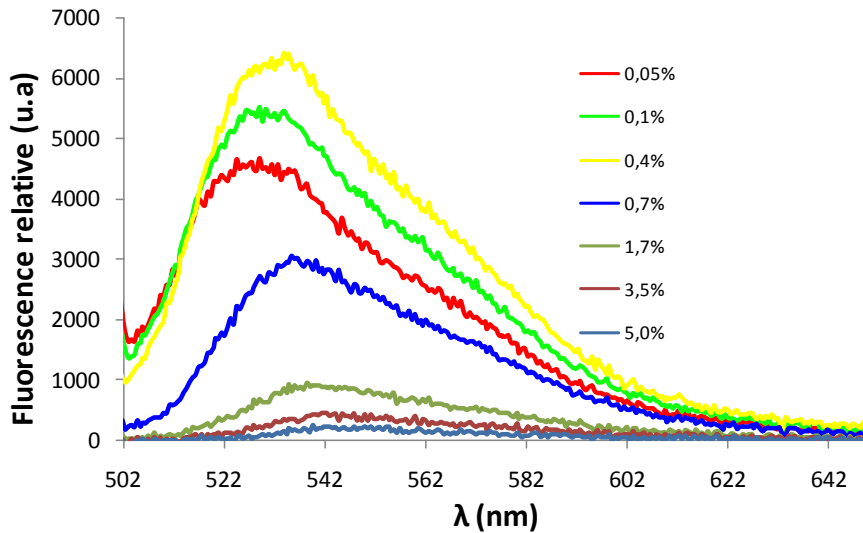


Figure II-10 : Spectres de fluorescence (λ_{exc} 490 nm) des nanoparticules FITC@SiO₂ : Variation de %m_{FITC}

La courbe de la Figure II-11 représente la variation de cette intensité maximale et elle met en évidence l'existence d'un maximum de fluorescence vers %m_{FITC} = 0,4%.

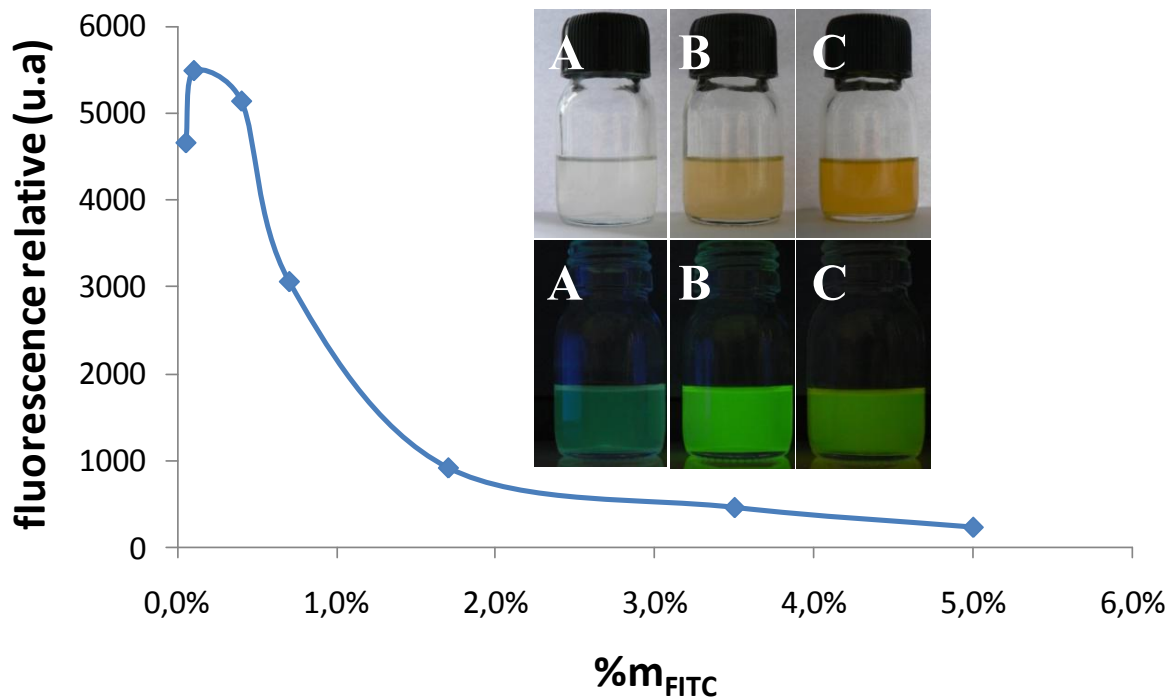


Figure II-11 : Variation de l'intensité d'émission maximale en fonction de m_{FITC} et photographies des solutions de nanoparticules FITC@SiO₂ avant et après excitation à 320 nm. (A) 0,05%, (B) 0,4%, et (C) 5%

Au delà de cette valeur, l'intensité de fluorescence diminue. Cette baisse peut être attribuée à l'augmentation du nombre de FITC par nanoparticules qui favorise le transfert d'énergie radiative entre molécules de FITC. Ce phénomène est connu sous le nom de Förster quenching⁽⁹⁴⁾.

D'après les résultats précédents, les nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ les plus satisfaisantes en termes de taille, polydispersité et fluorescence sont celles obtenues avec un rapport FITC:APTES égal à 1:113 (%m_{FITC} = 0,4%). Elles ont donc été choisies pour effectuer une étude de comparaison avec le fluorophore libre.

II.3.2.3 Comparaison avec la molécule de FITC

Afin d'évaluer les bénéfices de l'encapsulation du fluorophore, la fluorescence et la stabilité des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ (0,4%) ont été comparées avec les propriétés du fluorophore libre.

II.3.2.3.1 Fluorescence

Deux séries de solutions contenant respectivement différentes quantités de nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ (0,4%) et de FITC libre dispersée dans l'éthanol ont été préparées. La fluorescence des solutions en fonction de la concentration molaire en objets, respectivement nanoparticules ou molécules, a été mesurée après excitation à 490 nm (Figure II-12). La concentration molaire des solutions contenant les nanoparticules FITC@SiO₂ (0,4%) a été déterminée par rapport à la masse de FITC@SiO₂ (0,4%) introduite et celle d'une nanoparticule déduite des conditions expérimentales dont la valeur est de l'ordre de 4.10⁻¹⁶g (Annexe C). Les spectres de fluorescence des différentes solutions excitées à 490 nm sont représentés sur la Figure II-12.

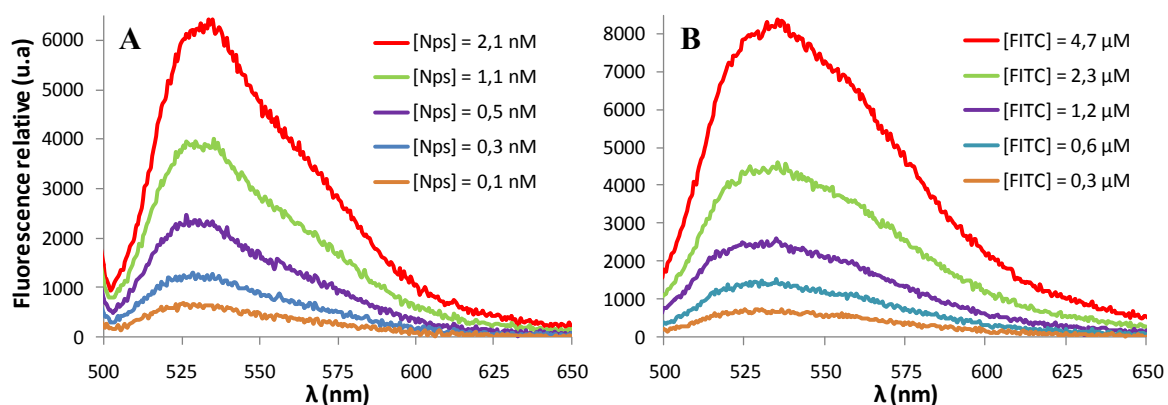


Figure II-12 : Spectres de fluorescence (λ_{exc} 490 nm). A) nanoparticules FITC@SiO₂, B) FITC. Variation de la concentration molaire. (nM : nanomolaire), (μ M : micromolaire)

A partir de ces spectres et en nous plaçant dans la gamme de concentration où la fluorescence est linéaire, nous avons reporté sur les Figure II-13 A et B l'intensité maximale de fluorescence respectivement de FITC@SiO₂ (0,4%) en fonction de la concentration en nanoparticules et de la FITC en fonction de la concentration en molécules.

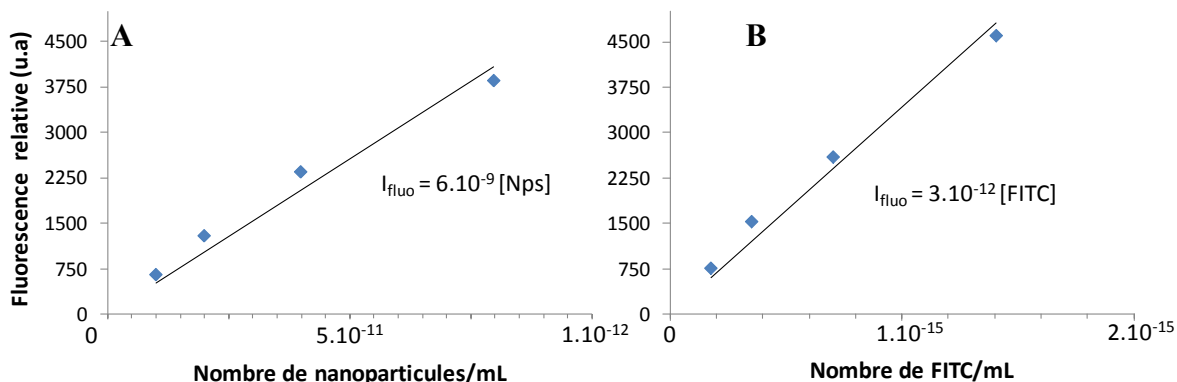


Figure II-13 : Variation de l'intensité d'émission maximale en fonction du nombre d'objets. A) nanoparticules FITC@SiO₂, B) FITC

Les relations respectives entre l'intensité de fluorescence et la concentration que nous en avons déduites, indique qu'une nanoparticule hybride FITC@SiO₂ (0,4%) présente une intensité de fluorescence environ mille fois plus importante qu'une molécule de FITC. Ce résultat permet d'envisager une augmentation de la sensibilité de détection grâce à l'emploi des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂⁽⁹⁵⁾. Ainsi le suivi de cibles ou de phénomènes indétectables par les techniques actuelles de marquage pourraient devenir possible après marquage par ce type de nano-objet.

II.3.2.3.2 Stabilité

La deuxième propriété de la nanoparticule hybride fluorescente que nous avons souhaité étudier est sa stabilité. Pour cela, des expériences de photoblanchiment et de solvatochromisme ont été menées.

II.3.2.3.2.1 Photoblanchiment

Deux solutions contenant l'une de la FITC et l'autre des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ (0,4%) de concentration massique identique ont été soumises à une excitation à 490 nm pendant 9000 s.

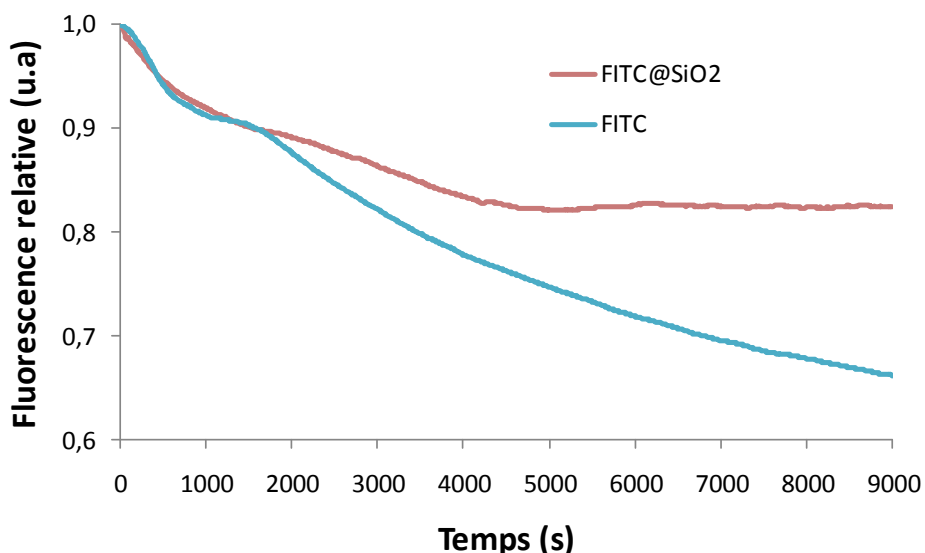


Figure II-14 : Tests de photostabilité excitation à 490 nm. Longueur d'onde d'émission : 522 nm pour la FITC et 514 nm pour la FITC@SiO₂

L'analyse des spectres de la Figure II-14 montre que l'intensité de fluorescence initiale des solutions de FITC@SiO₂ (0,4%) et de FITC a respectivement diminué de 17% et de 34%. Cela prouve que les nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ (0,4%) sont plus photostables que la FITC. L'encapsulation de la FITC dans la silice a comme dans le cas de la flavine permis de protéger les molécules de FITC du photoblanchiment provoqué en général par l'oxygène.

II.3.2.3.2 Solvatochromisme

La fluorescence de la FITC et des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ (0,4%) a ensuite été mesurée dans l'eau, l'éthanol, et l'acétone en excitant à 490 nm les différentes solutions de concentration massique identique (Figure II-15).

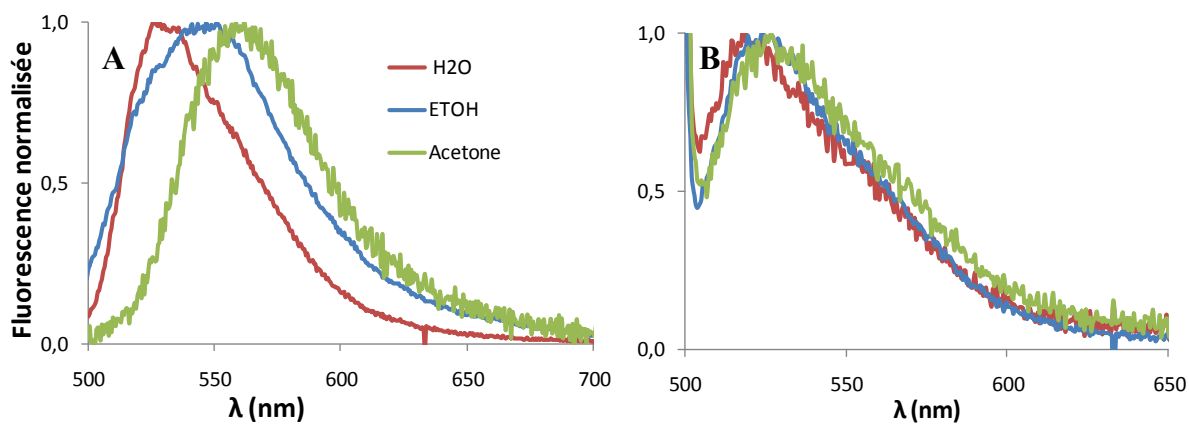


Figure II-15 : Spectres de fluorescence (excitation 490 nm). A) FITC, B) FITC@SiO₂. Variation du solvant

Les spectres obtenus montrent que la position des pics de fluorescence de la FITC varie lorsque le solvant change (Figure II-15 A). Elle se décale vers les plus faibles longueurs d'onde (effet hypsochrome) lorsque la polarité du solvant augmente (Tableau II-2). Les molécules de FITC subissent un solvatochromisme.

Tableau II-2 : Déplacement du pic de fluorescence de la FITC en fonction de la polarité Z⁽⁸¹⁾ du solvant

	Z (polarité échelle de Kosower) (Kcal/mol)	$\lambda_{\text{Imax}}^{\text{a}}$ (nm)
Acetone	65,5	561
Ethanol	79,6	550
Eau	94,6	528

^aLongueur d'onde du maximum de fluorescence

En revanche, dans le cas des nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ (0,4%) (Figure II-15 B) la position des pics de fluorescence reste quasiment inchangée quelque soit le solvant. L'encapsulation des molécules de FITC dans la matrice de silice permet donc de les protéger du solvatochromisme.

Il ressort de ces études que les nanoparticules hybrides FITC@SiO₂ (0,4%) sont plus fluorescentes, plus stables vis-à-vis du photoblanchiment et ne souffrent pas du solvatochromisme.

II.4 Encapsulation de nano-objets dans la matrice de silice.

La silice a été souvent utilisée pour encapsuler des nano-objets comme des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_2O_3) ou de titane (TiO_2), des nanoparticules de semi-conducteur⁽⁷³⁾ et aussi des nanoparticules métalliques en l'occurrence d'or et d'argent. Ces deux dernières présentent des propriétés inhabituelles (paragraphe II.4.4) qui peuvent être exploitées dans le domaine de l'optique⁽⁷⁾, de l'électronique, de la catalyse ainsi que de la biologie^(96; 97; 98). Cependant pour certaines applications elles sont souvent freinées par des problèmes de stabilité chimique (oxydation) et des problèmes de dispersion. C'est pourquoi leur encapsulation dans une matrice de silice a été une voie exploitée car en plus de conférer une meilleure stabilité aux nanoparticules métalliques, elle simplifie l'introduction en surface de groupements chimiques fonctionnels qui vont permettre la connexion des nanoparticules à d'autres matériaux, objets ou macromolécules.

Après une description de quelques méthodes chimiques employées pour préparer et encapsuler des nanoparticules d'or et d'argent nous décrirons les deux procédés de synthèse que nous avons conçus pour réaliser de manière contrôlée des structures cœur@coquille. Nous terminerons cette partie par une étude de leurs propriétés spectroscopiques.

II.4.1 Méthodes de préparation et d'encapsulation de nanoparticules d'or et d'argent

Les nanoparticules métalliques peuvent être préparées et stabilisées par des procédés physiques ou chimiques. L'approche chimique, telle que la réduction chimique est toutefois la plus utilisée.

II.4.1.1 Méthodes de préparation

Pour l'or deux principales voies de synthèse sont généralement utilisées

- ✚ La méthode rapportée par Turkevich et modifiée par Frens. Dans cette méthode la réduction du sel d'or par le citrate de sodium conduit à la formation rapide d'un colloïde dans lequel les nanoparticules d'or de taille comprise entre 16 nm et 150 nm sont stabilisées par les mêmes molécules de citrate qui s'adsorbent en surface. Elles assurent de fait à la fois une répulsion stérique et une répulsion électrostatique en raison de leur charge.

- ✚ La méthode de Brust⁽⁹⁹⁾. Ici la réduction du sel de HAuCl_4 est assurée par le borohydrure de sodium (NaBH_4) en présence d'un thiol. Elle conduit à des nanoparticules d'or Au^0 en général de tailles plus petites recouvertes d'une monocouche de molécules thiolées à leur surface qui vont permettre de limiter l'agrégation et d'améliorer la stabilité colloïdale des nanoparticules.

Ces deux méthodes ont été aussi largement appliquées pour la préparation de nanoparticules d'argent.

Une adaptation de ces deux méthodes de synthèse de nanoparticules métalliques par voie micellaire a également été proposée. En effet, comme nous l'avons vu, les milieux micellaires inverses offrent de vastes possibilités pour la synthèse de nanomatériaux. Ces dernières années, les nanoréacteurs que sont les micelles inverses ont donc été mis à profit pour obtenir des nano-objets à base de métaux, semi-conducteurs, oxydes^(100; 54; 58; 72; 101), par réduction chimique, radiolyse, photo-réduction, sonification et co-précipitation. La méthode de synthèse de nanoparticules métalliques par microémulsion inverse consiste en général à réduire le sel métallique solubilisé dans les micelles inverses avec du borohydrure de sodium (NaBH_4) ou de l'hydrazine (N_2H_4)⁽¹⁰²⁾. La réduction peut s'effectuer de deux manières, par mélange de deux systèmes micellaires inverses distincts ou par mélange d'un des réactifs solubilisés dans les micelles inverses avec l'autre dissout dans l'eau. L'échange de matières contenues dans les micelles inverses lorsque qu'elles rentrent en contact provoque ensuite la réaction entre les réactifs et la formation des nanoparticules au sein des micelles inverses. La taille des nanoparticules peut être modifiée par variation de la concentration de réactifs utilisés, du pourcentage d'eau par rapport au tensioactif (%W) qui contrôle la dimension des micelles et de la température. Diverses nanoparticules métalliques ont ainsi pu être obtenues notamment par Pileni et al^(102; 103; 104; 105; 106; 107). Leur approche consiste à substituer le contre ion sodium du di(éthyl-2,hexyl) sulfosuccinate ($\text{Na}(\text{AOT})$) un tensioactif anionique, par le cation métallique correspondant et de préparer une microémulsion avec ce tensioactif modifié. Les nanoparticules métalliques sont ensuite formées par mélange d'une microémulsion identique en composition mais contenant un agent réducteur (NaBH_4 ou N_2H_4) dans sa phase aqueuse. Cependant avec cette méthode les propriétés de la molécule tensioactive risquent d'être affectées et par conséquent celles de la microémulsion comme par exemple les temps

d'échange, l'encombrement stérique ou encore la quantité maximale d'eau solubilisée dans les micelles.

Ces nanoparticules d'or ou d'argent ainsi stabilisées peuvent toutefois être handicapées par la désorption des espèces en surface. L'encapsulation dans une couche de silice s'est avérée être une alternative intéressante dans la mesure où elle résout à la fois le problème de stabilisation en induisant un encombrement stérique autour du cœur métallique et celui du greffage de molécules organiques.

II.4.1.2 Méthodes d'encapsulation

Le procédé le plus couramment utilisé pour encapsuler des nanoparticules métalliques dans la silice consiste à former une couche régulière de silice autour des nanoparticules métalliques par hydrolyse-condensation du tétraéthoxysilane (TEOS). Si ce procédé fonctionne bien pour des nanoparticules d'oxydes de fer (Fe_2O_3) ou de titane (TiO_2), il requiert pour de nombreux autres, l'aide de stabilisants ou de surfactants⁽¹⁰⁸⁾. Ces derniers vont permettre de stabiliser les nanoparticules métalliques à encapsuler dans les milieux où la réaction d'hydrolyse-condensation du TEOS est possible. Dans d'autres cas, l'encapsulation des colloïdes métalliques surtout celles d'or et d'argent nécessite en plus l'aide d'agents de couplage de type alcoxysilane⁽¹⁰⁹⁾. Ces agents de couplage alcoxysilanes possèdent en général un groupement d'ancrage de surface et des amorceurs de polymérisation qui vont assurer le lien avec les produits d'hydrolyse du TEOS.

De cette manière, des nanoparticules d'or fonctionnalisées par différents stabilisants ont pu être encapsulées dans la silice^(110; 111; 108). Cependant il faut des conditions bien précises et souvent discutées pour faire croître directement la couche de silice autour des nano-objets. Par exemple, pour les nanoparticules d'or stabilisées par des molécules de citrate, les résultats sont contradictoires : Liz-Marzan *et al* revendiquent une encapsulation directe alors que van Blaaderen *et al*⁽¹⁰⁸⁾ ont démontré que cela n'était pas possible. Cet exemple montre la difficulté d'obtenir des conditions d'enrobage direct réellement reproductibles. Il a ainsi été suggéré l'utilisation d'agent de couplage comme l'aminopropyltriéthoxysilane^(110; 111) pour parvenir à une plus grande affinité de la surface des nano-objets d'or avec la silice.

Ces procédés utilisés nécessitent dans l'ensemble plusieurs étapes, parfois peu reproductibles. Pour encapsuler des nanoparticules d'or et d'argents de façon simple,

rapide et reproductible nous avons mis au point deux techniques, la première en deux étapes et la seconde en une seule.

II.4.2 Encapsulation en deux étapes.

Cette technique s'apparente à celle développée par Koole et *al* pour l'encapsulation de nanoparticules de semi-conducteurs (Quantum Dots) dans la silice⁽⁷³⁾. Dans la première étape du procédé, nous avons préparé des nanoparticules métalliques stabilisées avec une molécule hydrophile. Dans un deuxième temps, ces nanoparticules métalliques hydrophiles sont introduites dans la microémulsion inverse pour être encapsulées dans la matrice de silice par hydrolyse-condensation de précurseurs alcoxysilanes.

II.4.2.1 Synthèse des nanoparticules d'or et d'Argent hydrophile.

La préparation des nanoparticules d'or et d'argent hydrophiles est une méthode développée au LPCML⁽¹¹²⁾. Dans cette synthèse, le DTDTPA (Dithiol diéthylénetriaminepentacétique acide) (Figure II-16) est employé comme ligand pour stabiliser les nanoparticules métalliques. Les ligands de type DTPA (acide diéthylénetriaminepentacétique) sont souvent utilisés pour complexer des ions paramagnétiques, comme Gd^{3+} ou radioactifs, comme ($^{111}In^{3+}$) en tant qu'agent de contraste dans l'imagerie médicale⁽¹¹³⁾ respectivement en imagerie par résonance magnétique (IRM) et en scintigraphie. L'implication de cette molécule dans la synthèse est double. Il joue le rôle d'agent de contrôle de taille grâce à ses deux groupements thiol qui s'adsorbent à la surface des nanoparticules métalliques lors de leur croissance. Il assure également leur stabilité colloïdale en milieu aqueux grâce à ses trois groupements carboxyliques. En outre, il permet la post-fonctionnalisation des nanoparticules métalliques car chacune des trois fonctions, acide carboxylique libre peut servir de site d'ancrage pour des molécules présentant des fonctions amines ou alcools.

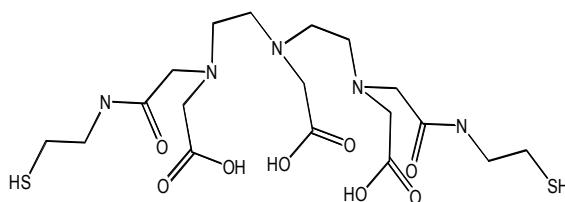


Figure II-16: Molécule de DTDTPA

Les nanoparticules d'or et d'argent hydrophiles obtenues en réduisant respectivement le tétrachloroaurate d'hydrogène ($HAuCl_4$) et le nitrate d'argent ($AgNO_3$) par le borohydrure

de sodium (NaBH_4) en présence du DTDTPA sont présentées sur les clichés de MET de la Figure II-17.

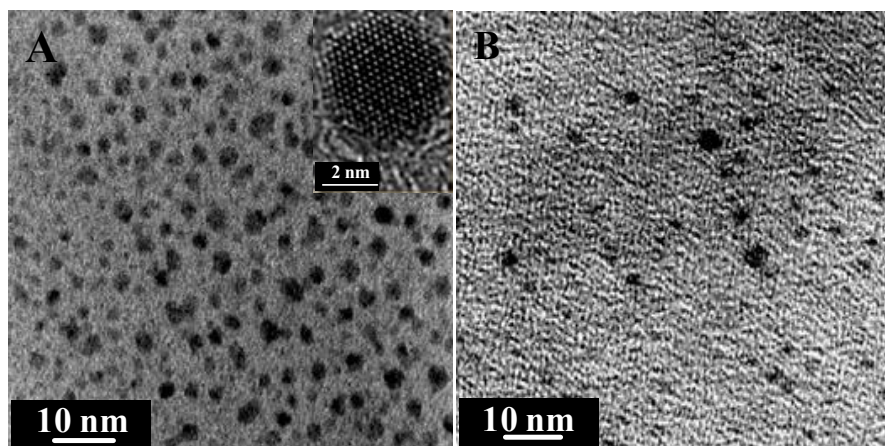


Figure II-17: Micrographies MET : A (Au-DTDTPA), B (Ag-DTDTPA)

D'après les mesures de taille, le diamètre moyen des nanoparticules d'or (Au-DTDTPA) est de 2,4 nm et celui des nanoparticules d'argent (Ag-DTDTPA) se situe entre 2,5 et 7 nm. L'introduction de ces nano-objets dans les micelles inverses, dont les tailles sont du même ordre (Tableau I-10), peut donc être envisagée ouvrant la voie à leur possible encapsulation dans la matrice de silice.

II.4.2.2 Encapsulation des nanoparticules d'or dans la matrice de silice.

Nous avons mené une première étude détaillée sur l'encapsulation des nanoparticules d'or. Notre méthode représentée sur le schéma de la Figure II-18 est similaire à celle utilisée pour l'encapsulation de la flavine. Elle consiste à remplacer la phase aqueuse de notre système micellaire inverse par une dispersion aqueuse de nanoparticules Au-DTDTPA de concentration massique connue, puis de faire croître le réseau de silice dans les micelles, suivant le protocole mis au point au chapitre I.4.2.

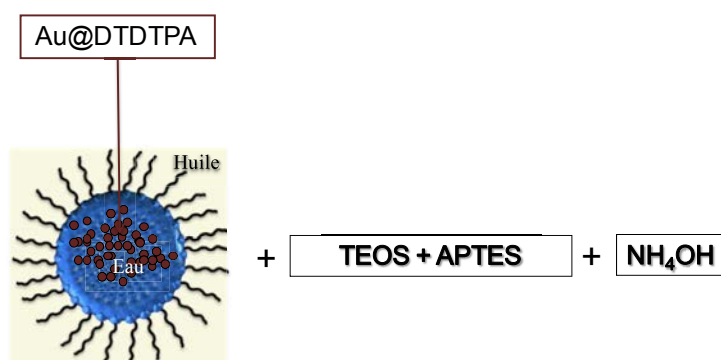


Figure II-18 : Schéma de la procédure d'encapsulation des nanoparticules métalliques dans la silice.

La synthèse est effectuée pour un pourcentage d'eau par rapport au Triton X-100 (%W) de 90,8% avec une concentration massique des nanoparticules Au-DTDTPA dans la phase aqueuse de la microémulsion ($C_{\text{Au-DTDTPA}}$) de 1g/L.

Le cliché de MET des nanoparticules issues de la synthèse effectuée avec seulement du TEOS (Figure II-19) montre que les structures Au-DTDTPA@SiO₂ formées, sont de taille et de forme non contrôlées. Les nanoparticules d'or sont plutôt localisées en surface.

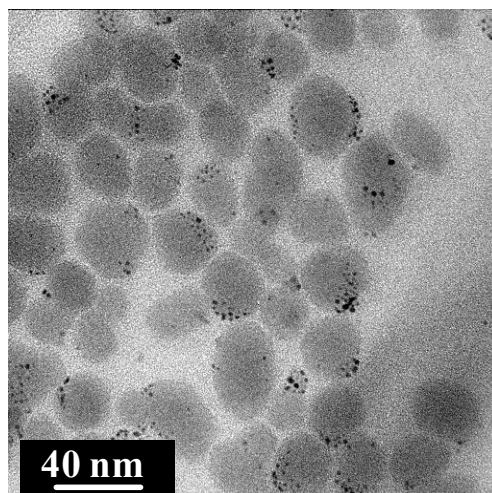


Figure II-19 : Micrographe MET de nanoparticules Au-DTDTPA@SiO₂

Pour améliorer l'encapsulation, nous avons utilisé un mélange de TEOS et d'APTES afin que la fonction amine de l'APTES interagisse avec les groupements carboxyliques à la surface des nanoparticules Au-DTDTPA. Cette interaction devrait permettre une meilleure incorporation dans le réseau de polysiloxane et donc une croissance plus homogène de la couche de silice.

L'effet de l'APTES sur la structure finale des nanoparticules a été étudié dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus à savoir %W= 90,8% et $C_{\text{Au-DTDTPA}}$ =1g/L. Sur la Figure II-20 sont présentés les clichés de MET des nanoparticules Au-DTDTPA@SiO₂ obtenues lorsque pour un nombre de moles de silane constant nous avons fait varier le pourcentage molaire d'APTES par rapport au TEOS (%APTES).

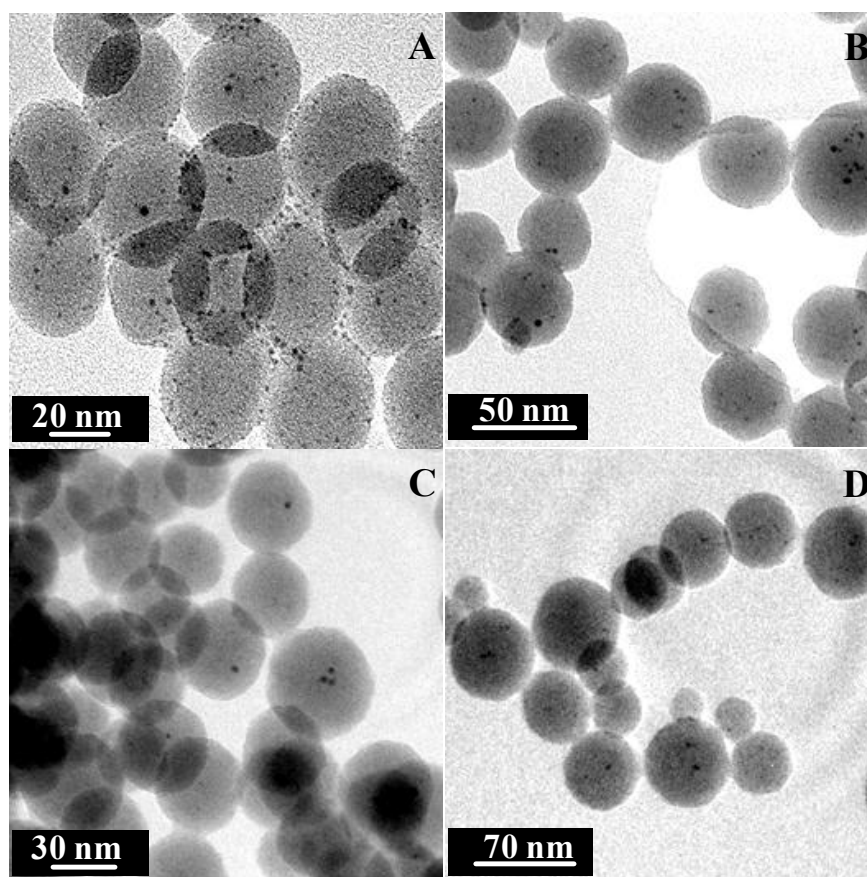


Figure II-20 : Micrographies MET Au-DTDTPA@SiO₂. Variation %APTES : A(10%), B(20%), C(30%), D(40%)

Les nanoparticules sont cette fois-ci de forme bien sphérique. Les résultats des mesures de taille (Tableau II-3) montrent que le diamètre moyen et la polydispersité des nanoparticules augmentent respectivement de 36 à 57 nm et de 4% à 28% lorsque %APTES passe de 10 à 40%.

Tableau II-3 : Diamètre des nanoparticules Au@SiO₂ en fonction du pourcentage d'APTES

Micrographies MET	A	B	C	D
% APTES	10%	20%	30%	40%
Diamètre (nm)	36±1	43±4	43±5	47±15
Ecart type	4%	9%	13%	32%

En outre, nous pouvons observer que les nanoparticules d'or semblent migrer de la périphérie vers le centre de la sphère quand le pourcentage d'APTES passe de 10% à 30%. Cette observation est confirmée par une analyse stéréoscopique réalisée sur les nanoparticules de la Figure II-20 B (20% APTES) par MET en mode balayage et annulaire champ sombre à grand angle (STEM-HAADF) (Scanning transmission electron microscopy-High angle annular dark field). Des clichés d'une même zone de l'échantillon

sont pris sous différents angles en le faisant pivoter le long de l'axe (oy) avec des incréments réguliers. Le traitement informatique de la série d'images a ensuite permis une reconstruction 2D puis 3D des nanoparticules (Figure II-21). Cette visualisation tridimensionnelle prouve que la majorité des nanoparticules d'or est bien localisée dans la matrice de silice.

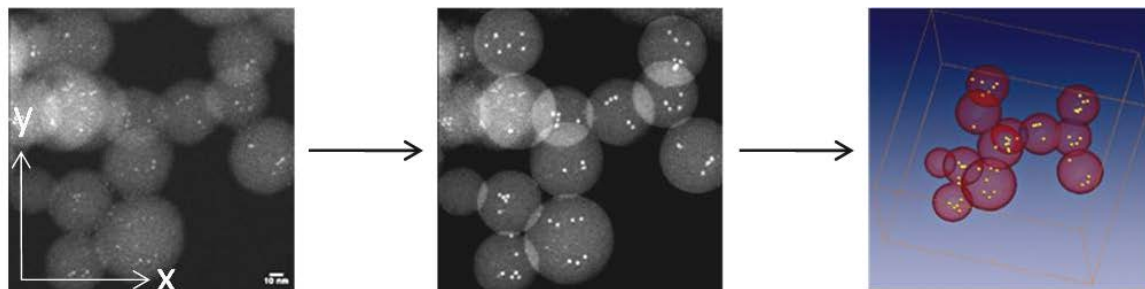


Figure II-21 : Image STEM-HAADF : Reconstruction 2D et 3D des nanoparticules Au-DTDTPA@SiO₂ (20% APTES)

L'emploi de l'APTES en combinaison avec le TEOS a donc bien aidé à encapsuler les nanoparticules d'or au sein de la silice. Cette encapsulation semble optimale pour un pourcentage d'APTES par rapport au TEOS d'environ 20%. En deçà, les nanoparticules d'or sont plutôt localisées en surface et au-delà il y a augmentation de la taille et de la polydispersité des nanoparticules Au@SiO₂.

Lorsque la concentration massique des nanoparticules d'or dans la phase aqueuse de la microémulsion ($C_{\text{Au-DTDTPA}}$) a été portée à 4g/L, il s'en est suivi comme attendu un accroissement du taux d'or par bille de silice (Figure II-22).

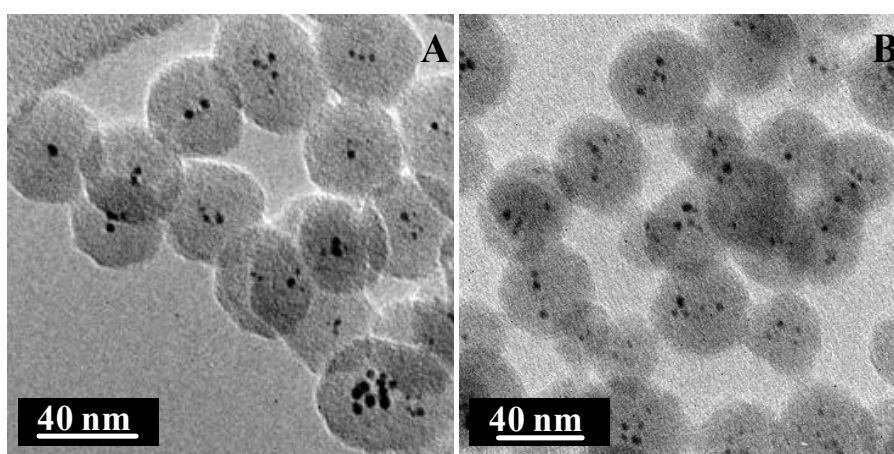


Figure II-22 : Micrographies MET des composites Au-DTDTPA@SiO₂ ($C_{\text{Au-DTDTPA}}=4\text{g/L}$) obtenus avec un pourcentage d'APTES égal à (A) 20% ou (B) 40%

De plus, à cette concentration de nanoparticules d’or dans la phase aqueuse de la microémulsion, la taille des nanoparticules Au-DTDTPA@SiO₂ obtenues semble moins être affectée par les problèmes de variation de taille et de polydispersité liés à l’augmentation de %APTES (Tableau II-4).

Tableau II-4 : Diamètre des nanoparticules Au@SiO₂ (C_{Au-DTDTPA}=4g/L) en fonction du pourcentage d’APTES

Micrographies MET	%APTES	Diamètre (nm)	Ecart type (%)
A	20%	41.0±0.2	1%
B	40%	42±6	14%

II.4.2.3 Encapsulation des nanoparticules d’argent dans la matrice de silice.

Transposée aux nanoparticules d’argent, la technique d’encapsulation a permis d’élaborer des nanoparticules Ag-DTDTPA@SiO₂ (Figure II-23). Elles ont un diamètre d’environ 39 nm donc du même ordre que les nanoparticules Au-DTDTPA@SiO₂ synthétisées dans les mêmes conditions (20% APTES et C_{Ag-DTDTPA} 2g/L). Toutefois la répartition des cœurs métalliques diffère. Les nanoparticules Ag-DTDTPA@SiO₂ présentent une structure cœur@coquille mieux définie. En revanche, sont présentes des billes de silice non dopées ainsi que des nanoparticules Ag-DTDTPA non encapsulées.

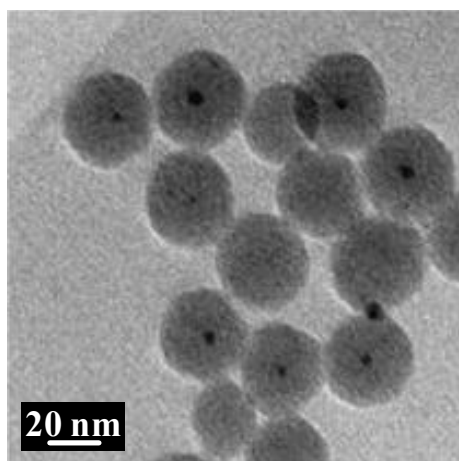


Figure II-23 : Micrographe MET Ag-DTDTPA@SiO₂. (20% APTES et C_{Ag-DTDTPA} 2g/L)

Ce procédé d’encapsulation de nanoparticules d’or et d’argent dans une matrice de silice par microémulsions est prometteur car il devrait pouvoir être appliqué à d’autres nanoparticules métalliques à condition qu’un agent stabilisant hydrophile, comme le DTDTPA, puisse être greffé à leur surface. Toutefois cette technique nécessite au moins deux étapes de lavage ainsi que la synthèse organique du ligand.

Afin d'alléger le procédé et de réduire le nombre d'étapes, nous avons développé une synthèse qui consisterait à effectuer la synthèse et l'encapsulation des nanoparticules métalliques successivement dans un même système micellaire.

II.4.3 Synthèse One-pot séquentielle de structure cœur@coquille métal@silice

L'approche que nous proposons ici pour réaliser les structures cœur@coquille métal@silice consiste à ajouter successivement tous les réactifs dans le même milieu réactionnel. Concrètement, nous prévoyons de réduire le sel métallique solubilisé dans la phase aqueuse de la microémulsion en présence de l'APTES. Cette molécule est amenée à jouer le même rôle que le DTDTPA précédemment, c'est-à-dire stabiliser les nanoparticules métalliques tout en préparant leur surface pour la croissance de la silice. Les groupes silanols des molécules d'APTES en interaction avec la surface des nanoparticules métalliques serviront ultérieurement de points d'ancrage au réseau de polysiloxane. Cette procédure de fabrication a déjà été utilisée pour incorporer des nanoparticules d'or dans des gels à base de silice⁽¹¹⁴⁾. Elle permettra d'obtenir des structures cœur@coquille métal@silice sans étape intermédiaire donc d'éviter les processus de séparation, de purification et de redispersion source de pertes de temps et de produit.

II.4.3.1 Application à la synthèse de structure cœur@coquille argent@silice.

Les structures cœur@coquille argent@silice (Ag@SiO_2) ont été synthétisées par adaptation du système de microémulsion inverses eau/triton-X100/hexanol/cyclohexane. Dans un premier temps, du nitrate d'argent solubilisé dans la phase aqueuse de la microémulsion a été réduit par du borohydrure de sodium (NaBH_4) en présence de l'APTES. Les nanoparticules d'argent se forment en quelques secondes, en témoigne le changement de couleur de la microémulsion. Après la formation de la solution colloïdale d'argent, du TEOS et de l'ammoniaque sont ajoutés dans le milieu réactionnel pour former la couche de silice. Comme précédemment, les produits de la synthèse sont séparés du milieu réactionnel et analysés après une nuit d'agitation.

L'influence respective de deux paramètres, le pH et le pourcentage molaire d'APTES par rapport au TEOS (%APTES), a été examinée afin de déterminer les conditions optimales d'encapsulation.

II.4.3.1.1 Influence du pH et effet du pourcentage molaire de l'APTES par rapport au TEOS (%APTES)

Dans les micelles inverses, les molécules d'APTES hydrolysées peuvent exister sous plusieurs formes en fonction du pH (Figure II-24)⁽¹¹⁵⁾ car les groupements Si – OH ont un pKa de 2-3⁽¹¹⁶⁾ tandis que le groupement amino a un pKa de 9.

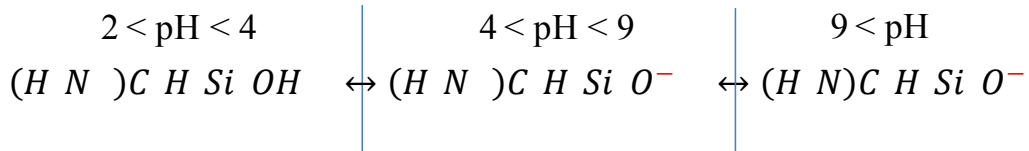


Figure II-24 : Conformations des molécules d'APTES hydrolysées en fonction du pH⁽¹¹⁵⁾

Entre pH 2 et pH 4, les molécules d'APTES hydrolysées sont en majorité chargées positivement. Entre pH 4 et pH 9, les formes zwitterioniques sont prédominantes. Les deux types de charges coexistent avec toutefois une charge nette de plus en plus négative quand on passe de 4 à 9. Au-delà de pH 9, les molécules sont uniquement chargées négativement.

En nous basant sur les résultats de l'encapsulation en deux étapes des nanoparticules d'or dans la silice, nous avons fixé pour cette étude les pourcentages d'eau par rapport au triton X-100 (%W) et d'APTES par rapport au TEOS (%APTES) respectivement à 90,8% et 20%. La concentration massique en ions Ag^+ dans la phase aqueuse de la microémulsion (C_{Ag}) est égale à 2g/L et le rapport molaire $\text{Ag}:\text{NaBH}_4$ est égal à 1. Les clichés de MET de la Figure II-25 montrent que pour un pH de la phase aqueuse égale à 2 (ajout de HCl) ou 9 (ajout de NaOH) il se forme préférentiellement des amas d'argent dispersés dans une sorte de gangue de silice. En revanche, à pH 5-6 (eau distillée) il se forme des nanoparticules d'argent incorporés dans des sphères de silice monodisperses.

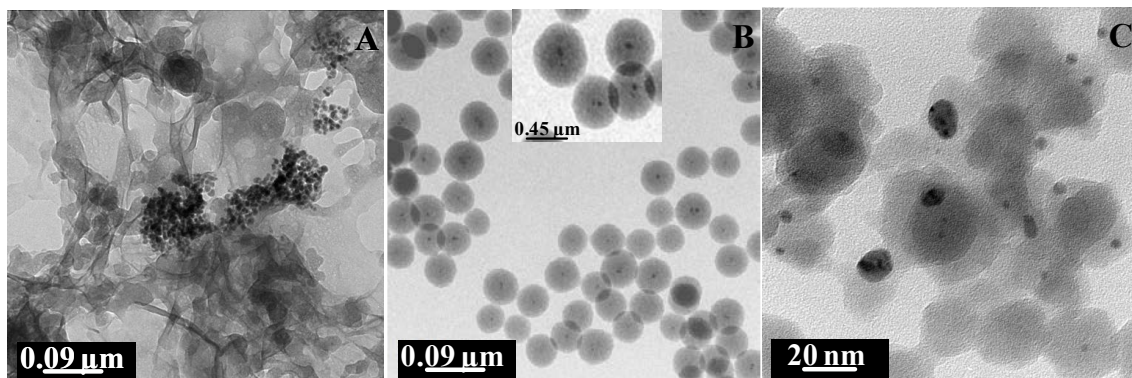


Figure II-25. Micrographies MET Ag@SiO₂ (%APTES 20%). Effet du pH : A (pH 2), B (pH 5-6), C (pH 9)

Ces observations indiquent que la forme optimale de l'APTES pour l'encapsulation est obtenue vers le pH 5-6. À ce pH, le groupement amine chargé positivement a plus d'affinité avec le substrat métallique et les groupements silanols ont une charge négative suffisamment élevée pour maintenir une bonne stabilité colloïdale sans toutefois gêner électrostatiquement l'adsorption.

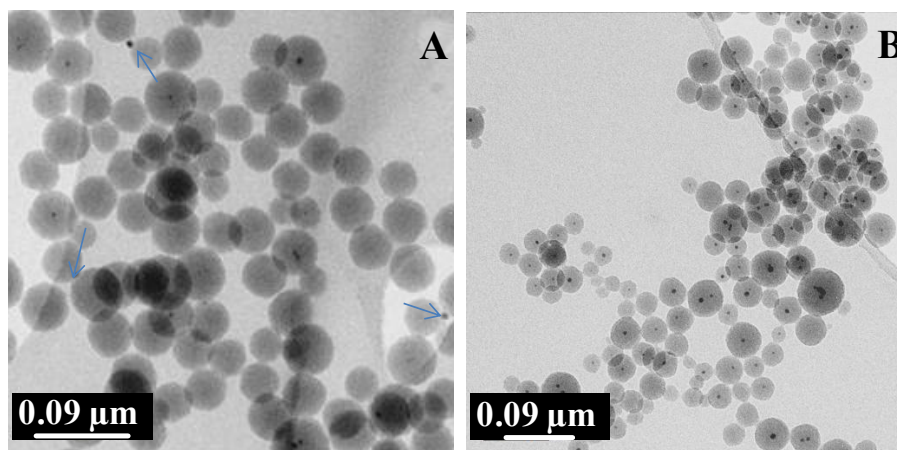


Figure II-26 : Micrographies MET de Ag@SiO₂ (pH 5-6). Effet du %APTES : A(10%), C(40%)

À pH 5-6, nous avons alors fait varier le %APTES. Les clichés de MET (Figure II-26 et Figure II-25B) montrent qu'en deçà de 20%, les structures de types billes de silices vides et nanoparticules métalliques libres sont plus nombreuses que les structures cœur@coquille Ag@SiO₂. A partir de 20%, ces dernières deviennent prépondérantes mais avec une large dispersion en taille à 40% en APTES.

Au vu de ces résultats, les conditions optimales pour obtenir une majorité de nanoparticules d'argent encapsulées dans une couche homogène de silice ainsi qu'un nombre minimal de billes de silice vides sont les suivantes :

1. pH de synthèse 5-6
2. pourcentage d'APTES par rapport au TEOS 20%
3. réaction d'oxydoréduction entre l'ion métallique et NaBH₄ équimolaire.

Ces conditions de synthèse étant fixées, nous nous sommes intéressés aux paramètres qui régissent la taille des nanoparticules métalliques et de la silice. Une attention particulière sera apportée au contrôle de la quantité d'argent par nanoparticule de silice ainsi qu'à la maîtrise de la taille finale de la structure cœur@coquille dans l'optique de pouvoir les adapter aux exigences d'un cahier des charges donné.

II.4.3.1.2 Contrôle de la quantité d'argent.

Dans cette étude, la concentration en ions Ag^+ dans la phase aqueuse de la microémulsion (C_{Ag}) a été augmentée de 2 à 4g/L. Les clichés de MET des nanoparticules récupérées (Figure II-27) montrent que les structures cœur@coquille produites à 4g/L, d'une taille de 34 nm, sont plus petites que celles obtenues à 2g/L (58 nm) avec, comme souhaité, des nanoparticules d'argent de dimension plus importante (5-10 nm).

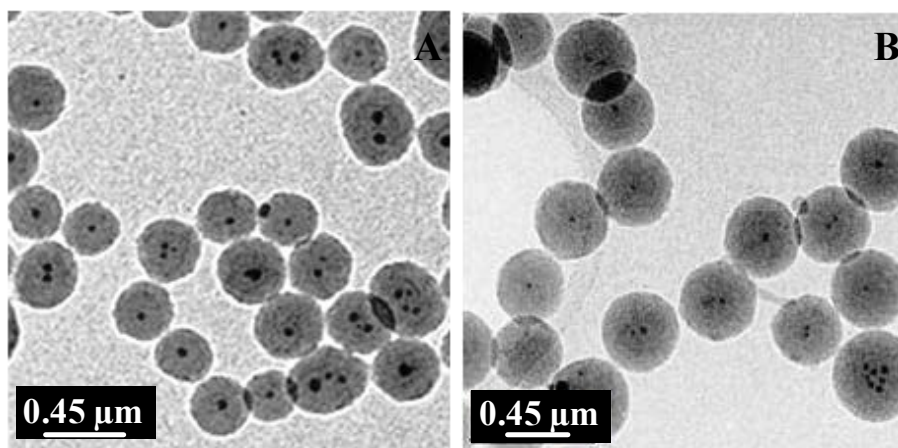
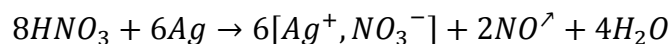


Figure II-27: Variation de la concentration d'argent. A (4g/L), B (2g/L)

La quantité d'argent par bille de silice semble donc pouvoir être contrôlée par variation de la quantité d'argent solubilisée dans les micelles inverses. Pour en avoir confirmation un dosage de la quantité d'argent contenue dans les structures cœur@coquille $Ag@SiO_2$ a été réalisé.

La quantité d'argent contenue dans les structures cœur@coquille $Ag@SiO_2$ a été évaluée par voie électrochimique en utilisant un ionomètre combinée avec une tête d'électrode double qui va accueillir l'électrode sélective d'ions argent et l'électrode de référence (Annexe D).

Pour effectuer les mesures, les structures $Ag@SiO_2$ ont été préalablement traitées avec de l'acide nitrique concentré afin de dissoudre leur cœur métallique. La réaction chimique entre l'acide nitrique et l'argent permet de minéraliser ce dernier (Equation II-5) afin que les ions Ag^+ produits puissent être dosés par voie électrochimique.



Equation II-5

Sur le cliché de MET de la Figure II-28 représentant les nanoparticules d'Ag@SiO₂ après traitement avec HNO₃, nous pouvons observer que les nanoparticules d'argent ont bien été dissoutes par l'acide nitrique.

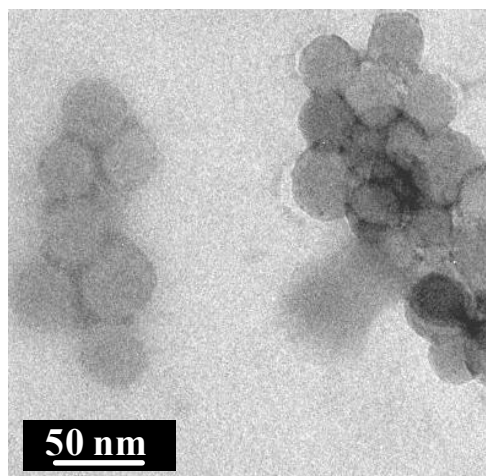


Figure II-28 : Poudre Ag@SiO₂ (C_{Ag} = 4g/L) traitée 1h avec HNO₃ concentré

D'après le Tableau II-5 les mesures réalisées avec l'électrode sélective d'ions argent donnent des quantités d'argent assez proches des quantités initialement introduites dans le milieu réactionnel.

Tableau II-5 : Pourcentage massique d'Argent encapsulée par unité de masse totale (%m_{Ag/Ag@SiO₂})

C _{Ag} (g/L)	4	2
%m _{Ag/Ag@SiO₂} théorique	5,8%	3,0%
Ag ⁺ théorique dans la solution de mesure (ppm)	58	30
Ag ⁺ mesurée dans la solution de mesure (ppm)	51	24
%m _{Ag/Ag@SiO₂} mesuré	5,1%	2,4%

Quand la concentration massique d'Ag⁺ dans la phase aqueuse de la microémulsion passe de 2g/L à 4g/L, le pourcentage d'argent par rapport à la silice mesuré est passé de 2,4 à 5,1%. Cela suggère qu'il existe une bonne corrélation entre la concentration d'Ag⁺ dans la microémulsion et la quantité d'Ag encapsulée. Il est donc possible par cette méthode de synthèse de contrôler avec précision le taux d'argent par nanoparticule Ag@SiO₂.

II.4.3.1.3 Contrôle de l'épaisseur de la couche de silice

Les études menées au paragraphe I.4.2.1 ont montré que la taille de la matrice de silice peut être ajustée par variation du pourcentage d'eau par rapport au Triton X-100 (%W). Nous avons donc souhaité déterminer si ce paramètre exerçait le même type d'influence

sur les nanoparticules Ag@SiO₂. Cela permettrait d'exercer un contrôle sur l'épaisseur de la couche de silice.

D'après les mesures de taille (Tableau II-6) effectuées sur les clichés de MET de la Figure II-29 représentant, la taille de la matrice de silice des nanoparticules obtenues pour %W égal à 85% a comme prévu augmenté par rapport à celles obtenues à 90,8%

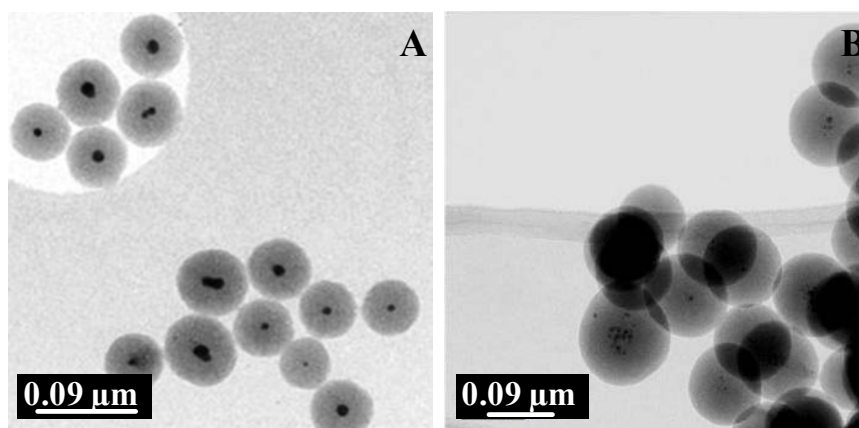


Figure II-29 : Micrographies MET Ag@SiO₂, %W 85%.Variation de C_{Ag}: A) 4g/L, B) 2g/L

En revanche, les structures cœur@coquille produites à 96% sont du même ordre de taille que celles obtenues à 90,8% (Figure II-30 et Tableau II-6). Elles ne sont pas plus petites comme pouvait le laisser présager les études effectuées au paragraphe I.4.2.1.

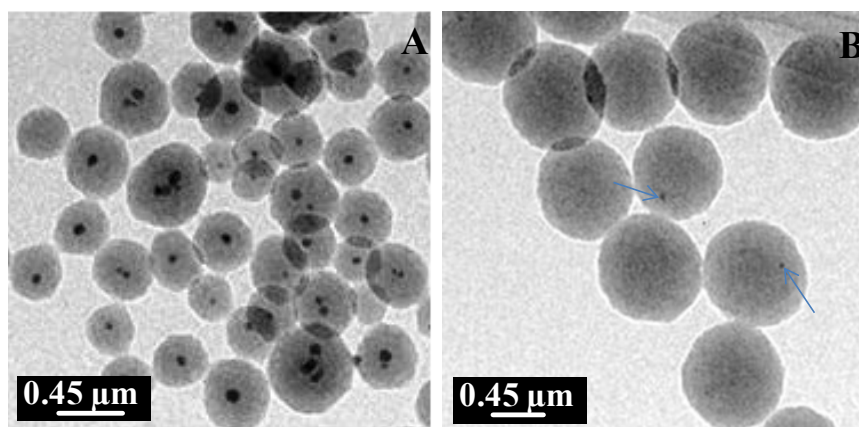


Figure II-30 : Micrographies MET Ag@SiO₂, %W 96%.Variation de C_{Ag}: A) 4g/L, B) 2g/L

Concernant les nanoparticules d'argent, lorsque C_{Ag}= 2g/L la variation de %W n'influe pas sur leur taille (Tableau II-6). En effet, dispersées dans la matrice de silice, leur diamètre est inférieur à 5 nm. En revanche pour C_{Ag}= 4g/L la structure cœur@coquille des nanoparticules est mieux définie et la dimension des cœurs d'argent augmente avec

l'épaisseur de la couche de silice. Cela peut s'expliquer par le fait que le rapport molaire entre l'argent et la silice est gardé constant dans les conditions expérimentales.

Tableau II-6 : Taille du cœur d'argent et de la matrice de silice en fonction de %W et de C_{Ag}

C_{Ag}	%W	Diamètre Ag (nm)	Diamètre SiO_2 (nm)
2g/L	85%	<5	116±3%
	90,8%	<5	56±5%
	96%	-	61±4%
4g/L	85%	15-20	54±5%
	90,8%	5-10	34±7%
	96%	8-15	37±16%

Il est donc possible par variation de %W de modifier l'épaisseur de la couche de silice tout en conservant le rapport $SiO_2:Ag$ constant.

Appliquée à l'or la technique de synthèse a permis d'élaborer des structures cœur@coquille $Au@SiO_2$ de diamètre moyen égal à 57 nm ± 12% (Figure II-31). Comparées aux structures cœur@coquille $Ag@SiO_2$ obtenues dans les mêmes conditions (%W 90%, C_{Au} 4g/L), elles ont une taille plus importante. En outre les nanoparticules d'or ont tendance à être multiples dans une même structure et de forme plus allongée.

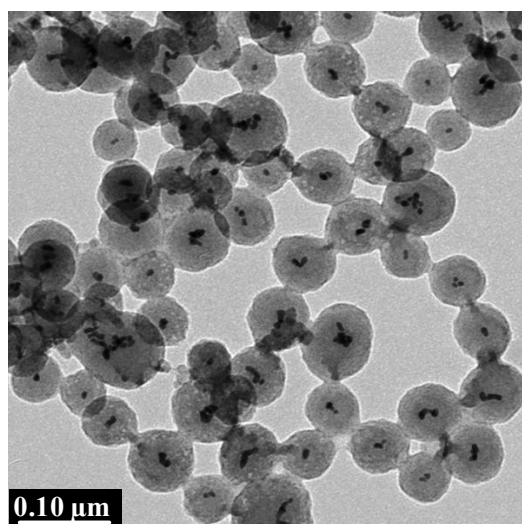


Figure II-31 : Micrographe MET d' $Au@SiO_2$. %W 90%, C_{Au} 4g/L

Il a donc été possible d'appliquer cette méthode de synthèse en une seule étape à l'or et nous pouvons ainsi envisager de l'élargir à d'autres types de métaux.

II.4.4 Propriétés et caractérisations spectroscopiques.

II.4.4.1 Propriétés

Lorsque les métaux nobles tels que le cuivre, l'argent et l'or sont d'une taille réduite de quelques dizaines de nanomètres, leur spectre d'absorption en milieu diélectrique présente un pic appelé bande ou absorption plasmon de surface. Ce phénomène provient de l'oscillation collective des électrons de surface sous l'impulsion du champ électromagnétique de l'onde lumineuse incidente (Figure II-32). Il en résulte une polarisation de la surface de la nanoparticule métallique qui crée un champ électrique qui s'oppose au champ électromagnétique de l'onde lumineuse incidente.

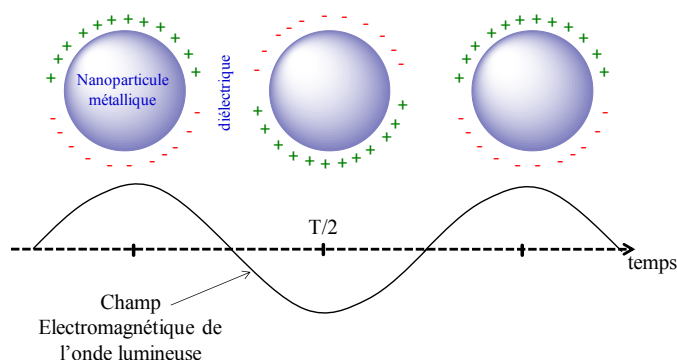


Figure II-32 : Représentation schématique de l'oscillation collective des électrons de surface d'une nanoparticule métallique sous l'impulsion du champ électromagnétique de l'onde lumineuse incidente.

L'absorption plasmon de surface apparaît lorsque la fréquence du champ électromagnétique de la lumière incidente est en résonance avec l'oscillation collective des électrons du métal d'où le nom de résonance plasmon de surface. Cette absorption se traduit par des couleurs vives de la part des colloïdes de métaux nobles comme l'or et l'argent^(100; 117).

La résonance plasmon de surface a été mise en théorie par Mie en 1908⁽¹¹⁸⁾. Sa nature, longueur d'onde, intensité et largeur, est dépendante de la taille et de la forme⁽⁹⁶⁾ des nanoparticules métalliques. Par exemple, une particule sphérique donnera lieu à un seul pic, alors qu'une particule ellipsoïdale donnera lieu à deux pics car apparaîtra un phénomène d'oscillation pour les deux dimensions de l'objet. Elle dépend également des fonctions diélectriques du métal lui-même et du milieu environnant : le pic d'absorption de nanoparticules d'argent se situe vers 400 nm⁽¹⁰⁶⁾ alors que celui de l'or se situe vers 550 nm⁽¹¹⁷⁾. D'autres paramètres sont susceptibles d'influencer le pic d'absorption plasmon

tels que le degré d'agrégation ou la nature des espèces adsorbées à la surface des nanoparticules métalliques pour les stabiliser.

L'étude de cette absorption plasmon par spectroscopie UV-visible apparaît donc comme un moyen efficace d'obtenir des informations à la fois sur la taille des nanoparticules, leur forme ainsi que leurs interactions avec le milieu environnant et donc de les caractériser.

II.4.4.2 Caractérisation

Les nanoparticules ont été dispersées dans l'éthanol et les échantillons de concentration identique (0,5g/L) ont été soumis aux ultrasons avant chaque acquisition de donnée.

Le spectre d'absorption des nanoparticules Au-DTDTPA illustré sur le graphe A de la Figure II-33 ne présente aucune bande plasmon décelable. Ces observations sont en corrélation avec la théorie. En effet, le diamètre moyen des nanoparticules Au-DTDTPA (2,4 nm) est trop faible pour qu'elles présentent un pic d'absorption. Une possible agglomération lors de leur encapsulation dans la matrice de silice n'a pas non plus permis de générer une absorption plasmon décelable (graphe B Figure II-33).

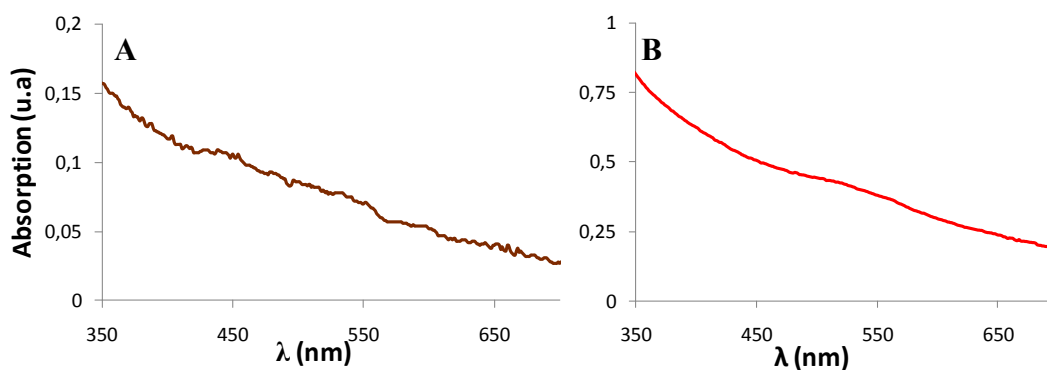


Figure II-33 : Spectres d'absorption des nanoparticules A) Au-DTDTPA et B) Au-DTDTPA@SiO₂ (C_{Au-DTDTPA}=4g/L)

Contrairement aux nanoparticules Au-DTDTPA, les nanoparticules Ag-DTDTPA dont le diamètre est compris entre 2,4 et 7 nm présentent un pic d'absorption caractéristique des nanoparticules d'argent centré vers 430 nm (Figure II-34-A). Mais, après encapsulation et comme dans le cas des nanoparticules Au-DTDTPA@SiO₂, elles ne présentent aucun pic d'absorption notable certainement à cause de la matrice de silice qui est susceptible de changer les propriétés de surface⁽¹¹¹⁾ (Figure II-34-B).

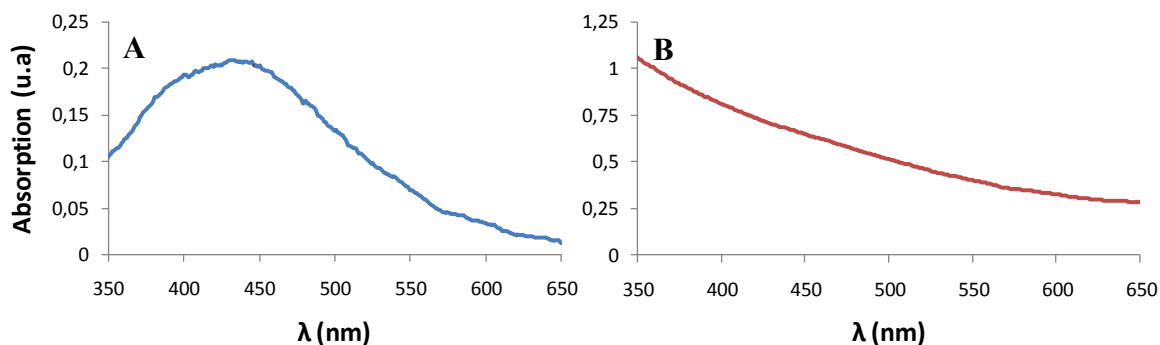


Figure II-34 : Spectres d'absorption des nanoparticules A) Ag-DTDTPA et B) Ag-DTDTPA@SiO₂ ($C_{Ag-DTDTPA}=3g/L$)

Pour les différentes nanoparticules Ag@SiO₂ obtenues via la synthèse one-pot, les spectres d'absorption représentés sur la Figure II-35 sont typiques des nanoparticules d'argent avec une bande d'absorption plasmon centrée vers 425 nm.

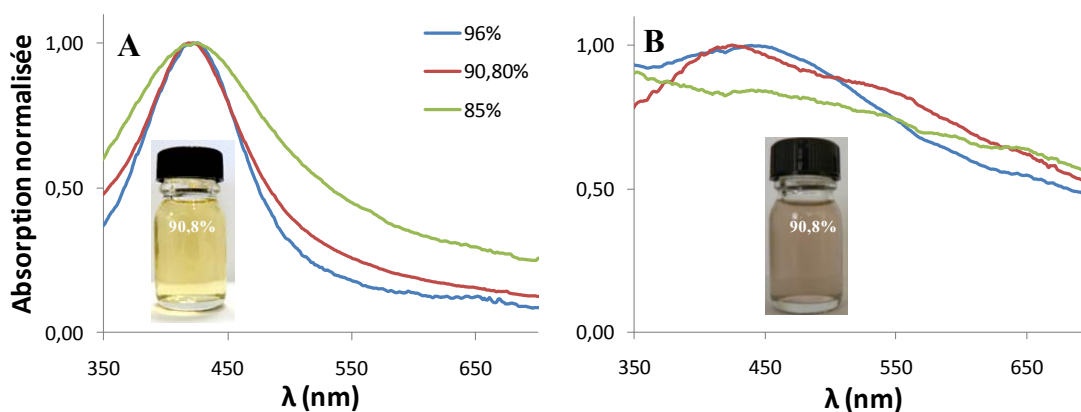


Figure II-35 : Spectres d'Absorption des nanoparticules Ag@SiO₂. Variation de %W. A) $C_{Ag} = 4g/L$, B) $C_{Ag} = 2g/L$

À forte teneur en argent (graphe A Figure II-35), les pics d'absorption sont bien définis. Par contre à faible teneur en argent (graphe B Figure II-35), les pics d'absorption sont larges et mal définis voire inexistantes pour %W égal à 85%. Ces observations sont en accord avec les mesures de taille réalisées par MET (Tableau II-6). Les nano-objets d'argent produits avec $C_{Ag} = 4g/L$ ont des tailles supérieures à 5 nm donc présentent comme le prédit la théorie⁽¹⁰⁶⁾ des pics d'absorption plus étroits et mieux définis que celles produites à $C_{Ag} = 2g/L$ qui ont une taille inférieure à 5 nm. Il a ainsi été décrit que, pour des nanoparticules sphériques de diamètre <20 nm il existe une relation linéaire entre la largeur à demi hauteur du pic d'absorption et l'inverse du diamètre des particules.

Dans le cas de $C_{Ag} = 4g/L$, l'élargissement du pic d'absorption lorsque %W est égal à 85% peut être attribué à des interactions avec la matrice de silice car nous pouvons en effet

observer une corrélation entre cet élargissement du pic et la taille de cette dernière (Tableau II-6). Les spectres des nanoparticules Ag@SiO₂ obtenues à 90,8% et 96% qui ont un diamètre d'une trentaine de nanomètres présentent une largeur de pic semblable alors que les spectres des nanoparticules obtenues à 85% dont les diamètres sont environ deux fois supérieurs présentent un pic d'absorption plus large.

Lorsque nous avons réalisé les spectres d'absorption des nanoparticules Au@SiO₂ one-pot nous avons observé cette fois-ci un pic d'absorption caractéristique des nanoparticules d'or centré vers 532 nm avec toutefois un pic plus large pour C_{Au} = 4g/L (Figure II-36). De plus, la couleur bleue des colloïdes obtenus à C_{Au} = 4g/L indique que les nano-objets d'or ont dans ce cas une taille supérieure à ceux obtenus à C_{Au} = 2g/L dont la couleur est violette (58)

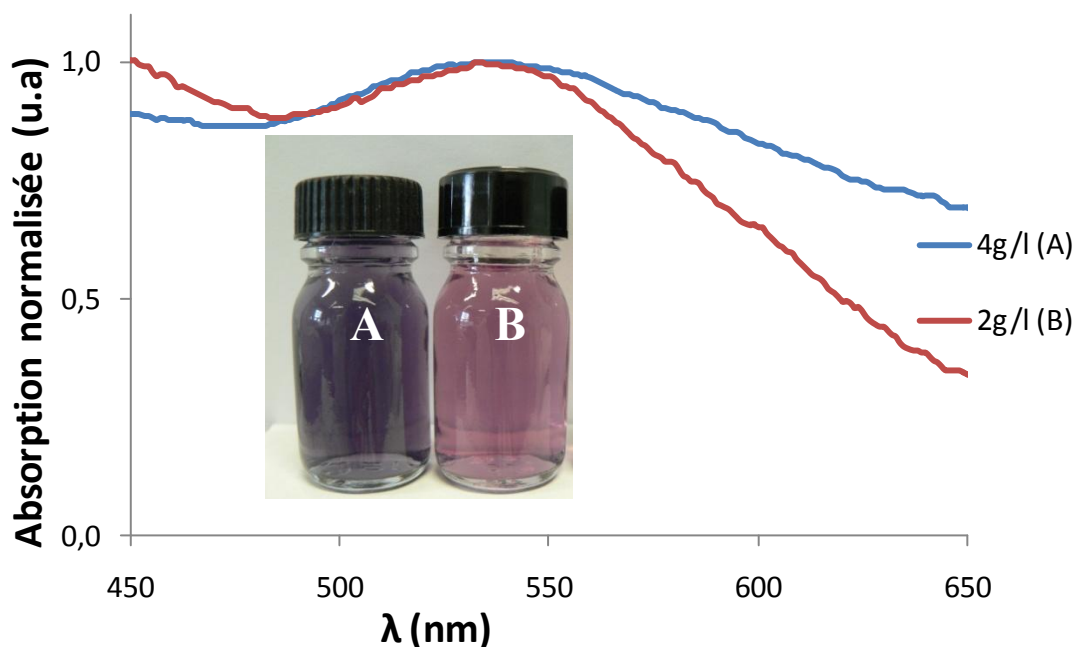


Figure II-36 : Photographies et spectres d'absorption des nanoparticules Au@SiO₂ dans l'éthanol. Variation de C_{Au} : A) 4g/L, B) 2g/L

Cette étude montre que les propriétés optiques des nanoparticules cœur@coquille Ag et Au@SiO₂ peuvent être adaptées par variation de %W et de la concentration en or ou en argent dans la phase aqueuse de la microémulsion lors de leur synthèse.

Le contrôle des propriétés de plasmon de surface permet d'envisager le développement de nouveaux types de dispositifs photoniques, domaine concernant la génération, la transmission et le traitement de signaux optiques. L'utilisation potentielle des structures

cœur@coquille Au ou Ag@SiO₂ dans la fabrication de dispositifs photoniques peut ainsi être illustrée par deux exemples.

- ✚ Les cristaux photoniques sont des structures périodiques diélectriques qui présentent des bandes de fréquences interdites à la propagation de la lumière au même titre que les cristaux semi-conducteur qui possèdent des bandes d'énergie autorisées et interdites pour les électrons. Une approche simple consisterait à utiliser les structures cœur@coquille métal@silice comme bloc de construction de cristaux photoniques⁽¹¹⁹⁾.
- ✚ Les guides plasmoniques sont un autre exemple d'application potentielle. Des études théoriques ont d'ores et déjà montré que l'énergie d'une onde électromagnétique peut être transportée par des chaînes linéaires de nanoparticules métalliques à base d'or ou d'argent⁽¹²⁰⁾. L'organisation de structures cœur@coquille métal@silice se présentent comme une bonne alternative aux méthodes de fabrication faisant appel par exemple à la lithographie par faisceau d'électrons⁽⁷⁾.

Grâce à la synthèse que nous avons mise au point, nous pourrions envisager de contrôler les performances optiques et l'efficacité de tels dispositifs photoniques en modifiant l'épaisseur de la matrice de silice et le diamètre des nano-objets métalliques.

D'autres applications sont également envisageables comme l'imagerie médicale, l'histochimie et la cytochimie en raison de la forte opacité de l'or et l'argent aux rayons X, la décoration grâce aux couleurs vives fournies par ces nanoparticules ainsi que la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS). Cette technique de détection permet de surmonter les deux limitations de la spectroscopie Raman : la résolution spatiale et la faible intensité du signal. Cela permet d'accéder à une sensibilité de mesure accrue.

II.5 Mélange métallique/organique dans la matrice de silice.

Comme en témoignent les nombreux travaux et publications effectués récemment, les nanoparticules combinant diverses fonctionnalités constituent de potentielles plateformes multifonctionnelles^(6; 121). Parmi elles, les nanoparticules core@shell Ag ou Au@SiO₂ contenant des fluorophores se sont révélées intéressantes pour des applications de détection biologique⁽¹²²⁾. En effet en plus de combiner les propriétés des fluorophores à celles des nano-objets d'or et d'argent dans une seule nanoparticule, il a pu être observé un rehaussement de l'intensité de fluorescence globale de la nanoparticule hybride lorsque les

deux sont situés à une distance optimale^(122; 123). Ce rehaussement qui s'accompagne d'un renforcement de la photostabilité provient d'interactions entre le fluorophore et les plasmons de surface des nano-objets métalliques. Ces interactions dépendent de la distance entre la molécule et la surface du métal, de la taille et de la forme des nanoparticules métalliques ainsi que de la superposition des bandes d'émission et d'absorption du fluorophore avec la bande plasmon du métal. Il est primordial de contrôler cette distance car une trop grande proximité des molécules fluorescentes avec une nanoparticule métallique peut à l'inverse entraîner une extinction de la fluorescence.

Les techniques employées pour réaliser ce type de nanoparticules hybrides nécessitent en général plusieurs étapes^(122; 123). Nous proposons ici de combiner la méthode de synthèse des nanoparticules fluorescentes FITC@SiO₂ et celle des structures cœur@coquille Au et Ag@SiO₂ pour mettre au point un protocole nous permettant d'associer les molécules de FITC et les nano-objets métalliques à l'intérieur d'une même matrice de silice en une seule étape.

L'idée est d'introduire dans le milieu réactionnel, après la formation des nanoparticules métallique dans la microémulsion inverse, un mélange FITC-APTES en plus du TEOS afin de former une couche de polysiloxane fluorescente autour des nano-objets métalliques. En référence aux synthèses des objets cœur@coquille préalablement décrites dans ce manuscrit, les conditions expérimentales sont les suivantes : %W 90,8%, pH 2, %APTES 20% et C_{Ag ou Au} 4g/L. Le pourcentage massique de FITC par matrice de silice est fixé à 0,4%, cette valeur ayant été déterminée comme optimale au chapitre II.3.2.2.

Le cliché de MET (Figure II-37) des nanoparticules hybrides argent/silice/FITC (Ag@SiO₂-FITC) montre des structures cœur@coquille bien définies d'un diamètre d'environ 55 nm ± 13%. La taille observée est inférieure à celle nanoparticules FITC@SiO₂ (72 nm ± 10%) mais supérieure à celle des nanoparticules Ag@SiO₂ (34 nm ± 7%). L'introduction conjointe des deux espèces semblent ainsi influencer la taille de l'objet de façon intermédiaire entre l'influence de l'encapsulation du fluorophore seul et celle du nano-objet métallique seul.

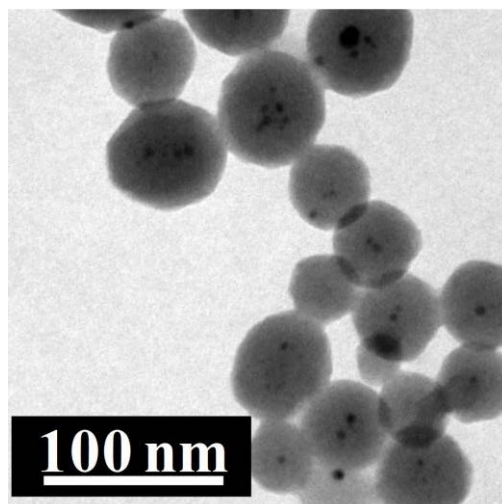


Figure II-37: Micrographies MET de Ag@SiO₂-FITC

Le spectre d'absorption réalisé sur les nanoparticules Ag@SiO₂-FITC en solution alcoolique (C=0,5g/L) (graphe Figure II-38) met en évidence deux pics, un à 420 nm qui provient de la résonance plasmon des nano-objets d'argent et un autre à 497 nm qui provient de l'absorption de la FITC. Cela prouve la présence simultanée des molécules de FITC avec les nanoparticules d'argents dans la matrice de silice. En effet, si les nano-objets métalliques ont pu être observés sur le cliché de microscopie, la présence de la fluorescéine est déduite du spectre d'absorption et confirmée par le pic d'émission vers 524 nm observé après excitation des nanoparticules hybrides à 490 nm (graphe B Figure II-38).

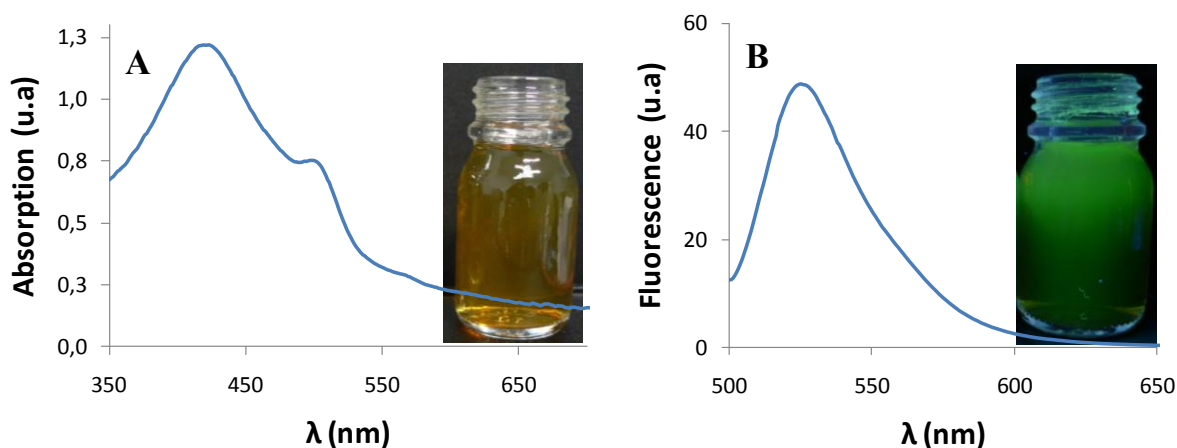


Figure II-38 : Photographie et analyse spectroscopique des nanoparticules Ag@SiO₂-FITC en solution alcoolique (C=0,5g/L). A) Spectre d'absorption, B) Spectre de fluorescence ($\lambda_{exc}=490nm$)

En remplaçant l'argent par l'or le spectre d'absorption des nanoparticules hybrides Au@SiO₂-FITC ne présente plus qu'un pic vers 500 nm (graphe A Figure II-39). La forme globale du spectre laisse cependant penser qu'il y a eu superposition entre le spectre

d'absorption du fluorophore et l'absorption plasmon de l'or qui donne la couleur bleue de la solution. Lorsque les nanoparticules Au@SiO₂-FITC ont été excitées à 490 nm le pic d'émission s'est quant à lui légèrement décalé vers une plus basse longueur d'onde, 519 nm (graphe B Figure II-39). Ces différences avec l'argent peuvent s'expliquer par la proximité entre les bandes d'absorption et d'émission de la FITC avec la bande plasmon de l'or.

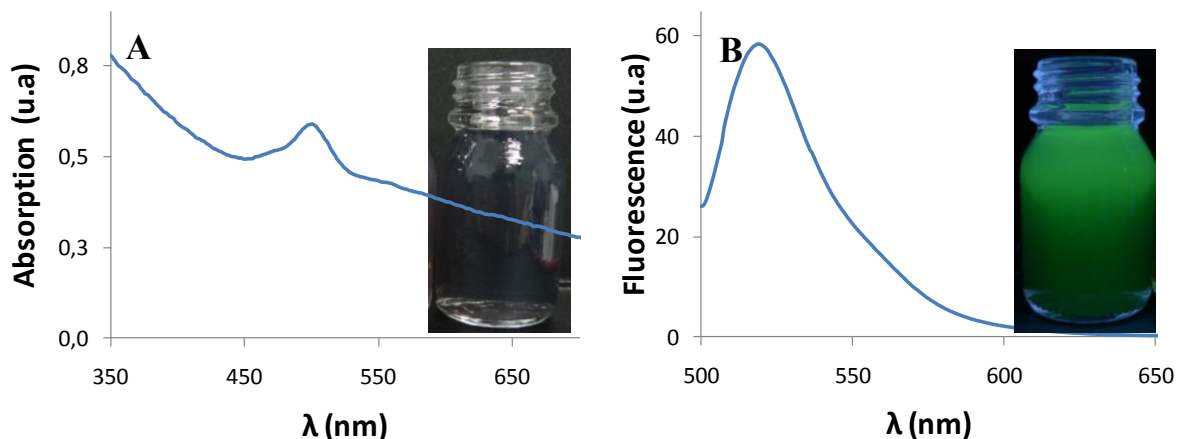


Figure II-39: Photographies et analyse spectroscopique des nanoparticules Au@SiO₂-FITC en solution alcoolique (C=0,5g/L). A) Spectre d'absorption, B) Spectre de fluorescence ($\lambda_{exc}=490nm$)

Cette étude démontre la souplesse de notre méthode qui a pu être adaptée cette fois-ci à la conception de nanoparticules multifonctionnelles.

II.6 Conclusion

L'objectif de ce chapitre était d'encapsuler différents types d'espèces dans une matrice de silice en utilisant le système de microémulsion inverse eau/Triton-X 100/hexanol/cyclohexane comme nanoréacteur de synthèse. Nous avons mis au point des protocoles reproductibles non seulement pour l'encapsulation d'espèces moléculaires ou de nanoparticules métalliques mais également pour l'encapsulation des deux conjointement.

Nous avons démontré la possibilité de doper les nanoparticules de silice par un fluorophore par simple piégeage ou par greffage covalent au sein du réseau de polysiloxane. Dans les deux cas, l'encapsulation de fluorophores dans une matrice de silice a permis d'optimiser les propriétés de fluorescence de ce dernier tout en lui procurant une protection vis-à-vis du milieu environnant.

Des nano-objets métalliques ont également pu être encapsulés de deux manières différentes. La première voie consiste à synthétiser préalablement des nanoparticules stables en milieu

aqueux afin de les enrober dans un second temps dans la microémulsion. Elle peut être particulièrement utile pour les nanoparticules qui ne peuvent pas être recouvertes directement en suivant un processus de croissance Stöber. L'étude entreprise nous a, de surcroît, permis d'accéder à une bonne compréhension de certains paramètres de contrôle de l'encapsulation des nano-objets métalliques dans la silice par microémulsion. Cela pourrait contribuer par la suite à améliorer l'élaboration par microémulsion des nanoparticules de silice dopées avec des nano-objets métalliques avec une taille, un arrangement spatial et une composition désirés.

La deuxième méthode d'encapsulation des nanoparticules métalliques, plus originale, est un protocole qui réunit en une seule séquence, l'étape de formation de la nanoparticule puis celle de son enrobage par la silice. Elle a permis, par interaction de l'APTES avec la surface des nanoparticules métalliques en formation de les insérer dans un réseau de polysiloxane uniforme de quelques dizaines de nanomètres à une centaine de nanomètres d'épaisseur par addition de TEOS et d'ammoniaque à la solution de microémulsion les contenant. Cette méthode est parfaitement adaptable. Le rapport entre l'argent et la silice peut en effet être contrôlé par simple variation de C_{Ag} . Nous avons également pu faire varier l'épaisseur de la matrice de silice en jouant sur le pourcentage d'eau par rapport au triton X-100 %W. Ce nouveau procédé développé pour encapsuler des nanoparticules d'argent dans de la silice présente des avantages indéniables par rapport aux méthodes décrites dans la littérature. Il est en effet rapide et ne nécessite ni d'étapes de prérevêtement en amont de la synthèse dans la microémulsion avec des stabilisants organiques, ni de transfert dans un autre milieu, source de problèmes de déstabilisation. Ce procédé a été transposé à l'or et pourrait l'être à une plus large gamme de nanoparticules qui sont généralement difficiles à enrober avec de la silice (cuivre, semi-conducteurs, alliages, etc...).

L'emploi de ces différentes nanoparticules nécessitera toutefois une bonne maîtrise de leur fonctionnalisation en vue des applications visées. Cette étape de fonctionnalisation fait l'objet de la prochaine étude de ce travail.

Chapitre III Fonctionnalisation de surface des nanoparticules

III.1 Introduction

Dans la plupart des applications potentielles des nanomatériaux, la nature de leur surface va jouer un rôle central dans la détermination de leurs propriétés et donc de leurs fonctions. En effet, leur état de dispersion ainsi que leur réactivité sont des paramètres directement reliés à l'état de la surface.

Dans ce contexte, le greffage de groupements chimiques de surface capables d'assurer aux nanoparticules une bonne stabilité colloïdale revêt une importance particulière car elle permet de répondre à la tendance naturelle des nanoparticules à l'agglomération.

Par ailleurs si l'application le nécessite, les groupements chimiques de surface pourront également intervenir dans la connexion des nanoparticules à d'autres matériaux ou macromolécules.

Dans un premier temps, nous nous attacherons à faire ressortir les paramètres déterminants pour le contrôle de la stabilité colloïdale de nanoparticules. Nous exposerons les deux stratégies développées pour greffer *in situ*, dans la microémulsion, des groupes fonctionnels en surface des nanoparticules, qui vont permettre de prévenir leur agrégation et qui seront par ailleurs capables de se lier ou d'interagir avec diverses entités chimiques. Notre attention se portera particulièrement sur les effets induits par ces modifications de surface, à la fois sur l'intégrité physique, la taille et la stabilité colloïdale des nanoparticules.

III.2 Stabilité colloïdale des nanoparticules

L'agrégation des nanoparticules est l'un des principaux obstacles à leur utilisation car elle entraîne souvent la perte des propriétés associées à l'état nanoparticulaire. Par exemple, dans le cas des applications biomédicales comme la délivrance contrôlée de médicaments ou le ciblage à visée diagnostic ou thérapeutique, la déstabilisation des nanoparticules utilisées peut mener à une accumulation néfaste voire létale dans des organes vitaux⁽¹²⁴⁾.

Cette tendance naturelle à l'agglomération provient de deux phénomènes. Le premier est d'origine thermodynamique car la grande énergie de surface des nanoparticules par rapport à leur volume est défavorable. Le deuxième est d'ordre cinétique car, dans leur milieu de dispersion, elles sont soumises au mouvement Brownien. La question est alors de savoir si elles peuvent s'approcher suffisamment les unes des autres et former des associations

permanentes ou non pendant la durée d'une collision brownienne. La réponse à cette question est généralement traitée par la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) ^(125; 126) qui stipule que deux types de forces agissent en général sur les particules en suspension colloïdale : les forces attractives de Van Der Waals et les forces électrostatiques.

✚ Les forces attractives de Van Der Waals

Elles résultent des fluctuations des interactions dipolaires au niveau moléculaire. Elles dépendent de la nature du matériau, du milieu de dispersion, de la taille des particules et de la distance inter-particules. Pour des particules sphériques identiques de rayon a , dont les surfaces sont distantes de D et les centres de $R = D + 2a$, l'énergie potentielle d'interaction V_A de ces forces attractives s'écrit :

$$V_A = -\frac{A}{6} \left[\frac{2a^2}{R^2 - 4a^2} + \frac{2a^2}{R^2} + \ln \left(\frac{R^2 - 4a^2}{R^2} \right) \right]$$

Équation III-1

Avec A , constante effective de Hamaker pour le système. Cette constante dépend des constantes de Hamaker des particules et du milieu de dispersion.

✚ Les forces électrostatiques

Elles résultent de l'interaction des doubles couches électriques à la surface des particules. Elles sont répulsives pour des particules de même charge mais sont difficiles à préciser et à évaluer car elles dépendent du comportement transitoire des doubles couches pendant les collisions browniennes. Seule une expression approchée de l'énergie potentielle de répulsion est proposée (dans l'approximation des faibles potentiels de surface) (Équation III-2).

$$V_R = 2\pi\epsilon\alpha\psi_d^2 \ln(1 + e^{-\kappa D})$$

Équation III-2

Avec ϵ constante diélectrique du milieu, κ^{-1} épaisseur de la double couche ionique (longueur de Debye) et ψ_d le potentiel électrique.

ψ_d caractérise la charge de surface des colloïdes. Il ne correspond cependant pas à la charge réelle de la surface de la nanoparticule, mais à celle qu'il acquiert en solution (Figure III-1). Il peut être assimilé au potentiel électrocinétique appelé aussi potentiel zêta (ζ), la

valeur du potentiel au niveau du plan de cisaillement de Helmholtz entre la couche de Stern et la couche diffuse. Le potentiel ζ est le seul accessible expérimentalement et sa mesure permet de prédire les interactions répulsives et donc la stabilité colloïdale.

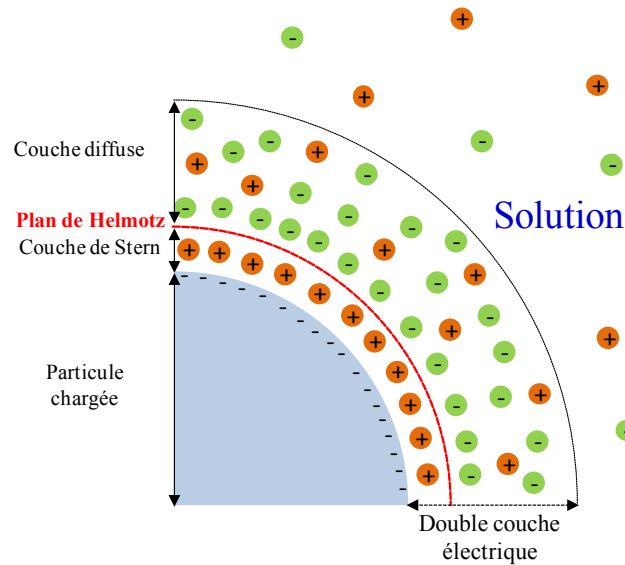


Figure III-1 : Représentation schématique de la double couche ionique

La stabilité des suspensions colloïdales vis-à-vis de l'agglomération dépendra de l'équilibre entre ces deux types de forces ou, plus précisément, de la valeur maximale V_T^0 de l'énergie potentielle totale d'interaction qui est égale à la somme des énergies d'attraction et de répulsion ($V_T = V_A + V_R$).

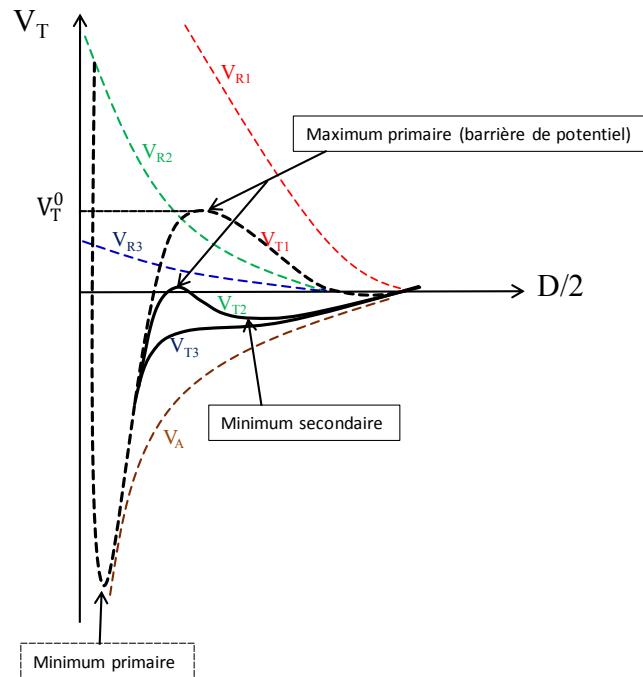


Figure III-2 : Représentation schématique de l'énergie d'interaction en fonction de la distance interparticulaire

Cette somme peut présenter différents profils (Figure III-2). Aux faibles distances, l'énergie potentielle d'interaction des forces attractives, V_A , prédomine et il s'ensuit une profonde chute de V_T .

Aux distances moyennes (quelques κ^{-1}), différents cas sont envisagés selon l'importance relative de V_A et V_R :

- ✚ Dans le cas de V_{T1} , le maximum V_T^0 est assez élevé (quelques centaines de kT), les collisions entre particules ne peuvent pas fournir une énergie suffisante pour la vaincre et la suspension est alors stable.
- ✚ Le cas intermédiaire V_{T2} où V_T^0 est faible illustre un état où la limite de stabilité du colloïde est atteinte. L'agrégation est lente et le système paraît cinétiquement stable. Il se forme des agrégats de tailles variables sans que les particules ne floculent complètement. Cet état de floculation est réversible si le minimum secondaire n'est pas très profond (≈ -1 kT).
- ✚ Enfin, dans la dernière situation V_{T3} , aucune barrière d'énergie ne permet d'éviter l'agrégation des particules qui se mettent rapidement à floculer. La suspension colloïdale coagule de façon irréversible.

Pour une particule de rayon a , un milieu de constante diélectrique ϵ et un matériau de constante effective de Hamaker A , la hauteur de la barrière d'énergie dépend essentiellement des facteurs suivants :

- ✚ la concentration c et la charge z de l'électrolyte. Leur augmentation provoque la diminution du potentiel de répulsion V_R par abaissement de la longueur de Debye κ^{-1} (κ^{-1} est proportionnel à $\frac{1}{z\sqrt{c}}$).
- ✚ le potentiel électrique ψ_d de surface : un potentiel de surface élevé augmente la valeur de V_R .

Pour que les nanoparticules demeurent individualisées dans le temps il faudra minimiser les forces de van der Waals. Pour atteindre cet objectif, deux solutions peuvent être mises en œuvre de manière individuelle ou conjointe : induire de la répulsion électrostatique ou induire de la répulsion stérique. Il s'agit de greffer à la surface des nanoparticules des agents capables de donner naissance aux forces qui vont créer les répulsions recherchées.

Deux stratégies ont été développées dans ce sens pour fonctionnaliser les nanoparticules in situ dans la microémulsion inverse, la première par adjonction d'organosilanes chargés et la deuxième par accrochage d'un poly(éthylène glycol) via la méthode de click chemistry.

III.3 Stabilisation par greffage d'organosilanes chargés

Le greffage de groupements chargés à la surface des nanoparticules génère une double couche ionique plus importante autour d'elles. Si le potentiel électrique associé à la double couche est suffisamment élevé, la force de répulsion empêchera les nanoparticules d'entrer en contact et donc s'opposera à leur agrégation. Il en résulte une stabilisation colloïdale par répulsion électrostatique (Figure III-3)

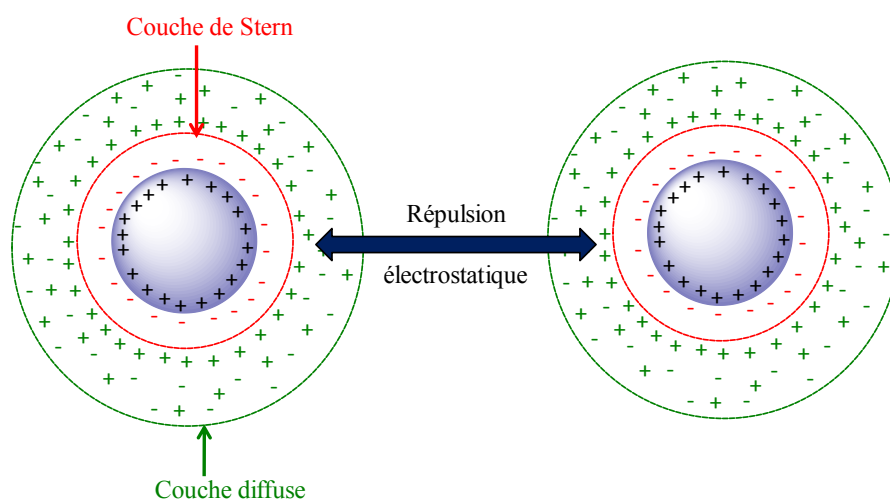


Figure III-3 : Représentation schématique de la répulsion électrostatique

Le procédé de modification de surface de nanoparticules de silice par des organosilanes consiste en général à les faire réagir avec les groupes hydroxyle Si – OH à la surface des nanoparticules de silice⁽⁹²⁾ (Figure III-4).

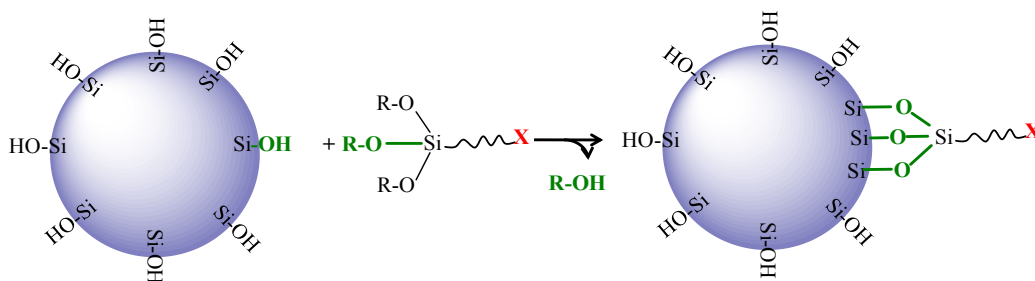


Figure III-4 : Greffage d'un organosilane sur une nanoparticule de silice

Divers groupes fonctionnels peuvent ainsi être greffés à la surface des nanoparticules de silice en utilisant l'organosilane approprié (Tableau III-1).

Tableau III-1 : Quelques organosilanes fonctionnels

APMDES	aminopropylméthyl-diéthoxysilane	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_3)\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$
APMDMOS	3-acryloxypropylméthyl-diméthoxysilane	$\text{CH}_2=\text{CHCOO}(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_3)\text{Si}(\text{OCH}_3)_2$
APTMS	3-aminopropyltriméthoxysilane	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$
APTMS	3-acryloxypropyltriméthoxysilane	$\text{CH}_2=\text{CHCOO}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$
APTMS	aminophényltriméthoxysilane	$\text{H}_2\text{NPhSi}(\text{OCH}_3)_3$
TESPT	bis(triéthoxysilylpropyl)tétrasilane	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{Si}_4(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
DDS	diméthyl-dichlorosilane	$(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$
GPTMOS	3-glycidyloxypropyltriméthoxysilane	$\text{CH}_2(\text{O})\text{CHCH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$
ICPTES	3-isocyanatopropyltriéthoxysilane	$\text{OCN}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
MMS	méthacryloxyméthyltriéthoxysilane	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
MPS	3-(triméthoxysilyl)propylméthacrylate	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$
MPTES	methacryloxypropyltriéthoxysilane	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
MPTS	mercaptopropyltriéthoxysilane	$\text{SH}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
MTES	methyltriéthoxysilane	$\text{CH}_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
PTMS	phenyltriéthoxysilane	$\text{PhSi}(\text{OCH}_3)_3$
VTES	vinyltriéthoxysilane	$\text{CH}_2=\text{CHSi}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
VTS	vinyltriméthoxysilane	$\text{CH}_2=\text{CHSi}(\text{OCH}_3)_3$

Parmi eux les organosilanes à fonction amine et ceux à fonction carboxylique sont incontestablement les plus usités (127; 92; 128; 121). Ces deux groupements chimiques sont également des agents de couplage performants en particulier pour les applications en biologie, principalement lorsque des réactions d'amidification sont mises en jeu.

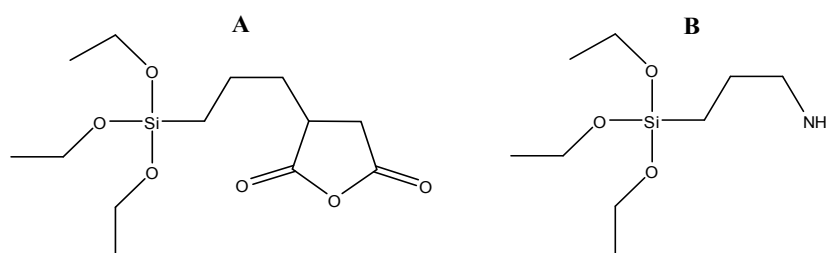


Figure III-5 : Structure moléculaire A) du Triéthoxysilylpropyl anhydride succinique (TESPAS), B) de l'Aminopropyltriéthoxysilane (APTES)

Les nanoparticules $\text{Ag}@\text{SiO}_2$ et $\text{Au}@\text{SiO}_2$ fabriquées au Chapitre II ont été utilisées en vue d'une fonctionnalisation par cette méthode. Les conditions expérimentales sont %W 90,8%, pH 6, %APTES 20% et $\text{C}_{\text{Ag ou Au}}$ 4g/L. Typiquement, l'organosilane fonctionnel, ici le triéthoxysilylpropyl anhydride succinique (TESPAS) ou l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) (Figure III-5), est ajouté à la microémulsion inverse 24h après le début de la

synthèse afin qu'il vienne se greffer sur les nanoparticules déjà formées par condensation avec les groupements silanols situés à leur surface.

III.3.1 Caractérisation morphologique

Les nanoparticules fonctionnalisées récupérées 24h après l'ajout des organosilanes fonctionnels sont observables sur les clichés de MET de la Figure III-6.

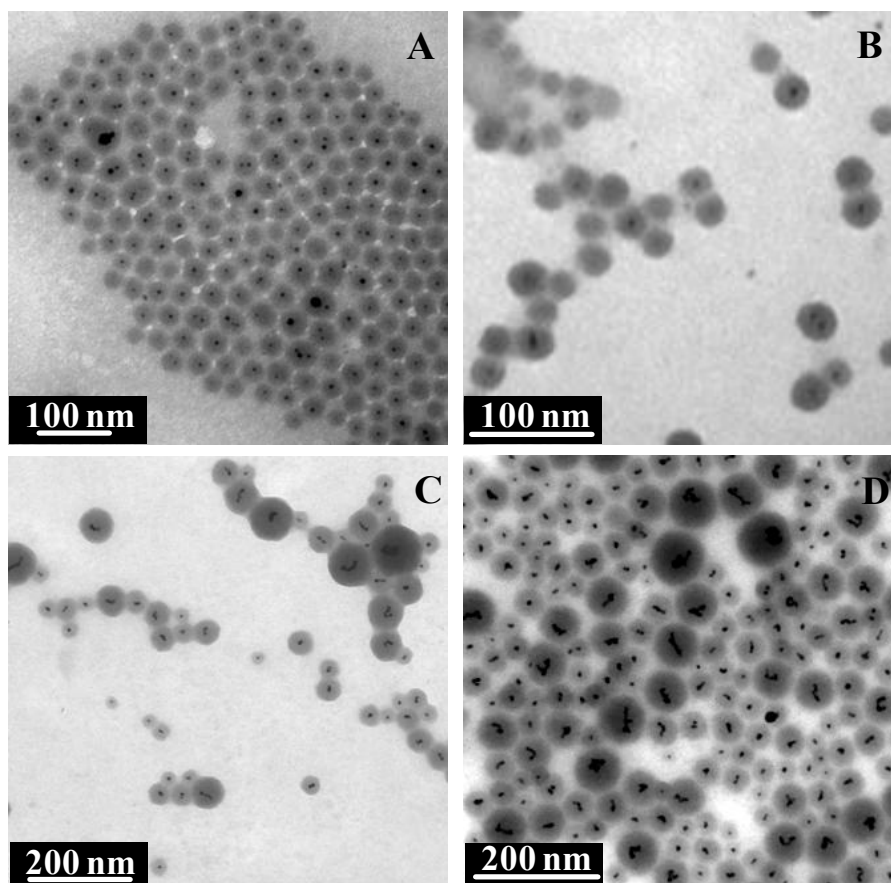


Figure III-6 : Micrographies MET des nanoparticules fonctionnalisées. A) Ag@SiO₂ avec l'APTES, B) Ag@SiO₂ avec le TESPAS, C) Au@SiO₂ avec l'APTES, D) Au@SiO₂ avec le TESPAS

La fonctionnalisation ne change pas notablement la morphologie sphérique des nanoparticules. D'après les mesures de taille réalisées à partir des clichés de MET, le diamètre des nanoparticules Ag@SiO₂ fonctionnalisées avec l'APTES (Ag@SiO₂-NH₂) est d'environ 30 nm ± 4% et celui des nanoparticules fonctionnalisées avec le TESPAS (Ag@SiO₂-COOH) de 25 nm ± 13%. A titre de comparaison le diamètre des nanoparticules Ag@SiO₂ obtenues au Chapitre II en utilisant la même quantité molaire de silane est de 34 nm ± 7%.

Les effets de la fonctionnalisation sur les nanoparticules Au@SiO₂ sont un peu similaires. La morphologie des nanoparticules fonctionnalisées est semblable à celle des nanoparti-

cules Au@SiO₂ obtenues au Chapitre II mais elles sont en majorité d'un diamètre plus faible, environ 31 nm au lieu de 57 nm. Mais de façon surprenante ils présentent une importante polydispersité qui pourrait provenir des conditions de synthèse.

III.3.2 Mesure de potentiel zêta

La mesure du potentiel ζ des nanoparticules est une manière d'évaluer leur stabilité colloïdale. Le potentiel ζ étant assimilé au potentiel électrique ψ_d dont dépend l'énergie potentielle de répulsion V_R (Équation III-2), plus les nanoparticules ont un potentiel zêta élevé (en valeur absolue), plus elles vont se repousser et donc avoir moins tendance à s'agréger. Pour une bonne stabilité colloïdale, il est admis que le potentiel zêta doit être supérieur en valeur absolue à 30mV. La mesure du potentiel ζ permet également de confirmer le greffage des organosilanes grâce au signe de la charge électrique de surface.

Les solutions de concentration égale à 0,1mg/mL sont préparées en dispersant chaque type de nanoparticules grâce aux ultrasons (1 min) dans trois solutions salines de pH différents. La présence du sel permet de rendre les solutions plus conductrices afin de pouvoir effectuer les mesures. Le pH des échantillons a été relevé avant chaque mesure.

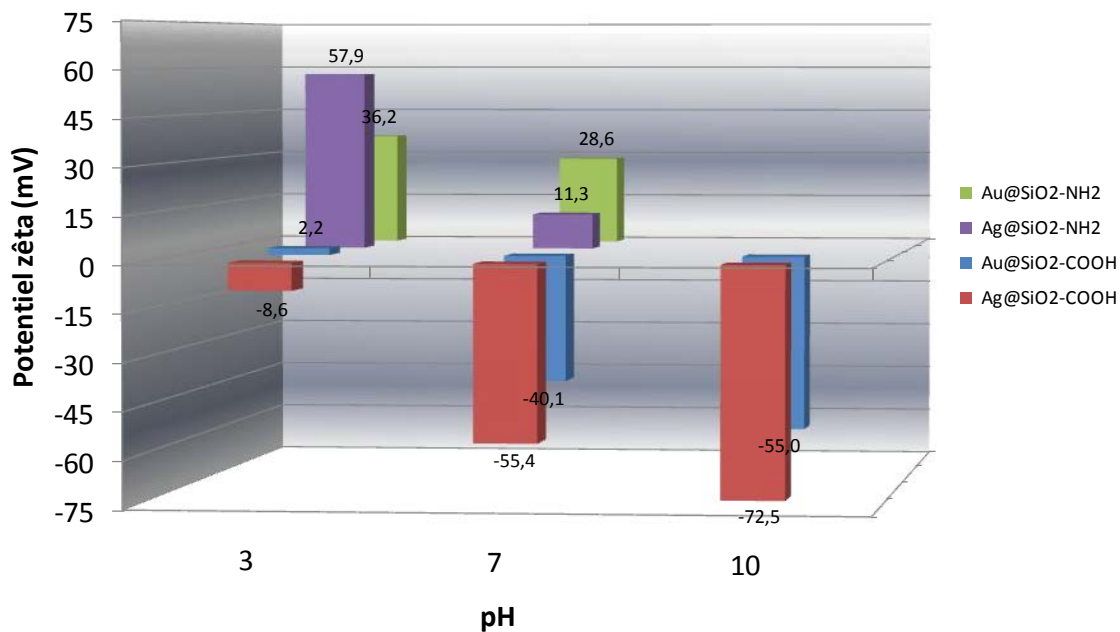


Figure III-7 : Variation du potentiel zêta des nanoparticules en fonction du pH

D'après la Figure III-7, le potentiel zêta des nanoparticules dépend de leur groupement fonctionnel de surface ainsi que du pH du milieu. Le potentiel zêta des nanoparticules fonctionnalisées avec l'APTES n'a pu être mesuré en solution basique car la solution colloïdale obtenue dans ces conditions se déstabilise rapidement.

A pH 3 et 7, le potentiel zêta positif des nanoparticules aminées correspond à des charges de surfaces positives générées par la protonation des groupements NH_2 ($\text{pK}_a = 9$) par les ions hydronium. Tandis que le potentiel zêta négatif des nanoparticules modifiées par des fonctions acide carboxylique constaté pour un pH supérieur ou égal à 3 correspond à des charges de surface négatives générées par la déprotonation des deux groupements COOH ($\text{pK}_{a1} = 4,16$; $\text{pK}_{a2} = 5,61$) par les ions hydroxyle.

Lorsque nous avons effectué des tests de stabilité en préparant des solutions aqueuses de nanoparticules (2mg/ml) à différents pH, nous avons constaté que les nanoparticules fonctionnalisées avec le TESPAS étaient stables de pH 10 à pH 6 tandis que les nanoparticules fonctionnalisées avec l'APTES ne le sont qu'à pH acide comme décrit dans la littérature⁽⁹³⁾. Ces observations sont en accord avec les valeurs de potentiel zêta indiquées sur la Figure III-7. La charge globale à la surface des nanoparticules fonctionnalisées avec le TESPAS qui est forte (en valeur absolue) à pH basique permet d'assurer une importante répulsion entre nanoparticules même à pH 7, alors que celle des nanoparticules fonctionnalisées avec l'APTES est juste suffisante à pH acide pour assurer une bonne répulsion. Au-delà elle faiblit et n'est plus en mesure d'empêcher l'agrégation.

Il ressort de cette étude qu'il est possible par la voie de synthèse que nous avons mise au point de greffer *in situ* dans la microémulsion des organosilanes à la surface des deux types de nanoparticules étudiés : Ag@SiO_2 et Au@SiO_2 . Cette méthode de fonctionnalisation permet de créer suffisamment de charges de surface pour maintenir une bonne stabilité colloïdale tout en gardant l'intégrité des nanoparticules sans augmentation de leur taille. Nous avons prouvé l'efficacité de cette méthode pour deux types d'organosilane, l'APTES et le TESPAS, et il est tout à fait envisageable de l'étendre à d'autres organosilanes habituellement utilisés pour modifier les nanoparticules tels que ceux répertoriés dans le Tableau III-1.

Comme nous l'avons vu, le contrôle du pH est toutefois essentiel pour garantir une stabilisation électrostatique efficace en raison de la dépendance au pH du caractère chargé de la fonction greffée. De plus une stabilisation uniquement basée sur la répulsion électrostatique est performante uniquement lorsque la force ionique du milieu est peu élevée. Dans le cas contraire, comme en milieu biologique, il peut se produire un phénomène d'écrantage lié à la présence en nombre important d'espèces chargées. Il était

dès lors intéressant d'envisager en parallèle un autre type de fonctionnalisation pour remédier à ce type de contraintes.

III.4 Stabilisation par greffage de macromolécules par click chemistry

Le greffage de macromolécules telles que les polymères ou oligomères est le second moyen par lequel l'agrégation des nanoparticules peut être prévenue. L'adsorption de ces molécules à la surface des nanoparticules forme une couche qui occupe l'espace interparticulaire et limite ainsi la distance d'approche entre deux nanoparticules et par conséquent leur contact (Figure III-8).

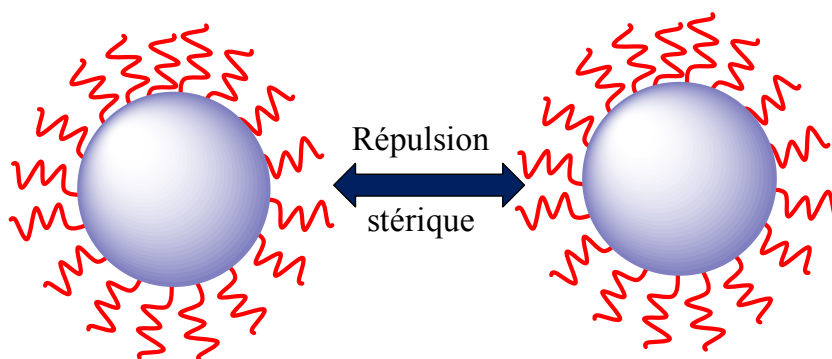


Figure III-8 : Représentation schématique de la répulsion stérique

Contrairement à la stabilisation électrostatique, qui est principalement utilisée dans les milieux aqueux, la stabilisation stérique peut être utilisée en phase organique comme en phase aqueuse. Il suffit d'adapter la longueur et/ou la nature des macromolécules greffées.

Pour réaliser un tel greffage, nous connaissons déjà les procédés faisant appel aux fonctions habituelles de la chimie organique telles que les fonctions acide carboxylique, amine et alcool intervenant dans des réactions de couplage tels que l'amidification ou l'estérification. Ces deux types de couplages sont cependant handicapés par leur faible rendement en milieu aqueux, nécessitant donc l'utilisation d'activateur et une résistance à l'hydrolyse plus ou moins élevée en fonction de leur environnement. Pour contourner ces types de problèmes nous avons choisi d'examiner ici les potentialités offertes par les réactions de Click Chemistry et en particulier la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen comme réaction de couplage entre les nanoparticules et un polymère hydrophile susceptibles de les stabiliser en milieu aqueux indépendamment du pH.

III.4.1 La réaction de Click Chemistry*

La réaction de Click Chemistry offre une alternative particulièrement intéressante aux différentes réactions abondamment utilisées pour la fixation solide et spécifique de ligands sur des surfaces⁽¹²⁹⁾. Ce nouveau type de chimie a été développé en 2001 par le prix Nobel de chimie B.K. Sharpless⁽¹³⁰⁾. L'exemple le plus connu et le plus décrit dans la littérature est la cycloaddition catalysée ou non d'un alcyne sur un azoture, qui conduit de manière irréversible à la formation d'un cycle hétéroaromatique 1, 2, 3-triazole⁽¹³¹⁾.

De manière générale, le concept de Click Chemistry est la mise en œuvre d'un couplage hétéroatomiques (C-X-C) spécifique, irréversible, avec un bon rendement. Pour pouvoir bénéficier du qualificatif de Click Chemistry, une réaction doit satisfaire à de nombreux critères, notamment des conditions expérimentales simples à mettre en œuvre, une insensibilité à la présence d'oxygène ou d'eau, une stéréospecificité, une récupération aisée des produits par méthode non-chromatographique telles que la cristallisation ou la distillation, de très bons rendements, ainsi qu'un gain thermodynamique généralement supérieur à 20 kcal/mol. Seules quatre types de réaction sont actuellement considérés comme respectant les critères d'une réaction de Click Chemistry :

1. La cycloaddition d'espèces insaturées telle la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen et la cycloaddition de Diels-Alder.
2. Les substitutions nucléophiles et plus particulièrement les réactions par ouverture de cycle, tels les époxydes et aziridines.
3. Les formations de carbonyles de type non-aldol, tel les éthers, oxymes, hydrazones, amides et urées.
4. Les réactions d'addition sur des doubles liaisons carbone-carbone, telles les époxydations, aziridinations les réactions d'addition de type Michaël et les thiol-ène, thiol-yne.

* Collaboration avec Cédric Tissandier, Master Recherche Lyon1 2010, « Nanoparticules multifonctionnelles : vers une synthèse directe en microémulsion inverse »

De part son efficacité et sa facilité de mise en œuvre en milieu aqueux, la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un alcyne et un azoture a éclipsé les autres depuis que les équipes de Meldal ⁽¹³²⁾ et Sharpless ^(133; 134) ont montré que cette réaction pouvait être catalysée par le cuivre (CuAAC : Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition).

Sans le Cu(I), la réaction est lente (72h à 120°C), le rendement est faible (20-40%) et la réaction génère deux régioisomères : les triazoles 1,4 et 1,5 obtenus respectivement via une approche anti et syn. En présence d'une source de Cu(I), la réaction de cycloaddition (Figure III-9) passe par un intermédiaire ligand de type C≡CCuLn. Elle devient plus rapide et le régioisomère anti est favorisé ^(131; 135).

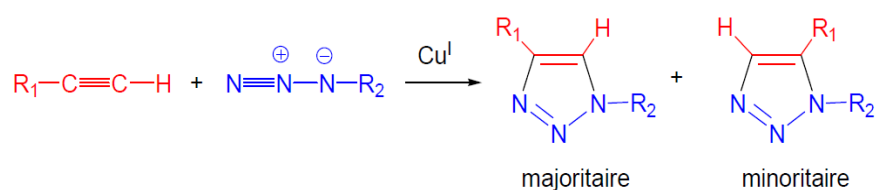


Figure III-9 : Réaction de formation des 1,4-triazole (majoritaire) et 1,5-triazole (minoritaire).

Meldal et al ⁽¹³²⁾ ont établi une liste de sources de Cu(I) associées à leurs conditions expérimentales d'emploi. Pour la plupart, l'utilisation de ligands est souvent nécessaire pour stabiliser le degré d'oxydation +I du cuivre qui, en leur absence, tend à précipiter en milieu aqueux ⁽¹³⁶⁾. En milieu hydroalcoolique, la source de Cu(I) provient en général de la réduction in situ du sulfate de cuivre pentahydraté par de l'ascorbate de sodium. Une base est également nécessaire pour favoriser la déprotonation de l'alcyne. En milieu organique, les bases azotées de type triéthylamine, lutidine, ou N,N' diisopropyl éthylamine (DIPEA) sont les plus souvent employées tandis qu'en milieu aqueux, l'eau suffit à la déprotonation.

De très nombreuses architectures macromoléculaires obtenues par cette réaction ont été décrites récemment dans la littérature ^(133; 137). Parmi elles, nous pouvons citer le greffage de fluorophores sur de la cellulose ⁽¹³⁸⁾, la réaction de couplage de polysaccharides sur des polysiloxanes ⁽¹³⁹⁾ ou encore, dans le domaine des nanoparticules, la fonctionnalisation de nanoparticules d'or par des dendrimères poly(éthylèneglycol) ⁽¹⁴⁰⁾ et de nanoparticules de silice par polymérisation RAFT ⁽¹⁴¹⁾.

Dans notre cas nous avons choisi d'utiliser ce type de chimie pour greffer une molécule de poly(éthylèneglycol) in situ dans la microémulsion sur les nanoparticules de structure cœur@coquille Argent@Silice dopées avec la FITC (Ag@SiO₂-FITC).

III.4.2 Greffage de molécule de polyéthylène glycol in situ dans la microémulsion par CuAAC

Les molécules de PEG sont employées depuis les années 1970, pour améliorer les conditions d'administration des médicaments in vivo⁽¹⁴²⁾. Elles ont un caractère hydrophile prononcé dans la mesure où chaque motif d'éthylène glycol est susceptible de se lier à deux ou trois molécules d'eau. Cette caractéristique en fait un bon stabilisant en milieu aqueux car sa chaîne peut de plus engendrer une répulsion entre particules basée sur l'encombrement stérique. Les PEGs sont de plus non toxiques et ont fait leurs preuves à la fois dans le domaine pharmaceutique et dans celui des nanoparticules utilisées in vivo en raison de leur capacité à masquer l'objet qu'ils recouvrent. Ainsi, il rend furtive l'espèce injectée qui, en l'absence de PEG, serait rapidement détectée par le système immunitaire et éliminée de l'organisme par stockage dans le foie⁽¹⁴³⁾.

Le greffage de molécules de PEG sur des nanoparticules s'effectue préférentiellement par une interaction forte afin d'éviter leur relargage. Pour cela, elles sont généralement modifiées soit par un thiol pour une fixation sur des particules d'or⁽¹⁴⁴⁾, soit par une dopamine pour des nanoparticules d'oxyde de fer⁽¹⁴⁵⁾, soit par une amine pour des QDots⁽¹⁴⁶⁾ ou encore par un alkoxysilane pour être greffé à la surface d'une couche de polysiloxane⁽¹⁴⁷⁾.

À ce jour, très peu d'études ont été menées sur le greffage de groupements fonctionnels à la surface de nanoparticules par click chemistry en microémulsion inverse. Cette étude fait donc à notre connaissance office de pionnier en la matière. Il s'agira d'adapter ce type de réaction en apportant les différents groupes fonctionnels nécessaires à sa réalisation puis de mettre au point une procédure simple permettant la fonctionnalisation des nanoparticules in situ dans la microémulsion inverse.

Le PEG utilisé dans cette étude est le poly(éthylène glycol) monométhyléther (MPEG) (Figure III-10) de masse molaire égale à 550g/mol.

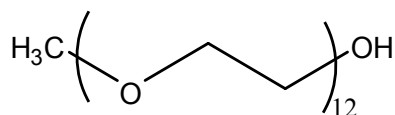


Figure III-10: Structure du polyéthylène glycol monométhyléther

La stratégie envisagée pour greffer le MPEG sur les nanoparticules consiste d'une part à préfonctionnaliser la surface des nanoparticules avec des groupements alcyne et d'autre

part, à modifier le MPEG avec une fonction terminale azoture. Dans un deuxième temps, nous avons effectué la réaction de Click Chemistry in situ dans la microémulsion par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen (CuAAC) (Figure III-11).

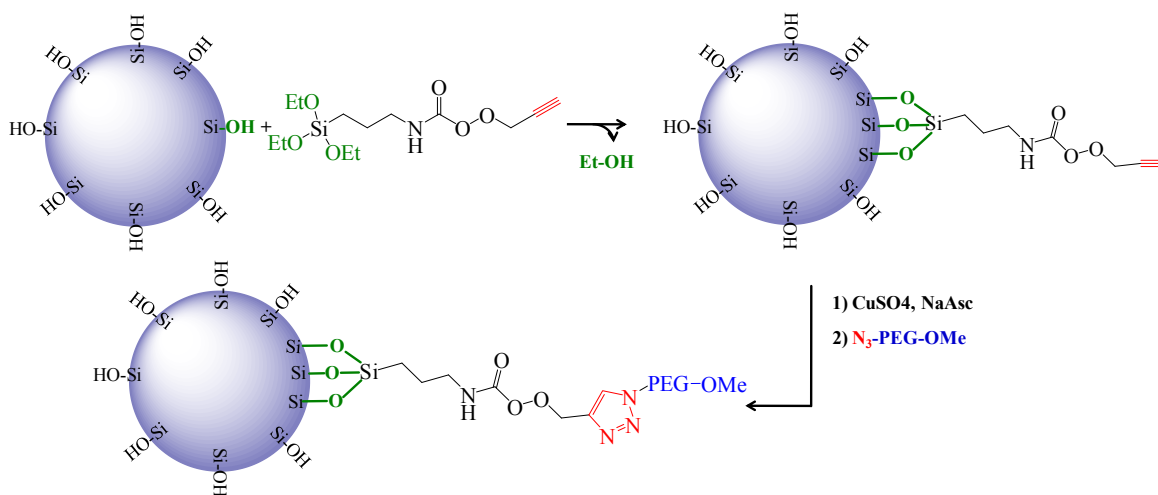


Figure III-11 : Schéma du protocole de greffage d'un MPEG sur les nanoparticules par click chemistry

Nous éviterons ainsi les processus de séparation et de redispersion des nanoparticules donc de pertes de produit et de temps.

III.4.2.1 Préfonctionnalisation des nanoparticules Ag@SiO₂-FITC par des groupements alcynes

Les nanoparticules Ag@SiO₂-FITC employées dans cette étude ont été préfonctionnalisées avec des groupements alcyne selon la méthode développée au chapitre III.3 qui fait appel aux organosilanes. Pour cela, l'o-(propargyloxy)-N-(triéthoxysilylpropyl) carbamate (OPNTC) (Figure III-12), un silane porteur d'un groupement propargylique, est introduit dans la microémulsion 24h après le début de la synthèse des nanoparticules Ag@SiO₂-FITC.

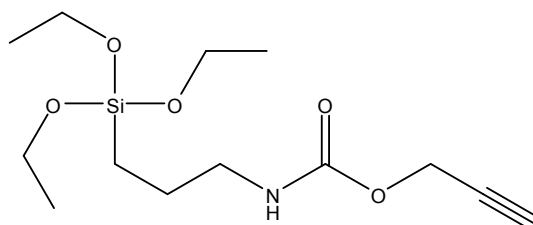


Figure III-12 : Structure moléculaire de l'o-(Propargyloxy)-N-(triéthoxysilylpropyl) carbamate (OPNTC).

Les nanoparticules récupérées 24h après peuvent être observées sur le clichés de MET de la Figure III-13. Elles ont un diamètre moyen de 53 nm du même ordre que celui des nanoparticules Ag@SiO₂-FITC.

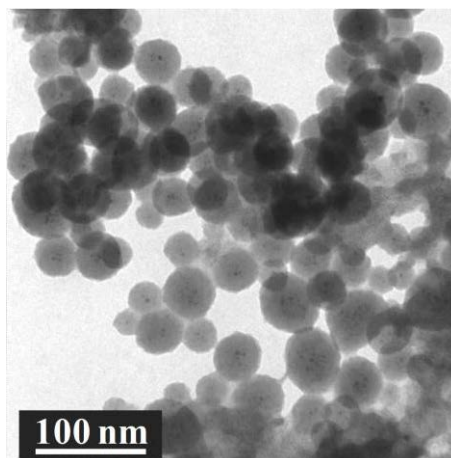


Figure III-13 : Micrographe MET de (Ag@SiO₂-FITC)-C≡C

Sur le spectre IR effectué sur les nanoparticules (Figure III-14), l'absence du pic à 2126 cm⁻¹ attribué aux fonctions alcyne peut s'expliquer par le fait que l'intensité du pic est décrite comme faible dans la littérature. En revanche l'apparition d'un pic à 1708 cm⁻¹, caractéristique de la fonction carbonyle du carbamate de l'organosilane alcyne, confirme la réussite de la préfonctionnalisation des nanoparticules Ag@SiO₂-FITC. Cette hypothèse est également confirmée par les pics autour de 2900 cm⁻¹, typiques des fonctions C-H d'une chaîne carbonée, qui sont beaucoup plus marqués après fonctionnalisation.

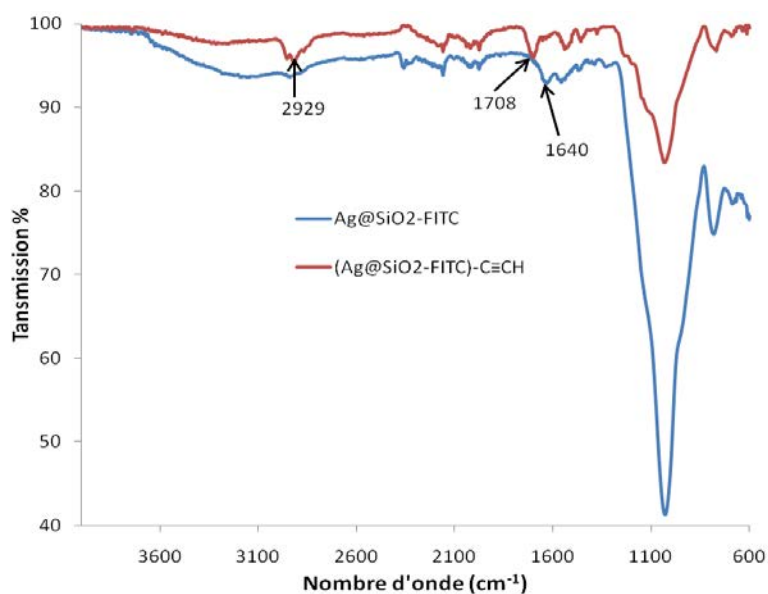


Figure III-14 : Spectre infrarouge des nanoparticules Ag@SiO₂-FITC avant et après fonctionnalisation par un silane alcyne

Nous avons donc mis en évidence que les nanoparticules ont été effectivement préfonctionnalisées en surface par des groupements alcyne sans induire de changement de taille.

III.4.2.2 Modification du MPEG par une fonction terminale azoture.

La modification du MPEG par une fonction terminale azoture se déroule en deux étapes ⁽¹⁴⁸⁾ (Figure III-15).

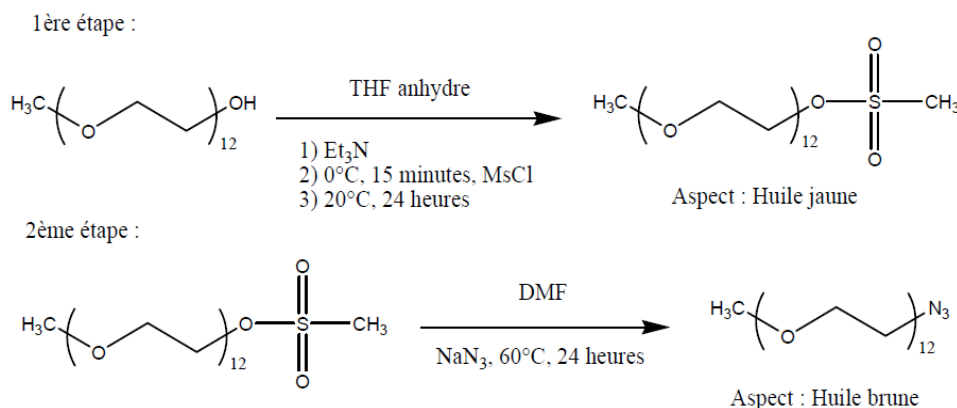


Figure III-15 : Modification du MPEG par une fonction azoture N₃ terminale

Elle consiste dans un premier temps à remplacer la fonction alcool par un bon groupe partant le mésylate qui sera au cours de la deuxième étape substitué par le groupement azoture.

Le MPEG séché est mis en solution dans du THF anhydre avec de la triéthylamine. Le mélange réactionnel est plongé dans un bain de glace pendant 15 minutes avant que du chlorure de méthanesulfonyle n'y soit ajouté goutte à goutte. Par la suite la synthèse est poursuivie à température ambiante pendant 24 heures puis purifié par lavage.

Dans la seconde étape le mésylate de MPEG synthétisé est solubilisé dans le DMF en présence d'azoture de sodium. La réaction a lieu à 60 °C pendant 24 heures et sous protection UV.

Les analyses IR réalisées sur le MPEG et sur le produit final montrent l'apparition d'un pic à 2108 cm⁻¹ caractéristique des fonctions azoture.

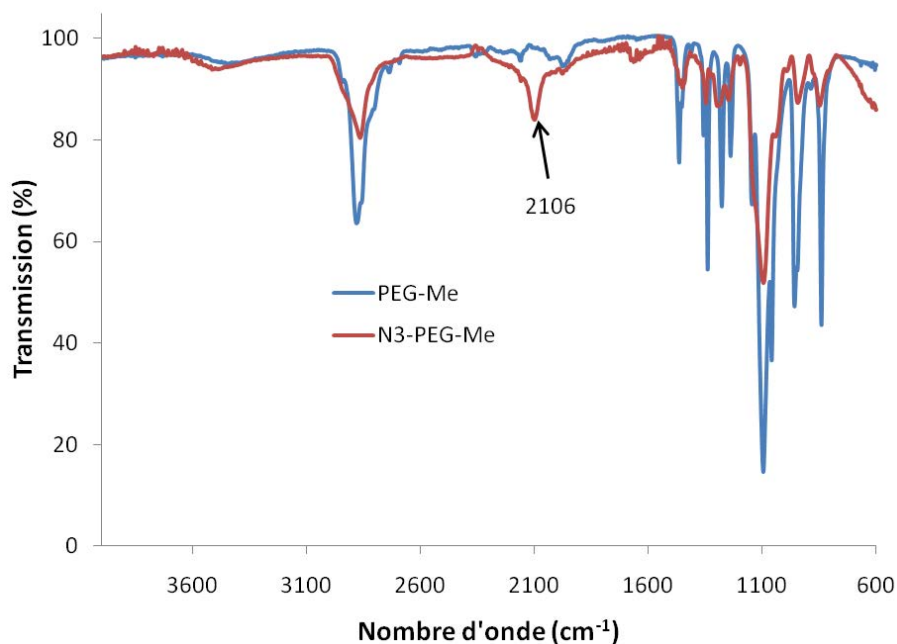


Figure III-16 : Spectres infrarouge du MPEG avant et après modification par une fonction azoture

Nous pouvons donc en conclure que la modification du MPEG par la fonction azoture a bien été réalisée. A ce stade, nous pouvons envisager de greffer cette molécule sur les $(Ag@SiO_2-FITC)-C\equiv C$ synthétisées précédemment par CuAAC.

III.4.2.3 Couplage par CuAAC dans la microémulsion

Le mode opératoire utilisé s'inspire de celui développé par Boisselier et *al*⁽¹⁴⁰⁾. Nous avons ajouté à la microémulsion inverse contenant les nanoparticules $Ag@SiO_2-FITC$ préfonctionnalisées avec des alcynes ($(Ag@SiO_2-FITC)-C\equiv CH$) une quantité de N_3-MPEG équivalente au nombre de fonctions alcyne. Ensuite 0,05 équivalent molaire de sulfate de cuivre pentahydraté et 0,06 équivalent molaire d'ascorbate de sodium sont ajoutés tour à tour pour catalyser la réaction. Le cliché de MET de la Figure III-17 montre des nanoparticules de diamètre moyen 54 nm du même ordre que les nanoparticules avant fonctionnalisation avec N_3-MPEG .

Les analyses IR ne permettent pas de confirmer l'accrochage du PEG. En effet, le pic de l'alcyne n'était déjà pas visible sur les nanoparticules initiales et le triazole formé est décrit comme ayant une signature très faible en infrarouge. Nous avons donc choisi de mettre en évidence la modification des nanoparticules par une voie indirecte.

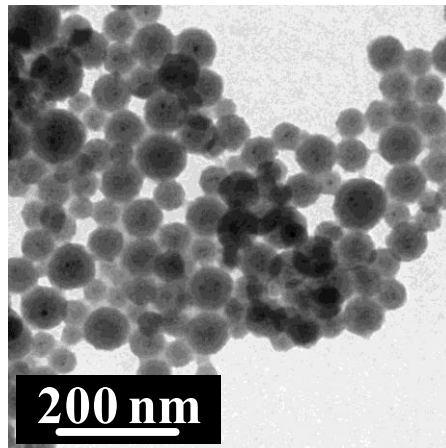


Figure III-17 : Micrographie MET de (Ag@SiO₂-FITC)-PEG-Me

Pour confirmer la PEGylation effective des nanoparticules, une série d'observations sur leur dispersion en solution aqueuse a également été menée. Deux solutions, de concentration massique identique (2g/L), sont préparées en dispersant respectivement des nanoparticules (Ag@SiO₂-FITC)-MPEG et Ag@SiO₂-FITC dans de l'eau par ultrasons pendant une minute. Comme attendu, la stabilité colloïdale des nanoparticules Ag@SiO₂-FITC est beaucoup moins satisfaisante que leurs homologues PEGylées (Figure III-18). En effet, les premières ont précipité 24h après leur dispersion tandis que les secondes sont restées stables.

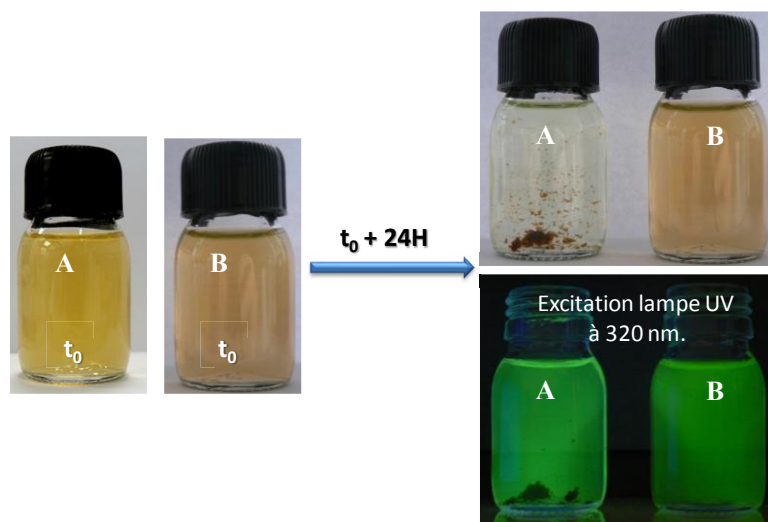


Figure III-18 : Photographies des solutions aqueuses : (A) Ag@SiO₂-FITC, (B) Ag@SiO₂-FITC-C≡C-N₃-MPEG après dispersion par ultrasons (t₀) et 24h après t₀ (t₀+24H)

La fonctionnalisation par CuAAC a permis de greffer des groupements MPEG à la surface des nanoparticules Ag@SiO₂-FITC tout en conservant l'intégrité des nanoparticules et sans augmentation de leur taille. Les molécules de PEG ont pu ensuite jouer leur rôle de stabilisateur de nanoparticules dans l'eau. Cette étude apporte la preuve qu'il est possible

de mettre en place une réaction de click chemistry pour fonctionnaliser des nanoparticules in situ dans une microémulsion.

III.5 Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons pu explorer deux voies de modification de surface tout en abordant deux points de vue de la stabilisation des nanoparticules en milieu aqueux. Les deux méthodes de greffage mises au point ont permis de fonctionnaliser des nanoparticules par microémulsion inverse sans affecter leur intégrité morphologique. Avec la première méthode, la fonctionnalisation a été obtenue par greffage d'organosilanes chargés à la surface des nanoparticules déjà formées. Ce greffage, confirmé par les mesures de potentiel zêta, a permis d'apporter assez de groupements fonctionnels pour assurer la stabilité des nanoparticules en milieu aqueux via une répulsion électrostatique.

La méthode de greffage étant applicable à d'autres organosilanes, nous avons également pu la transposer à la préfonctionnalisation des nanoparticules avec des groupements alcyne sur lesquels nous avons réussi à greffer par click chemistry un PEG préalablement modifié avec une fonction azoture. La présence des molécules de PEG a permis d'améliorer fortement la stabilité colloïdale en milieu aqueux par rapport aux nanoparticules non fonctionnalisées. D'après les résultats obtenus dans la littérature sur les objets PEGylés, nous pourrions de surcroît envisager une utilisation in vivo de nanoparticules potentiellement multifonctionnelles⁽¹⁴⁹⁾.

Les deux méthodes de fonctionnalisation se sont montrées efficaces pour greffer des groupements fonctionnels sur la surface de nanoparticules. Le greffage par CuAAC apparaît particulièrement intéressant car il ouvre une nouvelle voie de fonctionnalisation des nanoparticules par microémulsion inverse avec un meilleur contrôle grâce à la sélectivité de la réaction de CuAAC. Nous pouvons envisager par exemple des nanoparticules fonctionnalisées par une combinaison de PEG portant un groupement fonctionnel et de PEG inactif sans le risque que les deux réagissent ensemble. Cela permettra de diminuer le nombre de fonctions réactives, source parfois de liaisons non spécifiques⁽⁹²⁾, tout en gardant une bonne stabilité colloïdale.

Au fil des trois premiers chapitres nous avons réussi à développer un procédé suffisamment polyvalent pour synthétiser des nanoparticules de silice, intégrer en leur sein différents types de molécules et de nano-objets métalliques puis greffer de manière

covalente des groupements chimiques fonctionnels capables d'assurer une bonne stabilité colloïdale et le cas échéant d'interagir avec des molécules et/ou matériaux. Ces nanomatériaux à base de silice aux propriétés modulables sont prometteurs pour un large éventail d'applications notamment biologiques⁽⁸⁸⁾. Conjugés avec des biomolécules telles que des enzymes, des anticorps et des molécules d'ADN ils ont montré des avantages significatifs dans la détection⁽¹²¹⁾, le ciblage⁽¹⁵⁰⁾ et l'imagerie⁽¹²⁸⁾ biologique, la vectorisation de médicaments⁽¹⁵¹⁾. L'application visée dans cette thèse est l'utilisation des nanoparticules Ag@SiO₂, envisagées comme des réservoirs d'ions argent, comme agent antibactérien en raison des propriétés antibactériennes des ions argent largement décrites dans la littérature.

**Chapitre IV Effet antibactérien des nanoparticules Ag@SiO₂ :
greffage sur textile médical**

IV.1 Introduction.

Une importante préoccupation de l'industrie de la santé est aujourd'hui centrée sur les infections bactériennes associées aux plaies ouvertes ou à des dispositifs biomédicaux pouvant abriter des colonies bactériennes. L'émergence de souches de bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques notamment les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) qui sont à l'origine de graves infections nosocomiales et causent ainsi de nombreux décès reflète l'importance de ce problème.

Pour prévenir le développement de ces bactéries, trois grandes catégories d'antibactériens sont actuellement utilisées⁽¹⁵²⁾ :

- ✚ les substances actives de contact : polymères amphiphiles ou peptides antibactériens de synthèse,
- ✚ les polymères anti- dépôt de microbes,
- ✚ les matériaux composites constitués d'une matrice chargée de substances tels que des métaux lourds, des antibiotiques, des halogènes, de petites molécules biocides ou encore l'oxyde nitrique.

Dans la dernière catégorie, les matériaux composites contenant de l'argent font office de référence en raison des propriétés biocides connues des ions Ag⁺ envers différents bactéries, champignons et virus. Ces matériaux antibactériens à base d'argent sont en général constitués soit d'argent métallique, Ag⁰, qui a un très faible taux de dissolution en milieu aqueux ou d'un sel d'ion Ag⁺ très soluble dans l'eau. Nous envisageons donc d'utiliser en lieu et place nos nanoparticules Ag@SiO₂. L'objectif est d'augmenter le taux de génération d'ions Ag⁺ biocides dans le cas d'Ag⁰, tout en limitant la dissolution incontrôlée et rapide comme ce serait le cas pour les sels d'argent facilement solubles.

Nous imaginons en effet les nanoparticules Ag@SiO₂ comme des réservoirs d'ions Ag⁺ capables de fournir dans le temps une concentration d'ions Ag⁺ biocides. Nous souhaitons de surcroît pouvoir contrôler la libération des ions Ag⁺ ainsi que leur incorporation dans des supports tels que du textile. Cette étude rentre dans le cadre d'un projet européen (Lidwine) de prévention et de lutte contre la colonisation bactérienne des escarres. Après quelques rappels nous étudierons les propriétés antibactériennes de ces nanoparticules imaginées comme des réservoirs d'ions argent, capables d'être relargués. Nous testerons

l'efficacité des nanoparticules contre différents types de bactéries. Enfin, nous détaillerons les procédures employées pour greffer les nanoparticules sur du textile médical.

IV.2 Activité antimicrobienne de l'argent

Les premières utilisations de l'argent en tant que substance antimicrobienne date de l'époque du médecin grec Hippocrate en 460 avant JC mais c'est au 20^{ème} siècle qu'il est devenu le plus populaire. Une de ses formes d'utilisations la plus répandue fut le nitrate d'argent. Il était placé en goutte dans les yeux des nouveaux nés afin de prévenir les infections qui causaient souvent la cécité. Avec la découverte des antibiotiques dans le milieu du 20^{ème} siècle, son emploi s'est par la suite restreint aux traitements des brûlures graves ⁽¹⁵³⁾. Aujourd'hui, face à des agents pathogènes de plus en plus résistants aux antibiotiques, l'argent se présente comme une alternative prometteuse grâce à sa capacité de prévention et d'éradication des microorganismes pathogènes.

IV.2.1 Mécanisme d'action

Le caractère antibactérien de l'argent vient plus particulièrement des ions Ag⁺. Le mécanisme d'action rapporté par la littérature n'est toutefois que partiellement connu. Il semblerait que les ions Ag⁺ désactivent les enzymes cellulaires et l'ADN des bactéries en se coordonnant aux groupes donneurs d'électrons tels que les thiols, les carboxylates, les amides, les imidazoles, les indoles et les hydroxyles. Ils inhiberaient alors la capacité de la bactérie à respirer et à se répliquer. En outre le traitement des cellules bactériennes par les ions Ag⁺ cause des dommages importants sur leur membrane plasmique, caractérisés par la formation de trous, conduisant à une augmentation de la perméabilité et ainsi à la mort de la bactérie ⁽¹⁵⁴⁾. Une production d'espèces réactives d'oxygène, du peroxyde d'hydrogène, induite par la présence des ions Ag⁺ qui entraîne l'inhibition des enzymes de la chaîne respiratoire a également été relevée ⁽¹⁵⁵⁾.

Les autres avantages des ions Ag⁺ sont leur faible toxicité envers les cellules mammifères, leur efficacité contre une large souche de bactéries et autres microorganismes même à des doses très faibles, de l'ordre du ppb et le fait qu'ils ne provoquent pas facilement de résistance microbienne. En effet la réplication de l'ADN étant bloquée il n'y a que peu de chance que la bactérie développe une résistance comme c'est le cas avec antibiotiques.

IV.2.2 Les produits antibactériens à base d'argent

L'incorporation de l'argent dans différents matériaux a été intensivement étudiée afin d'étendre leur utilité dans les soins et les dispositifs biomédicaux à risque tels les cathéters, les sondes, les prothèses, les implants et dans les pansements pour brûlures et plaies qui sont sources d'infestation microbienne.

Les différents produits à base d'argent utilisés pour traiter les bactéries peuvent être classés en deux catégories suivant qu'ils contiennent soient de l'agent sous forme ionique ou sous forme nanoparticulaire. Nous pouvons citer les films minces de silice ⁽¹⁵⁴⁾, de poly(vinylalcool) ⁽¹⁵⁶⁾ et de poly(méthylméthacrylate) ⁽¹⁵⁷⁾ contenant du nitrate d'argent réduit, les colloïdes de nanoparticules d'argent stabilisées par des saccharides ⁽¹⁵⁸⁾, du citrate ou du NPVP^a ⁽¹⁵⁹⁾, les zéolites ⁽¹⁶⁰⁾ ainsi que les nanoparticules de silice mésoporeuse (MCM41) ⁽¹⁵⁵⁾ dopées avec de l'argent.

En fonction de leur structure globale, de la concentration et de la formulation du composé d'argent, des différences d'activité antibactérienne peuvent exister entre chaque produit ⁽¹⁶¹⁾.

Tableau IV-1 : Teneur en argent de quelques pansements ⁽¹⁶¹⁾

Produits	Quantité d'argent (mg/100 cm ²)
Silverlon	546
Calgitrol Ag ⁺	141
Acticoat	105
Contreet Foam	85
Contreet Hydrocolloid	32
Aquacel Ag ⁺	8.3
SilvaSorb	5.3
Actisorb Silver 200	2.7

^a poly (4-vinylpyridine)-co-poly (4 - vinyle-N-hexylpyridinium)

Parmi eux, les produits sous forme de nanoparticules⁽¹⁶²⁾ se sont montrés les plus efficaces⁽¹⁵⁸⁾ car en plus de l'action des ions Ag⁺ les nanoparticules interagissent fortement avec la membrane des bactéries grâce à leur grande surface spécifique. Cela entraîne une déstructuration plus forte de la membrane des bactéries et une libération plus active des ions Ag⁺ au sein de la bactérie.

Toutefois si elles ne sont pas bien protégées, les nanoparticules d'argent peuvent avoir une utilisation limitée. En effet, leur faible stabilité colloïdale ainsi que l'adsorption à leur surface des substances intracellulaires des bactéries mortes peut les empêcher de continuer à libérer des ions Ag⁺ dans le milieu et donc altérer leur activité biocide durable⁽¹⁵⁷⁾. Il s'avère donc particulièrement intéressant de les recouvrir par une couche de silice capable de les protéger.

IV.3 Effet antibactérien des nanoparticules : Ag-DTDTPA, Ag-DTDTPA@SiO₂ et Ag@SiO₂

Dans le chapitre précédent nous avons développé une procédure de production de nanoparticules d'argent stabilisées par une molécule hydrophile, le DTDTPA (Ag-DTDTPA). Ces nano-objets d'argent ont pu être encapsulés par la suite dans une matrice de silice et nous avons obtenues des structures cœur@coquille Ag-DTDTPA@SiO₂. En parallèle nous avons également développé une méthode one pot séquentiel de préparation de structures cœur@coquille Ag@SiO₂. Il s'agit dans cette partie d'évaluer le potentiel antibactérien de chaque type de nanoparticules puis de valider le concept «Ag@SiO₂ réservoir d'ions Ag⁺» capables de diffuser à travers la matrice de silice et d'inhiber efficacement les bactéries.

Les mesures de l'activité antibactérienne ont été mises en œuvre dans le cadre des projets NANOPTX avec l'équipe de Bruno CHEVET de l'Institut Français du Textile et de l'Habillement (IFTH) à Saint-Étienne et LIDWIN avec Michael BURNET de la société SINOVO en Allemagne.

IV.3.1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne des nanoparticules Ag@SiO₂

Nous avons évalué l'effet antibactérien des nanoparticules vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*. Le *S. aureus* aussi appelé staphylocoque doré est une souche de bactéries gram-positive difficile à éradiquer et à l'origine de

nombreuses infections liées aux dispositifs biomédicaux et aussi d'intoxications alimentaires. C'est le plus pathogène de son espèce.

Les bactéries *Klebsiella pneumoniae* sont une souche gram-négative responsable d'infections communautaires (urinaires et respiratoires) et d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés (infections urinaires, broncho-pulmonaires, septicémies). Elles sont impliquées comme *S. aureus* dans de nombreuses infections nosocomiales.

Pour lutter contre leur développement et observer un effet antibactérien, il semble nécessaire d'après les données de la littérature, d'utiliser en milieu biologique des concentrations supérieures à 50 ppm^(163; 164). Nous avons donc préparé pour chaque type de nanoparticule une solution aqueuse de concentration en argent égale à environ 70 ppm, la quantité d'argent étant déduite des conditions de synthèse (Tableau IV-2).

Tableau IV-2 : Quantité d'Argent théorique contenue dans les nanoparticules d'essai

Nanoparticules	Quantité d'argent théorique (%)
Ag-DTDTPA	17%
Ag-DTDTPA@SiO ₂	3,7%
Ag@SiO ₂	3%

Les différentes solutions ainsi que deux solutions témoins, une de nitrate d'argent et une autre de nanoparticules de silice seule, ont étéensemencées par les suspensions bactériennes selon les conditions indiquées dans le tableau ci-dessous (Tableau IV-3). La concentration de la solution de nitrate d'argent est de 70 ppm et la concentration massique de la solution de silice de 2g/L.

Tableau IV-3 : Conditions d'ensemencement des solutions par les suspensions bactériennes

Dispersion de nanoparticules (mL)	3	3
Bouillon nutritif (mL)	1	1
Suspension bactérienne (mL)	<i>S. aureus</i>	0,5
	<i>K. pneumoniae</i>	0,5

Lors des tests un tube témoin est testé parallèlement aux deux autres. Il est composé de 3 mL d'eau distillée stérile, 1 mL de bouillon nutritif et 0,5 mL de tryptone-sel, un diluant isotonique. Après incubation pendant 6h30min à 37°C au bain-marie et sous agitation, 1mL de chaque tube est transféré dans 10 mL de bouillon nutritif puis incubé de nouveau à 37°C pendant 18 à 24 h. La croissance bactérienne a été ensuite évaluée en inspectant

visuellement la turbidité du milieu de culture. En effet lorsqu'un milieu de culture estensemencé par des bactéries, chacune se divise et il se forme un amas de cellules, appelée colonie, issues de cette seule cellule-mère. Il y a proportionnalité entre la turbidité de la culture, le nombre d'unités ayant formé une colonie (UFC) et le nombre d'individus présents dans le volume initialement déposé.

Le résultat des observations répertoriées dans le Tableau IV-4 indiquent que les bouillons nutritifsensemencés avec des bactéries incubées préalablement avec respectivement les nanoparticules de SiO₂, d'Ag-DTDTPA et d'Ag-DTDTPA@SiO₂ présentent une turbidité qui est synonyme de croissance bactérienne. Ces nanoparticules n'ont donc pas eu d'effet bactéricide envers les souches de *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*.

Tableau IV-4 : Analyse visuelle de l'activité bactérienne par observation de la turbidité

	AgNO ₃	SiO ₂	Ag-DTDTPA	Ag-DTDTPA@SiO ₂	Ag@SiO ₂
Concentration en Ag (ppm)	70	0	70	70	74
Témoin de croissance	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	+	-

- Solution claire

■ Solution turbide

En revanche, le caractère limpide des bouillons nutritifsensemencés avec des bactéries auparavant incubées avec d'une part AgNO₃ et d'autre part avec Ag@SiO₂ indique que ces derniers ont eu un effet bactéricide envers les souches de *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*. La perméabilité de la matrice de silice semble avoir permis aux cœurs d'argents de s'oxyder en ions Ag⁺. Cela confirme le concept de réservoir «Ag@SiO₂ réservoir d'ions Ag⁺» capables de diffuser à travers la matrice de silice et d'inhiber efficacement les bactéries.

L'absence d'activité antibactérienne des nanoparticules de silice était attendue, en revanche dans le cas des nanoparticules Ag-DTDTPA cette innocuité vis-à-vis des bactéries est apparue plus surprenante. Etant donné que le cœur d'argent uniquement recouvert d'un réseau moléculaire est plus accessible, elles devraient présenter un caractère

antibactérien plus marqué que celui des nanoparticules Ag@SiO₂. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce résultat. La couche de molécules DTDTPA est susceptible d'exercer soit une action protectrice de l'argent vis-à-vis de l'oxydation, soit, plus probablement, une action complexante des ions Ag⁺ biocides produits, par l'intermédiaire de ses groupements, acide carboxylique.

IV.3.2 Concentration minimale inhibitrice (MIC)

L'étude qui suit a été effectuée sur la souche *E. coli*, une bactérie très répandue dans le milieu intestinal des mammifères, ainsi que sur la souche *Bacillus pumilus* (*B. pumilus*). Cette dernière est détectée dans des cas de toxi-infections alimentaires consécutives à la consommation de pâtés, d'œufs, de fromage et de jus de fruits et peut être à l'origine de méningites et de septicémies.

Les souches d'*E. coli* et de *B. pumilus* ont été incubées dans un milieu LB (Lysogeny Broth) avec différentes quantités de nanoparticules afin de déterminer pour chacune d'elle la concentration la plus faible pour laquelle un effet bactéricide est observé. Cette concentration appelée aussi concentration minimale inhibitrice (MIC) nous permettra d'évaluer la capacité inhibitrice de chaque nanoparticule sachant que plus la MIC est petite, plus le composé a une efficacité antibactérienne élevée.

Une aliquote prélevée du milieu de culture LB contenant les bactéries (10⁹ UFC) a été mélangée avec différentes quantités de chaque type de nanoparticule étudiée dans le paragraphe précédent. L'ensemble a été incubé à 37°C pendant 3 heures. La croissance bactérienne a été estimée en mesurant la densité optique des différentes solutions de culture à 600 nm (D.O_{600nm}). Cette technique basée sur l'absorption de la suspension bactérienne permet de suivre l'évolution de la densité bactérienne, reliée à la densité optique par la loi de Beer-Lambert.

La solution témoin de culture des bactéries a une D.O_{600nm} égale à 0,1 donc il sera considéré par la suite qu'il existe un effet bactéricide seulement si la D.O_{600nm} est inférieure à cette valeur. Par ailleurs, les nanoparticules pouvant interférer avec la lecture de la densité optique à cette longueur d'onde, des solutions de milieu LB sans bactérie et de concentration en nanoparticules identique à celle utilisée en présence de bactéries ont été utilisées comme ligne de base.

Pour cette étude, il s'avère indispensable de déterminer pour chacune des nanoparticules la concentration réelle d'argent.

IV.3.2.1 Dosage du taux d'Ag⁺ dans les nanoparticules d'essai

La quantité d'argent contenue dans les structures cœur@coquille Ag@SiO₂ et Ag-DTDTPA a été évaluée par voie électrochimique suivant le protocole établi au chapitre II.4.3.1.2.

Pour les structures cœur@coquille Ag@SiO₂ cette méthode a été complétée par d'autres mesures en ICP (plasma à couplage inductif) réalisé par le centre d'analyse du CNRS à Vernaison. Les valeurs obtenues sont consignées dans le Tableau IV-5.

Tableau IV-5 : Quantité d'Argent contenue dans les nanoparticules Ag@SiO₂

C _{Ag} ^a	Quantité d'argent théorique (%)	Mesures électrochimiques (%)	Mesures ICP (%)	Moyenne (%)
2g/L	3,0	3,1	2,7	2,9 ± 14,7%
4g/L	5,8	6,2	5,0	5,6 ± 10,9%

^a concentration d'argent dans la phase aqueuse de la microémulsion

Les quantités d'argent par unité de masse (%m_{Ag/Ag@SiO₂}) obtenues par les deux techniques de mesures sont du même ordre de grandeur et sont concordantes avec les estimations théoriques déterminées en fonction des conditions de synthèse.

L'analyse par voie électrochimique de la quantité d'argent contenue dans les nanoparticules Ag-DTDTPA a donné une valeur de l'ordre de 35% en masse soit environ le double de la valeur théorique (Tableau IV-2). Or le calcul théorique a été effectué dans l'hypothèse où tous les réactifs, en l'occurrence le sel d'argent et le DTDTPA, ont réagi. Dans ces conditions, la valeur supérieure du pourcentage mesuré d'argent traduit vraisemblablement qu'une partie du DTDTPA ne s'est pas fixée en surface des nanoparticules d'argent et a été éliminé au cours de la purification.

IV.3.2.2 Tests antibactériens

Les mesures de D.O_{600nm} des différents milieux de culture contenant les bactéries *E. Coli* en contact avec les deux types de nanoparticules Ag@SiO₂, contenant un pourcentage d'argent égal respectivement à 3% et 6%, sont représentées sur la Figure IV-1. Elles indiquent qu'il a été possible d'inhiber la croissance d'*E. Coli* à partir d'une concentration

en nanoparticules Ag@SiO₂ égale 62,5µg/mL avec un effet légèrement plus marqué de la part des nanoparticules Ag@SiO₂ (6% Ag).

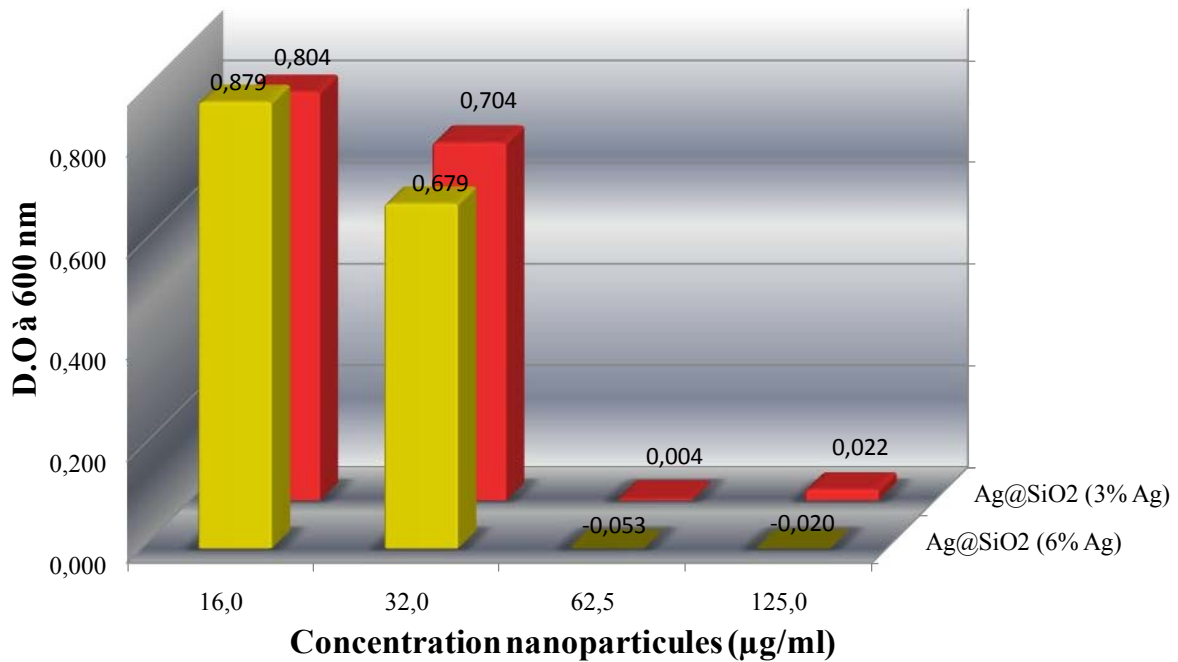


Figure IV-1 : Suivi par mesure D.O_{600nm} de la croissance des bactéries *E. Coli* dans le milieu LB en présence de différentes concentrations de nanoparticules Ag@SiO₂ contenant des concentrations massiques d'argent égales respectivement à 6% et 3%

En revanche, d'après les mesures de D.O_{600nm} des milieux de cultures contenant les bactéries *E. Coli* en contact avec les nanoparticules Ag-DTDTPA, ces dernières n'ont pas été en mesure de limiter la croissance des bactéries (Figure IV-2). Seul un effet de diminution du nombre de bactéries à partir de 1000µg/mL a été observé.

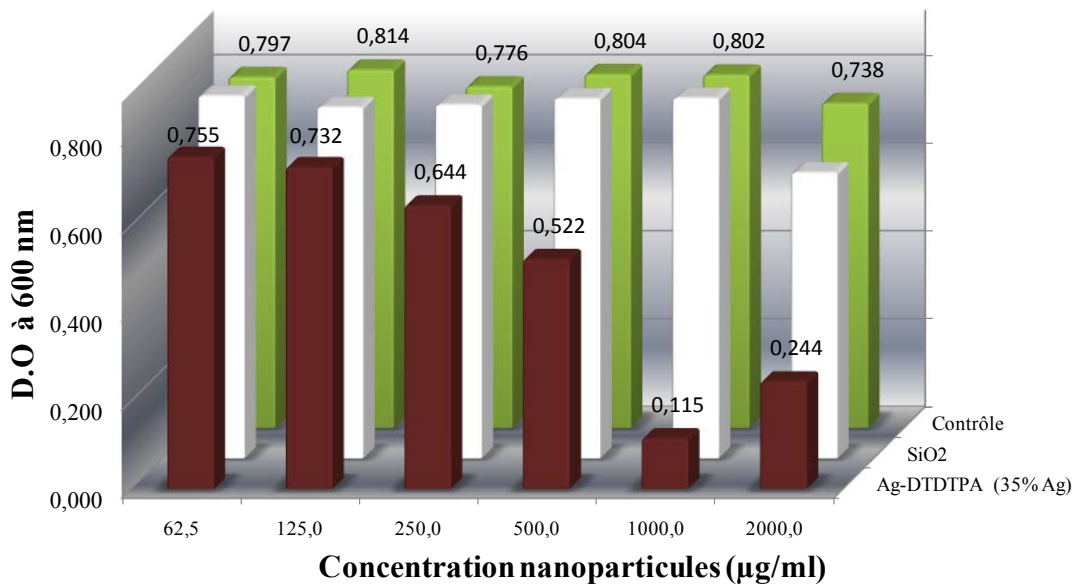


Figure IV-2 : Suivi par mesure de D.O_{600nm} de la croissance des bactéries *E. Coli* dans le milieu LB en présence de différentes concentrations de nanoparticules Ag-DTDTPA et SiO₂.

Les mesures de D.O_{600nm} des milieux de culture contenant les bactéries *E. coli* en contact avec les nanoparticules de silice seule montre une croissance des bactéries similaire à celui de l'échantillon de contrôle (Figure IV-2). Ce deuxième contrôle confirme à nouveau que l'inhibition de la croissance observée pour les nanoparticules Ag@SiO₂ a été induite par la présence de l'argent dans la matrice de silice et non la matrice elle-même.

Dans le cas des bactéries *B. pumilus*, les résultats consignés dans la Figure IV-3 indiquent que les nanoparticules Ag@SiO₂ ont à nouveau été en mesure de limiter la croissance des bactéries mais à une concentration plus élevée de 125µg/mL que sur la souche de bactéries précédente. Cette différence laisse penser que le système de défense de *B. pumilus* contre les effets inhibiteurs de croissance d'Ag⁺ est plus importante que celui d'*E. coli*. Cette observation est sans doute due au fait que les bactéries gram-positifs comme le *B. pumilus* ont une membrane plasmique plus épaisse par rapport à *E. coli* de type gram-négatif.

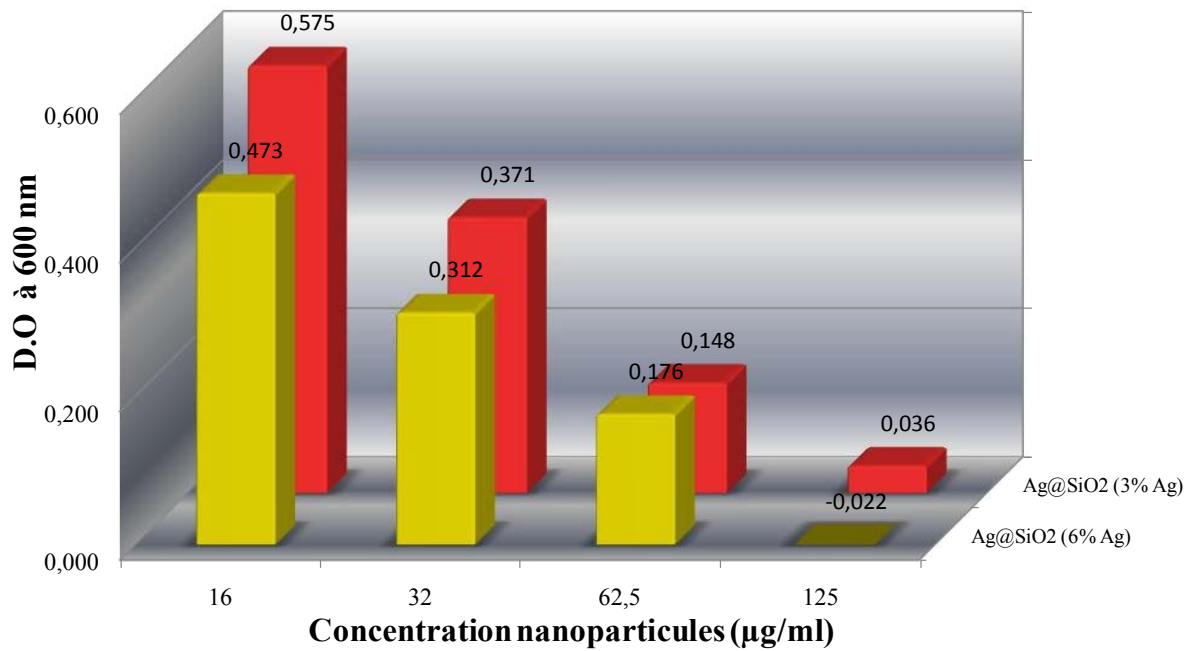


Figure IV-3 : Suivi par mesure D.O_{600nm} de la croissance des bactéries *B. pumilus* dans le milieu LB en présence de différentes concentrations de nanoparticules Ag@SiO₂ contenant des concentrations massiques d'argent égales respectivement à 6% et 3%

Les nanoparticules Ag-DTDTPA et de silice ce sont montrées inefficaces comme dans le cas de *E. Coli* (Figure IV-4). Seule une légère baisse est observée pour Ag-DTDTPA à 2000 µg/mL.

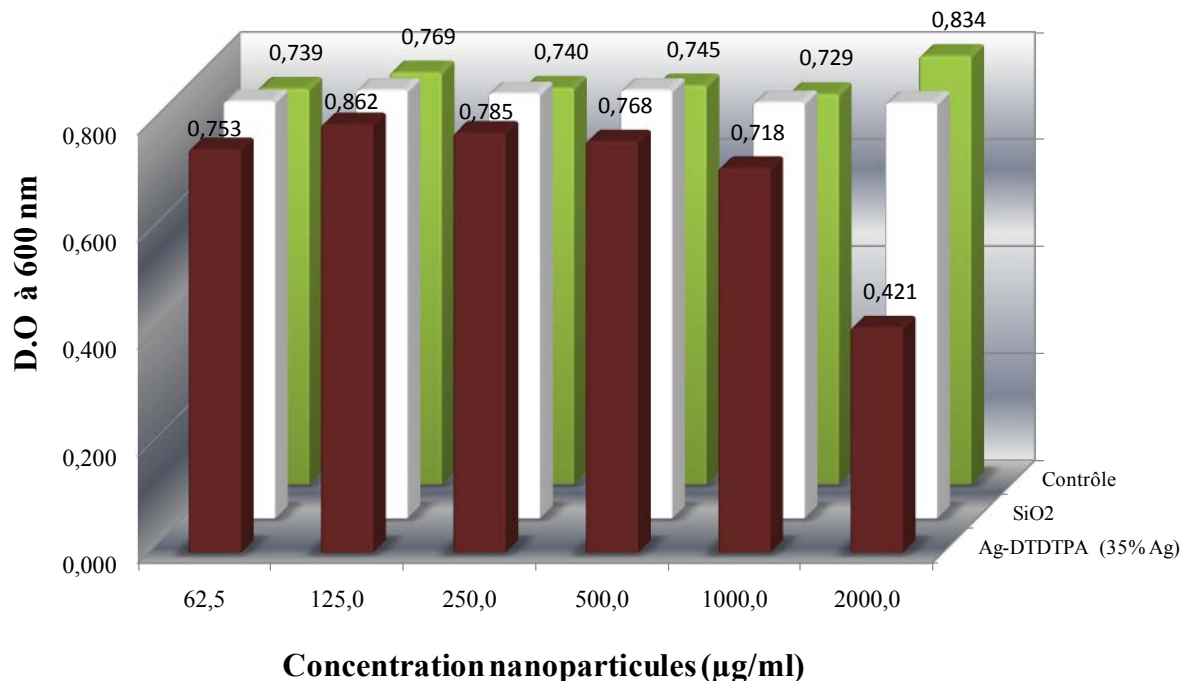


Figure IV-4 : Suivi par mesure de D.O_{600nm} de la croissance des bactéries *B. pumilus* dans le milieu LB en présence de différentes concentrations de nanoparticules Ag-DTDTPA et SiO₂.

Ces résultats sont comparables avec les expériences effectuées sur la première souche bactérienne. Les nanoparticules Ag@SiO₂ présentent une activité antibactérienne supérieure à celle d'Ag-DTDTPA et à celles des nanoparticules de silice seule, à la fois pour deux souches de bactéries qu'elles soient de type gram-positif ou gram négatif. Cet effet antibactérien des Ag@SiO₂ semble pouvoir être contrôlé par la variation du pourcentage d'agent encapsulé dans la matrice de silice.

IV.4 Textile antibactérien

Les textiles antibactériens ont fait leur apparition sur le marché destiné au grand public sous la forme de chaussettes, sous vêtements, linge de toilette, couettes et autres vêtements de sport. S'ils apportent très certainement un avantage dans le domaine général de l'hygiène, ils sont susceptibles de jouer un rôle crucial dans le milieu hospitalier. En effet, ils peuvent conférer de nouvelles propriétés au linge afin d'empêcher que ce dernier ne se comporte comme un réservoir à bactéries dans le but de limiter ainsi les infections croisées. Cependant, ces textiles qui revendiquent la propriété d'inhiber le développement des bactéries contiennent des agents chimiques actifs qui ne sont théoriquement pas sans conséquence en termes de toxicité de développement de bactéries résistantes ou de sélection de flore.

Il existe plusieurs manières d'incorporer des agents antibactériens sur du textile. Selon la solidité du lien que l'on souhaite établir, l'agent antibactérien peut être adsorbé (méthode par dépôt), collé grâce à un liant (méthode par apprêtage), mélangé au polymère textile avant filage et tissage ou encore greffé chimiquement. Chaque méthode sera adaptée en fonction de la nature du textile (coton, soie, polyester, polyamide). Certaines d'entre elles, tels que le dépôt par pulvérisation cathodique (PVD) ou le dépôt plasma (CVD), s'avèrent compliquées à mettre en œuvre.

Dans cette partie de l'étude, notre objectif est de greffer durablement les nanoparticules Ag@SiO₂ sur une bande en coton ainsi que sur des fibres de polyéthylène téréphtalate (PET). Nous étudierons le caractère antibactérien du tissu modifié ainsi que la solidité du greffage.

IV.4.1 Incorporation des nanoparticules Ag@SiO₂ sur une bande médicale de coton.

Une procédure simple et pratique a été mise au point pour le greffage des nanoparticules Ag@SiO₂ sur le coton.

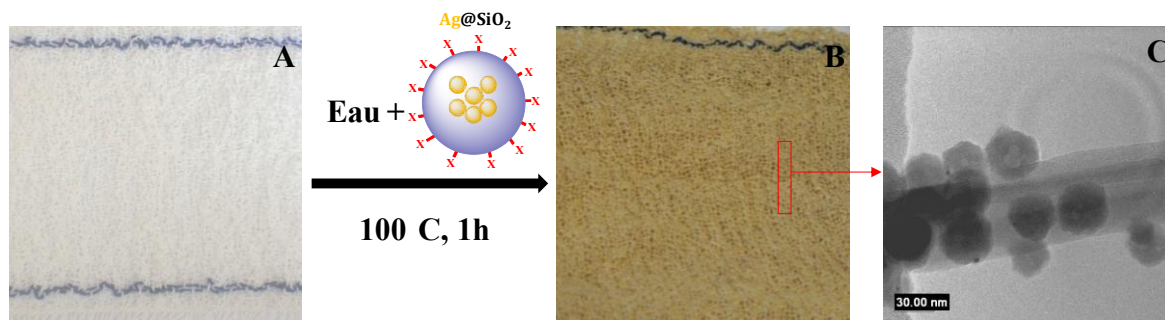


Figure IV-5 : Schéma de la procédure de greffage des nanoparticules Ag@SiO₂ sur la bande de coton. A) Coton neutre, B) Coton imprégné, C) micrographie MET du coton imprégné.

Le textile est plongé dans une solution aqueuse contenant les nanoparticules préalablement soumises aux ultrasons dans le but d'assurer une meilleure dispersion colloïdale. Le tout est ensuite porté à 100°C sous vive agitation. La température est maintenue pendant une heure afin d'optimiser l'accrochage puis le mélange est laissé revenir à température ambiante. Le textile fonctionnalisé est par la suite lavé à grande eau et laissé à sécher à l'air libre.

IV.4.2 Tests antibactériens

Nous souhaitons évaluer le potentiel antibactérien de la bande de coton imprégnée par différentes quantités de nanoparticules de types Ag@SiO₂ (3% Ag) et Ag@SiO₂ (6% Ag). Le taux d'argent dans les textiles d'essai a été comme précédemment évalué par voie électrochimique et ICP (Tableau IV-6).

Tableau IV-6 : Quantité d'Argent contenue dans les textiles d'essai

Bandes de coton fonctionnalisées avec	Concentration surfacique d'argent (mg/100 cm ²)			
	Valeurs théoriques	Mesures électrochimique	Mesures ICP	Moyenne
Ag@SiO ₂ (3% Ag)	10	0,74	0,84	0,79±8,50%
	5	0,54	0,63	0,59±10,59%
Ag@SiO ₂ (6% Ag)	10	0,64	0,63	0,63±0,81%
	5	0,45	0,52	0,49±9,90%

Les valeurs de quantité d'argent mesurée par les deux techniques sont du même ordre de grandeur mais largement inférieures aux valeurs théoriques calculées. Toutes les nanoparticules n'ont donc pas été accrochées. Les concentrations surfaciques de nanoparticules Ag@SiO₂ (3% Ag) et Ag@SiO₂ (6% Ag) correspondantes déduites à partir du taux d'argent par nanoparticule, respectivement 2,9% et 5,6%, sont consignées dans le Tableau IV-7.

Tableau IV-7 : Quantité de nanoparticules Ag@SiO₂ contenue dans les textiles d'essai

Bandes de coton fonctionnalisées avec	Concentration surfacique Ag@SiO ₂ (mg/100 cm ²)			
	Valeurs théoriques	Mesures électrochimiques	Mesures ICP	Moyenne
Ag@SiO ₂ (3% Ag)	345	26	29	27±8%
	172	19	22	20±11
Ag@SiO ₂ (6% Ag)	179	11	11	11±0%
	89	8	9	9±10%

Le taux de greffage déterminé est relativement faible par rapport à la quantité de nanoparticules introduites dans le bain de teinture du textile. Ces données laissent supposer que le greffage sur la fibre atteint un seuil de saturation. En effet, lorsqu'est introduite dans le milieu une quantité deux fois plus importante de nanoparticules, la quantité de nanoparticules effectivement présentes sur le tissu non seulement ne double pas mais est au contraire très proche (lignes 1 et 2 du Tableau IV-7). Il n'apparaît donc pas nécessaire d'utiliser une grande quantité de nanoparticules pour obtenir du coton présentant un caractère antibactérien.

L'étape suivante de notre étude consiste à déterminer si ce textile imprégné présente à son tour une activité antibactérienne comme celle observée dans le cas des nanoparticules en solution.

IV.4.2.1 Évaluation de l'activité antibactérienne des textiles imprégnés

L'activité antibactérienne des textiles a été évaluée sur la base de la norme NF EN ISO 20743 (2007) sur la souche *Staphylococcus aureus*. Des dilutions sont réalisées dans un milieu LB (Lysogeny Broth) pour obtenir une suspension bactérienne de 2,51.10⁵ UFC/mL. Ensuite 200 µL de cette suspension de *S. aureus* ont été utilisés pour ensemercer 3 éprouvettes de textiles d'environ 0,16 cm² (0,30g) chacune. L'incubation des éprouvettes se fait à 37 ± 1°C dans des flacons stériles hermétiques de 30ml. Les bactéries sont ensuite décrochées puis dénombrées 24h après.

La croissance bactérienne, C, est définie comme étant égale à la différence entre la moyenne logarithmique du nombre de bactéries dénombrées après 24h de contact $\overline{\log(UFC_{24h})}$ et la moyenne logarithmique du nombre de bactéries dénombrées au début de l'expérimentation $\overline{\log(UFC_{0h})}$ (Équation IV-1).

$$C = \overline{\log(UFC_{24h})} - \overline{\log(UFC_{0h})}$$

Équation IV-1

L'activité antibactérienne A, définie comme une différence de croissance bactérienne, est évaluée suivant la formule suivante :

$$A = F - G$$

Équation IV-2

Où F est la croissance bactérienne du textile témoin et G celle du textile d'essai. Le textile sera dit « actif », lorsque son activité sera supérieure à 2.

IV.4.2.2 Activité antibactérienne

La croissance mesurée après 24h de contact avec les textiles d'essai et l'activité qui en est déduite sont présentés dans le Tableau IV-8. Les résultats montrent une croissance de *S. aureus* sur la bande de coton neutre avec une augmentation d'environ deux décades en 24 h. Ceci met en évidence la capacité de *Staphylococcus aureus* à adhérer et à croître sur le textile s'il n'est pas imprégné. Dans le cas des bandes de coton imprégnées, non seulement aucune croissance n'est observée après 24h de contact mais de surcroît aucune colonie bactérienne n'a été retrouvée.

Tableau IV-8 : Croissance bactérienne et activité antibactérienne

		Concentration surfacique Ag@SiO ₂ (mg/100 cm ²)	Croissance	Activité
Bandes coton fonctionnalisées avec	Ag@SiO₂ (3% Ag)	0,79±8,50%	-4,32	7,08
		0,59±10,59%	-4,34	7,10
	Ag@SiO₂ (6% Ag)	0,63±0,81%	-4,45	7,21
		0,49±9,90%	-4,28	7,04
Témoin bande coton neutre		0	2,76 (valeur de F)	-

Les nanoparticules Ag@SiO₂ ont donc conservé une bonne activité antibactérienne même après la procédure de greffage sur textile qui les a exposées à une température de 100°C. De même, leur immobilisation sur un support n'a pas altéré leur capacité biocide.

L'activité anti-*Staphylococcus aureus* des bandes en coton imprégnées avec Ag@SiO₂ déterminée en suivant la norme NF EN ISO 20743 (2007) indique qu'elles présentent toutes une forte efficacité (A>7). Ce résultat est très prometteur dans la mesure où la quantité d'argent la plus faible appliquée sur une bande de coton (0,49 mg/100 cm²) est

plus de cinq fois inférieure à celle du pansement commercial fabriqué avec la plus faible concentration d'argent répertorié au Tableau IV-1. De surcroît cette concentration devrait pouvoir encore être minimisée étant donnée la forte activité observée.

IV.4.2.3 Concentration surfacique minimale

L'objectif est de déterminer l'intervalle de concentration surfacique d'argent à partir duquel l'activité antibactérienne est absente. Des bandes de coton ont donc été imprégnées par différentes quantités de nanoparticules de types Ag@SiO₂ (3% Ag) et Ag@SiO₂ (6% Ag). Le taux d'argent après imprégnation et lavage a été évalué par voie électrochimique. Les valeurs obtenues sont comme auparavant inférieures aux valeurs théoriques (Tableau IV-9).

Tableau IV-9 : Quantité d'argent contenue dans les textiles d'essai

Bandes de coton fonctionnalisées avec	Concentration surfacique d'argent (mg/100 cm ²)	
	Valeurs théoriques	Mesures électrochimique
Ag@SiO ₂ (3% Ag)	0,2	0,09
	0,08	0,04
	0,04	0,03
Ag@SiO ₂ (6% Ag)	0,2	0,07
	0,08	0,04
	0,04	0,03

A partir des mesures électrochimiques de la quantité d'argent contenue sur les textiles d'essai et du taux d'argent par nanoparticule Ag@SiO₂ (3% Ag) et Ag@SiO₂ (6% Ag) respectivement 2,9 et 5,6%, nous en avons déduit la concentration surfacique de nanoparticules correspondant (Tableau IV-10).

Tableau IV-10 : Quantité de nanoparticules Ag@SiO₂ contenue dans les textiles d'essai

Bandes de coton fonctionnalisées avec	Concentration surfacique Ag@SiO ₂ (mg/100 cm ²)	
	Valeurs théoriques	Mesures électrochimiques
Ag@SiO ₂ (3% Ag)	6,9	3,25
	2,8	1,30
	1,4	0,89
Ag@SiO ₂ (6% Ag)	3,6	1,18
	1,4	0,65
	0,7	0,45

Les bandes de coton imprégnées ainsi caractérisées ont ensuite été mises en contact avec des souches bactériennes *E. coli* et *B. pumilus*. Environ 1 cm² de chaque textile a étéensemencé par 200 µL de suspension bactérienne contenant 10⁹ UFC/mL. Après 3 heures d’incubation à 37 °C, 10 mL de milieu LB est ajouté dans les suspensions. Des aliquotes ont été prises des suspensions préalablement homogénéisées afin de réaliser des dilutions successives. Ces dilutions ont ensuite été de nouveau incubées à 37° C pendant 16 à 20 h.

L’effet bactéricide des textiles est évalué en suivant comme précédemment par lecture de l’absorbance à 600 nm, la formation de colonies dans les aliquotes diluées. Nous rappellerons qu’une D.O_{600 nm} > 0,1 indique une croissance bactériennes et donc des bactéries viables dans les aliquotes qui ont été diluées et qu’inversement une D.O_{600 nm} < 0,1 indique une inhibition de la croissance et donc pas de bactéries viables dans les aliquotes qui ont été diluées.

Les résultats des tests anti-*E. Coli* des textiles imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (3% Ag) sont représentés sur la Figure IV-6 et ceux imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (6% Ag) sur la Figure IV-7.

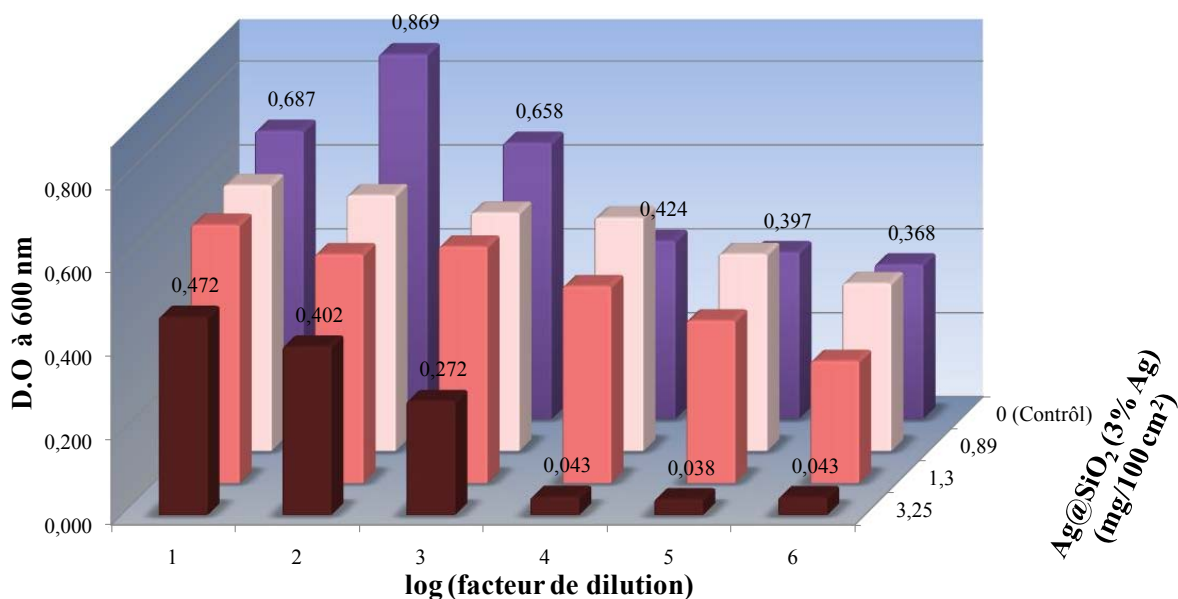


Figure IV-6 : Effet anti-*E. coli* des textiles imprégnés par Ag@SiO₂ (3% Ag). Variation de la concentration surfacique

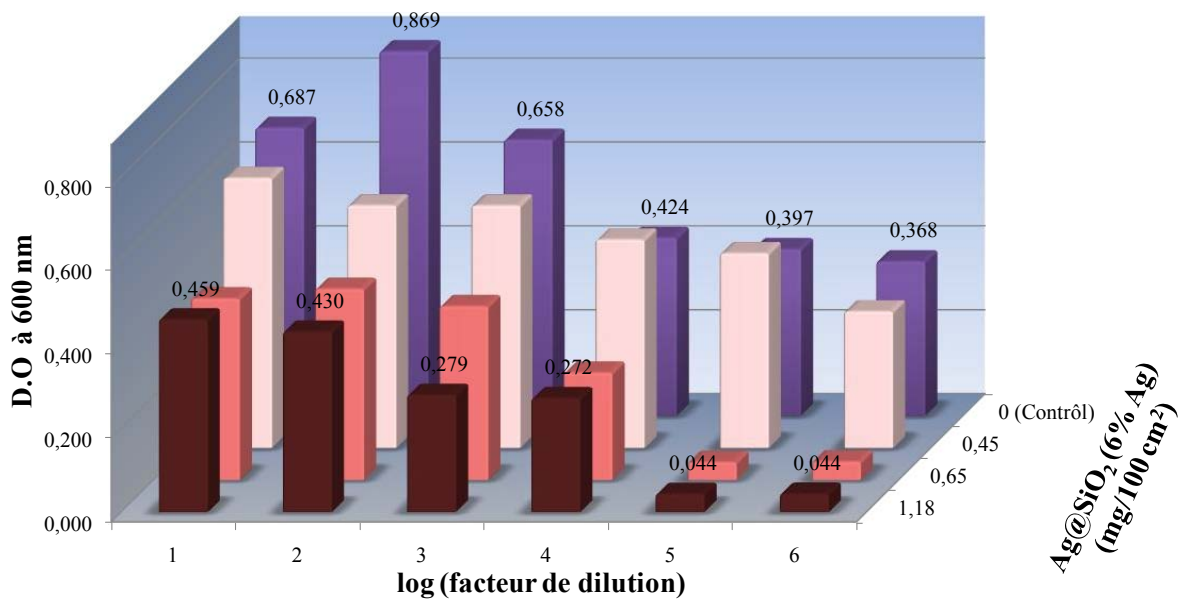


Figure IV-7 : Effet anti *E. coli* des textiles imprégnés par Ag@SiO₂ (6% Ag). Variation de la concentration surfacique

Le degré de l'effet bactéricide est corrélé à la quantité d'argent greffée sur le textile. En effet plus le facteur de dilution pour qu'il n'y ait plus de croissance bactérienne est faible c'est-à-dire une D.O_{600 nm} < 0,1 plus le textile imprégné qui a été en contact avec ces bactéries à un fort effet bactéricide.

Les textiles imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (3% Ag) n'exhibent plus d'efficacité notable au-delà de 3,25 mg/100cm² alors que ceux imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (6% Ag) le sont encore à 0,65mg/100cm². Cela confirme le caractère antibactérien plus marqué lorsque le taux d'Ag par bille de silice est augmenté, comme pouvait le suggérer la légère différence d'activité dans les tests préliminaires de turbidité.

Les résultats des tests anti-*B. pumilus* des textiles imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (3% Ag) sont représentés sur la Figure IV-8 et ceux imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (6% Ag) sur la Figure IV-9.

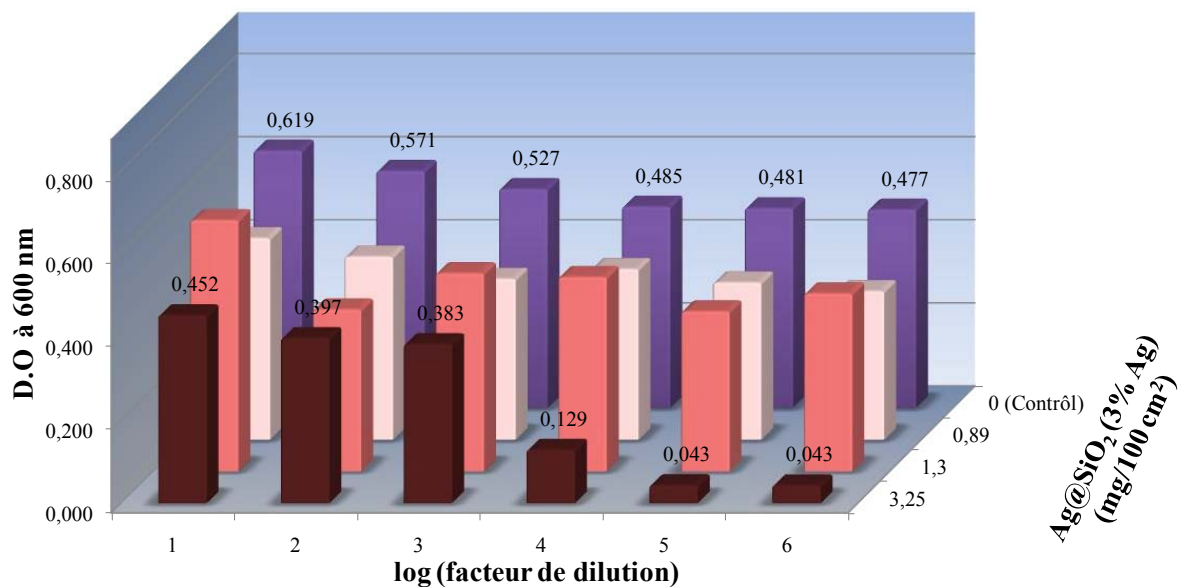


Figure IV-8 : Effet anti- *B. pumilus* des textiles imprégnés par Ag@SiO₂ (3% Ag). Variation de la concentration surfacique

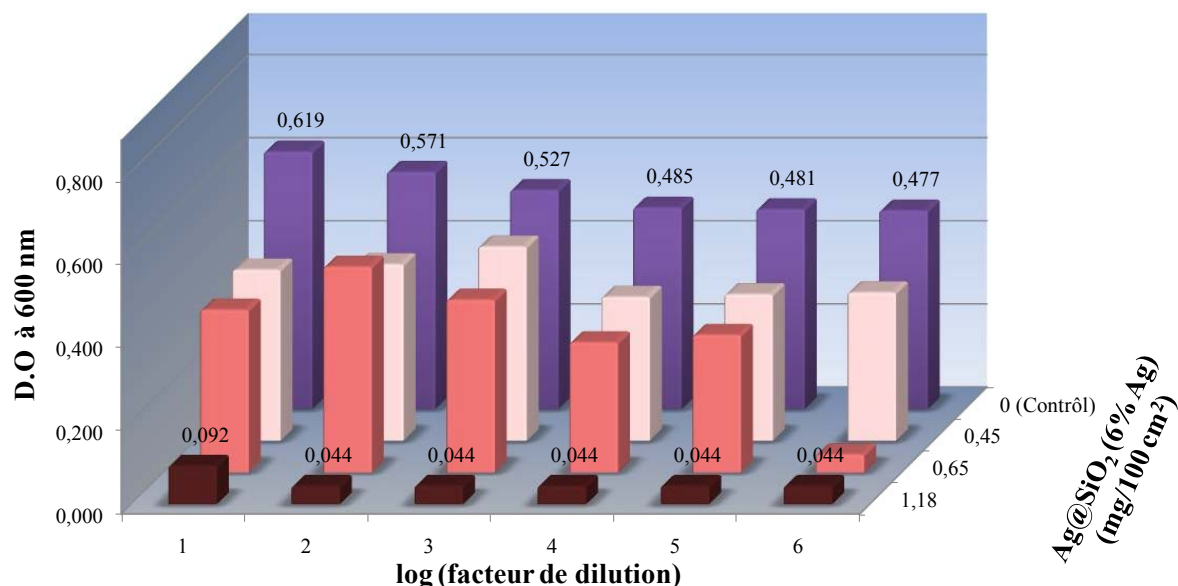


Figure IV-9 : Effet anti- *B. pumilus* des textiles imprégnés par Ag@SiO₂ (6% Ag). Variation de la concentration surfacique

Comme dans le cas de la souche *E. coli*, les textiles imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (3% Ag) n'exhibent plus d'efficacité notable au-delà de 3,25 mg/100cm² alors que ceux imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (6% Ag) manifeste encore une activité anti-*B. pumilus* à 0,65 mg/100 cm². Cela confirme à nouveau le caractère antibactérien plus marqué lorsque le taux d'Ag par bille de silice est augmenté.

De plus, à 1,18mg/100cm², aucun développement bactérien n'a été observé dans les aliquotes diluées contenant les bactéries qui ont été en contacts avec les textiles imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (6% Ag). Ce résultat est un fait inattendu car à cette

concentration, les textiles imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (6% Ag) ont eu une activité antibactérienne plus faible envers la souche gram-négative E. coli alors que les bactéries Gram-positives sont en générale plus résistante.

Au vu des résultats des tests antibactériens, l'intervalle de concentration surfacique de nanoparticules Ag@SiO₂ pour que le textile imprégné avec les nanoparticules présente une activité antibactérienne notable est comprise entre 1,18 et 0,65 mg/100 cm² pour les nanoparticules Ag@SiO₂ (6% Ag) et 3,25 et 1,3 mg/100 cm² pour Ag@SiO₂ (3% Ag), ce qui correspond à une concentration surfacique d'argent comprise entre 0,09 et 0,04 mg/100 cm² (Tableau IV-9). Cette étude nous a de plus montré que ces intervalles sont les mêmes quel que soit le type de souches gram-positif ou gram-négatif. Ce résultat est d'autant plus intéressant dans l'objectif d'obtenir un antibactérien à large spectre.

IV.4.2.4 Conditions de libération des ions Ag⁺ par Ag@SiO₂

L'inhibition de la croissance bactérienne qui a été observée lorsque les nanoparticules Ag@SiO₂ ont été introduites dans le milieu de culture LB est due à l'action des ions Ag⁺ produites par ces dernières. Cela implique qu'une oxydation des noyaux métalliques encapsulés dans la matrice de silice s'est produite.

Pour tenter de comprendre le mécanisme de relargage des ions Ag⁺ par Ag@SiO₂, la cinétique de libération des ions Ag⁺ dans l'eau distillée a été suivie par voie électrochimique. De façon surprenante, la concentration en ion Ag⁺ est demeurée très faible et relativement constante (Tableau IV-11). Dans l'eau les nanoparticules Ag@SiO₂ ne génèrent donc pratiquement pas d'ions Ag⁺.

Tableau IV-11 : Cinétique de diffusion des ions Ag⁺ par Ag@SiO₂ (6% Ag)

Masse Ag@SiO ₂ (mg)		100
Volume H ₂ O (ml)		100
Masse Ag (mg)		5,8
[Ag ⁺] théorique (ppm)		58
[Ag ⁺] mesurée (ppm)	t ₀	0,08
	t ₀ +15 Jours	0,09
	t ₀ +2 mois	0,09

Ce même type de résultat a également été observé lorsque la cinétique de libération dans l'eau distillée des ions Ag⁺ à partir de textile imprégné avec les nanoparticules Ag@SiO₂ (6% Ag) a été suivie par voie électrochimique.

D'après les résultats rapportés dans la littérature, dans le milieu de culture LB, l'oxydation des noyaux métalliques des nanoparticules Ag@SiO₂ serait vraisemblablement causée par les différents sels et peptides que contient le milieu de culture LB ⁽¹⁵²⁾.

Ainsi dans la perspective de les utiliser comme revêtement antibactérien, les nanoparticules Ag@SiO₂ devraient être susceptibles de libérer de façon dynamique un taux d'ions Ag⁺ suffisamment toxique pour les bactéries, tout en limitant le relargage incontrôlée comme ce serait le cas pour les sels d'argent facilement solubles.

IV.4.3 Nature du greffage et tenue au lavage

L'évaluation de la solidité de l'interaction entre les nanoparticules Ag@SiO₂ et la fibre cellulosique de coton constitue une information précieuse dans l'optique de l'utilisation du textile dans le but de prévenir les risques de contamination ou de diminution d'efficacité liés aux phénomènes de décrochage. Ainsi nous avons étudié la nature du greffage entre le coton et les nanoparticules Ag@SiO₂ utilisées précédemment présentant en surface des groupements de type OH ou NH₂, dans le cas d'une fonctionnalisation par l'APTES. Ces deux types de fonctions sont en effet susceptibles d'établir des liaisons de type hydrogène avec les groupements hydroxyle de la cellulose. Dans le cas des nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂, il nous a semblé d'autant plus intéressant d'étudier leur interaction avec le coton dans la mesure où il a été montré que les celluloses peuvent réagir, dans certaines conditions, avec des composés aminés notamment de type organosilanes. La tenue au lavage des nanoparticules accrochées à aussi été étudiée.

IV.4.3.1 Nature du greffage

La cellulose est un polymère linéaire, constitué d'un enchaînement de monomères de D-glucose (Figure IV-10). Sa réactivité provient des deux groupements hydroxyle en positions 2 et 3 et des groupements hydroxyle en position 6 ⁽¹⁶⁵⁾. Dans une moindre mesure la cellulose peut réagir via des fonctions aldéhydes terminales.

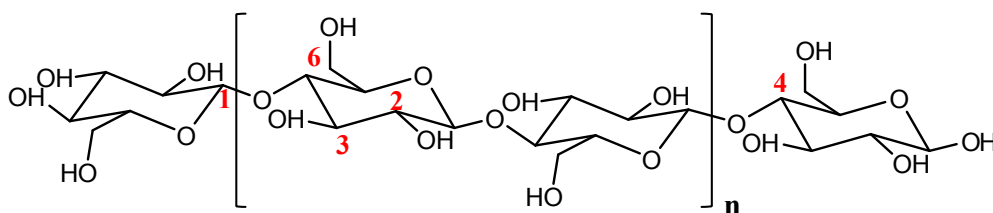


Figure IV-10 : Structure moléculaire de la cellulose

La nature du greffage des nanoparticules sur la fibre cellulosique a dans un premier temps été caractérisée par infrarouge en réflexion diffuse (Figure IV-11).

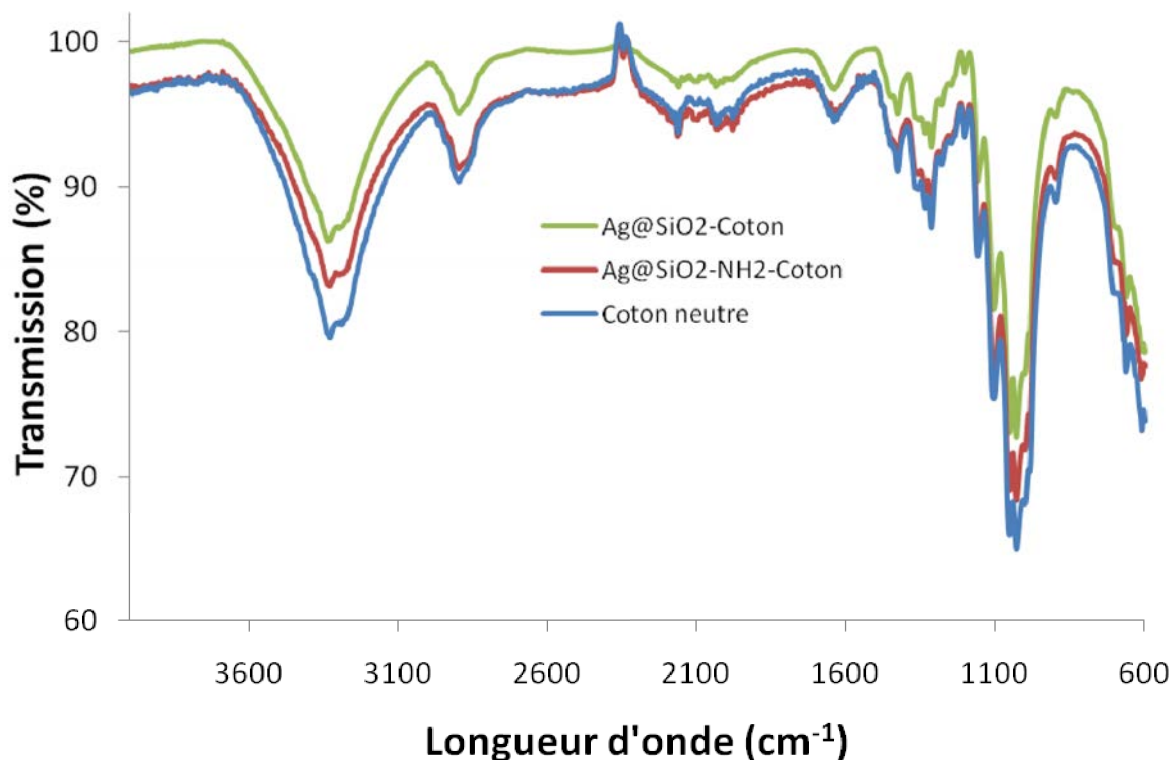


Figure IV-11 : Spectres Infrarouge de coton fonctionnalisé par des nanoparticules Ag@SiO₂ aminées ou non

Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure quant à la nature du greffage. En effet, les spectres effectués à partir des textiles en coton imprégnés avec les deux types de nanoparticules sont identiques à celui du coton initial. Ces observations peuvent se justifier par un taux de greffage trop faible par rapport à la masse de coton pour être détecté par cette technique. Cela a pour conséquence une dilution de l'information relative aux fonctions présentes à la surface.

Bien que ce type de caractérisation ne donne pas des résultats probants, nous pouvons raisonnablement supposer qu'il s'établit des liaisons de type liaisons hydrogène entre les groupements alcools de la cellulose et silanols (Si-OH) des nanoparticules comme cela a déjà été suggéré dans la littérature ⁽¹⁶⁶⁾.

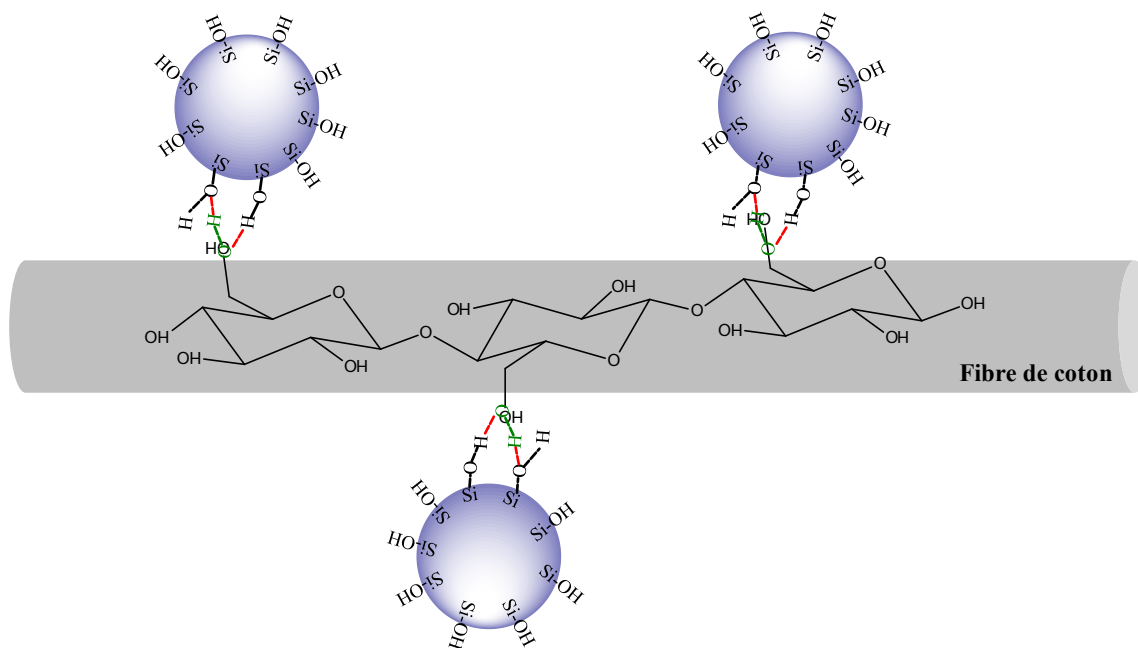


Figure IV-12 : Hypothèse du mécanisme d'interaction entre les groupes OH de la cellulose et les groupements Si-OH de la surface des nanoparticules Ag@SiO₂ ⁽¹⁶⁶⁾

Dans le cas du coton imprégné avec les nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂, l'analyse complémentaire effectuée par spectroscopie de fluorescence a permis de mettre en évidence une émission de fluorescence vers 420 et 444 nm lorsque les produits ont été excités à 350 nm (Figure IV-13). L'apparition de ce phénomène d'émission, qui n'est pas observée sur le coton neutre indiquerait que les amines en surface des nanoparticules ont effectivement réagi avec des groupements aldéhyde présents dans la cellulose pour former des imines conjuguées appelées bases de Schiff.

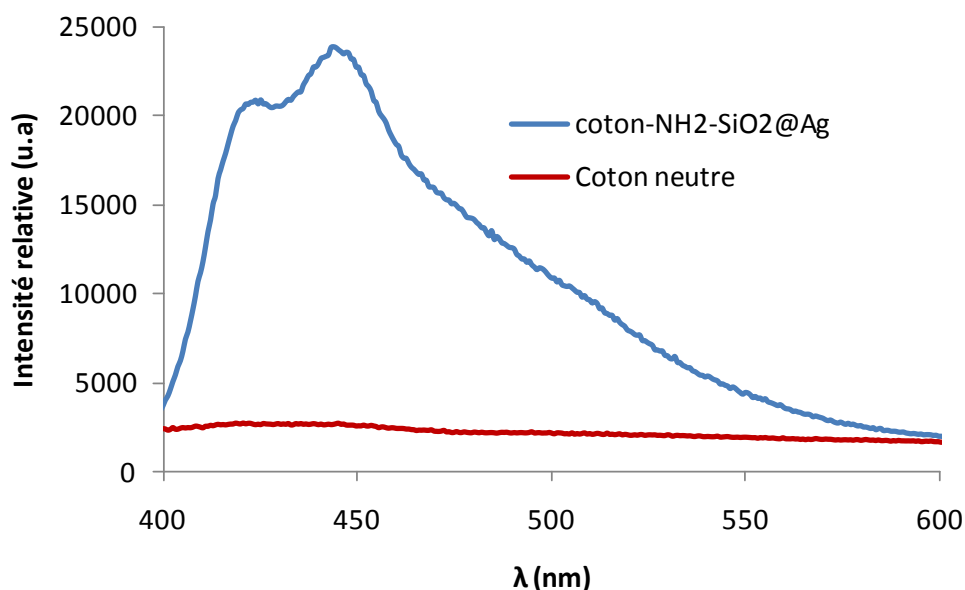


Figure IV-13 : Spectre de fluorescence du coton neutre et du coton imprégné avec des nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂. (λ_{Exc} 350 nm)

Notre hypothèse s’appuie sur un résultat similaire obtenu par greffage de composés aminés sur de la cellulose⁽¹⁶⁷⁾. Il semble donc possible d’établir entre les nanoparticules aminées et la fibre cellulosique une liaison covalente.

IV.4.3.2 Tenue au lavage

Nous avons fait subir à des textiles imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂ et Ag@SiO₂-NH₂ une dizaine de lavages répétitifs selon la norme ISO 105-C10 : 2006. Cela correspond à cinquante lavages maison⁽¹⁶⁸⁾.

Chaque type de textile a été placé dans un ballon. Une solution de détergent (norme 648/2004/EC) est ensuite introduite dans le bain de lavage avec un rapport de bain de 50/1(v/v). Le mélange est ensuite porté à 40-50°C sous vive agitation. Le cycle de lavage a eu une durée d’une heure. Après chaque lavage, les textiles ont été rincés à grande eau et séchés à température ambiante.

L’analyse élémentaire a été employée pour quantifier la quantité d’argent en fonction du nombre de lavages.

Tableau IV-12 : Mesure par ICP des quantités d’Ag⁺ contenues dans les textiles imprégnés respectivement avec Ag@SiO₂ (6% Ag) et Ag@SiO₂-NH₂ (5% Ag) en fonction du nombre de lavage

Bandes de coton fonctionnalisées avec	Nombre de lavage	Concentration surfacique d’Ag ⁺ (mg/100 cm ²)	Concentration surfacique d’Ag@SiO ₂ (mg/100 cm ²)
Ag@SiO ₂ (6% Ag)	0	0,17	3,06
	1	0,05	0,87
	10	0,04	0,68
Ag@SiO ₂ -NH ₂ (5% Ag)	0	0,21	4,11
	1	0,08	1,59
	10	0,04	0,74

D’après les résultats obtenus (Tableau IV-12), nous observons un important décrochage des nanoparticules lors du premier lavage (cinq lavage maison), de l’ordre de 71% pour le textile imprégné avec les nanoparticules Ag@SiO₂ et 61% pour celui imprégné avec les nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂. Ce taux de perte élevé peut s’expliquer par une quantité initiale de nanoparticules trop importante pour être toute accrochées sur le coton. En effet, lorsque trop de nanoparticules sont introduite dans le bain de teinture les nanoparticules ont tendances à s’accrocher en grappe plutôt que de se greffer sur le coton (Figure IV-14)

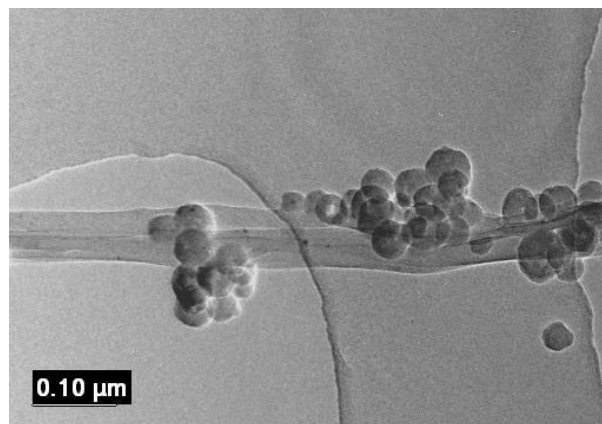


Figure IV-14 : Micrographie MET du coton imprégné avec Ag@SiO₂

Entre le 1^{er} et le 10^{ème} lavage (5^{ème} et 50^{ème} lavage maison) la quantité d'argent perdue est de 22% pour le textile imprégné avec les nanoparticules Ag@SiO₂ et de 53% pour celui imprégné avec les nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂.

Ce résultat est imprévu car nous nous attendions à avoir une meilleure tenue au lavage des textiles imprégnés avec les nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂ étant donné le caractère covalent du greffage. Néanmoins, dans l'ensemble, la solidité au lavage est très convenable par rapport aux divers produits existants⁽¹⁶⁹⁾.

A l'issue de cette étude nous avons souhaité évaluer la possibilité de greffage sur un deuxième type de matériaux présent dans le domaine médicale.

IV.5 Greffage des nanoparticules antibactériennes sur des fibres de polyéthylène téréphtalate (PET)

L'autre type de matériau auquel il serait intéressant de conférer un caractère antibactérien est les fibres de polyéthylène téréphtalate (PET). Ce polymère est un polyester semi-cristallin (Figure IV-15), thermoplastique, couramment utilisé dans l'industrie textile et automobile, les emballages, les membranes de filtration ainsi que dans le domaine biomédical.

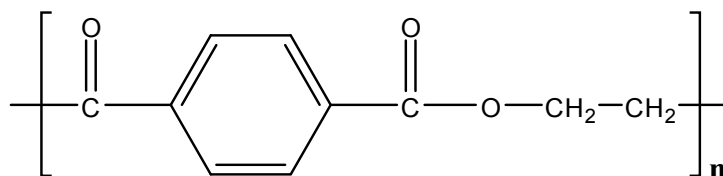


Figure IV-15: Unité de répétition du PET

L'immobilisation de molécules bioactives sur des fibres PET déboucherait sur un large éventail d'applications car ce type de fibre est utilisé en particulier pour la fabrication de dispositifs biomédicaux à risque tels que les cathéters, les sondes, les prothèses et les implants.

IV.5.1 Procédure de greffage des nanoparticules.

Les nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂ ont été greffées sur les fibres de PET selon une procédure similaire à celle utilisée pour la bande de coton. Le mélange eau/nanoparticules dans lequel des fibres de PET sont ajoutées est mis sous agitation avec un palier de température d'une heure à 70°C. Les fibres sont ensuite retirées, lavées à grande eau puis séchées à l'air libre.

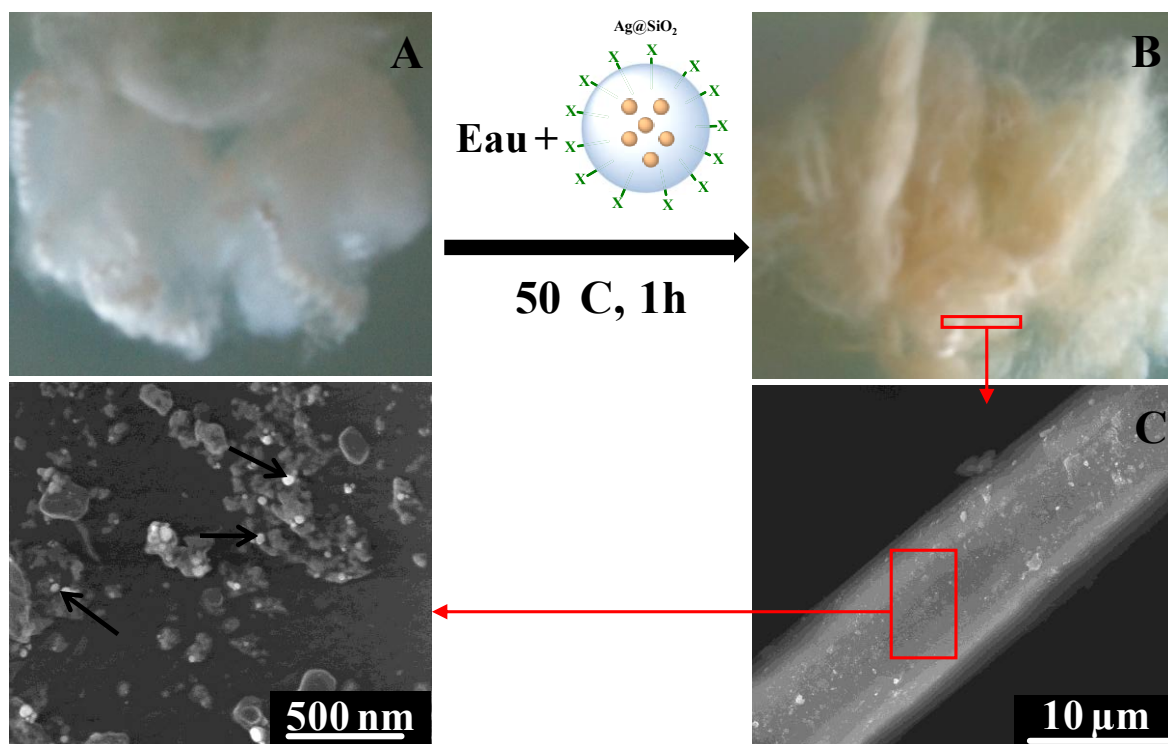


Figure IV-16 : Schéma de la procédure de greffage des nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂ sur les fibres de PET. A) PET neutre, B) PET imprégné, C) micrographie prise en microscopie électronique à balayage.

Le greffage des nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂ sur le PET est rendue possible via une réaction d'aminolyse ⁽¹⁷⁰⁾ qui conduit à la formation de liaisons amides entre les nanoparticules et la fibre par rupture de chaîne polymérique comme illustrée par le schéma de la Figure IV-17.

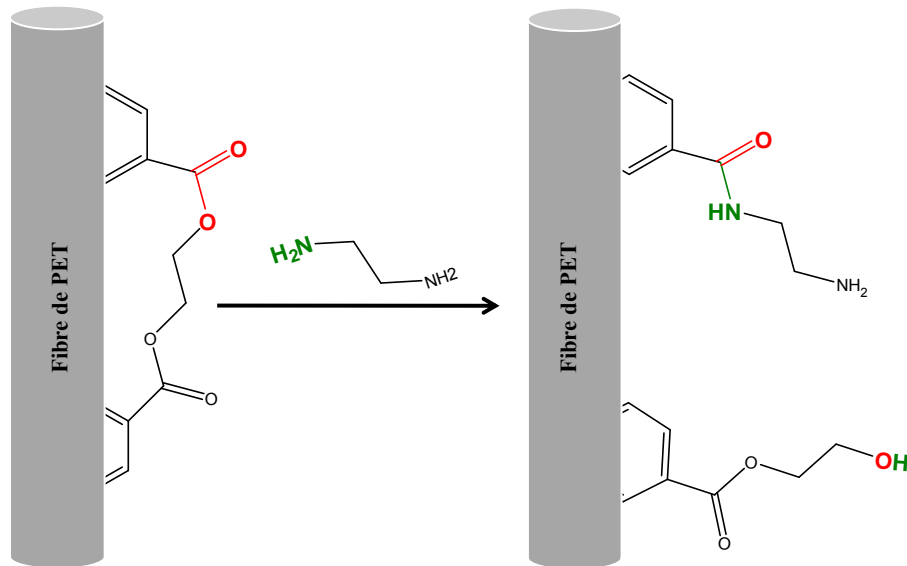


Figure IV-17 : Fonctionnalisation de surface du PET avec le 1,2-éthylènediamine ⁽¹⁷⁰⁾.

Des tests antibactériens préliminaires selon la Norme ISO 22196 : 2007 ont pu être réalisés. Ils ont révélé un caractère bactériostatique lorsque la concentration massique de nanoparticules par unité de masse de PET est égale à 3,8 mg/g. Des tests plus poussés sur la solidité du greffage et la détermination de la concentration minimale inhibitrice sont actuellement en projet.

IV.6 Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons pu valider le potentiel antibactérien des nanoparticules Ag@SiO₂ en évaluant systématiquement les effets bactéricides sur quatre types de bactéries gram-positives et gram-négatives, en particulier sur la souche *S. aureus* très résistante aux antibiotiques et cause fréquente des maladies nosocomiales.

Les nanoparticules sous forme colloïdale se sont montrées capables de tuer les bactéries avec une efficacité comparable à celle des ions argent en solution. Leur caractère antibactérien peut être modulé par variation de la quantité d'argent incorporé dans la silice. La procédure de greffage de nanoparticules sur une bande en coton médicale a ensuite permis de manière rentable d'obtenir un textile présentant à nouveau des propriétés antibactériennes très intéressantes.

Sous forme de suspension colloïdale ou de revêtement antibactérien, ces nanoparticules de silice contenant des nano-objets d'argent se présentent donc comme une alternative prometteuse à l'actuelle technologie impliquant des matériaux contenant de l'argent. A ces propriétés antibactériennes, pourra s'ajouter une application de détection grâce à l'encapsulation conjointe d'agents fluorescents. La maîtrise de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules nous a de surcroît permis d'obtenir des suspensions colloïdales stables. Ce résultat permet d'envisager un large éventail d'applications dans les systèmes biologiques. Un deuxième atout du système que nous avons développé réside dans la capacité des nanoparticules à interagir avec d'autres matériaux comme cela a été le cas avec le coton et le PET. Il devrait donc être possible de les introduire dans d'autres types de matériaux présentant des risques de colonisation bactérienne comme par exemple les claviers d'ordinateurs.

Comme dans toute nouvelle technologie et plus particulièrement lorsqu'elle est en lien direct avec le domaine biomédical, la sécurité de l'environnement, la toxicité et la facilité de fabrication seront des aspects à prendre en considération et à étudier de façon détaillée dans le développement de ce nouvel agent antibactérien.

Conclusion

Notre étude a été initiée par deux constats. D'une part, le système micellaire inverse peut être considéré comme un réacteur individuel parfaitement adapté à la synthèse de nanomatériaux dans la mesure où il assure un contrôle de la taille tout en isolant les objets en croissance les uns des autres. D'autre part, l'encapsulation de molécules ou de nano-objets dans une matrice de silice est décrite dans la littérature comme une piste très attrayante non seulement comme moyen de protection mais également comme une voie d'accès pratique à des nanomatériaux multifonctionnels. Cependant, dans le cas de l'encapsulation de nano-objets métalliques les synthèses manquent de reproductibilité. L'objectif de notre étude était donc de partir d'un système de microémulsion inverse décrit pour la synthèse de nanoparticules de silice fluorescentes pour en développer les potentialités dans le cadre de la conception de nano-objets fonctionnels voire multifonctionnels pour un usage plus particulièrement biomédical. Ainsi, nous avons choisi de mettre à profit l'étude détaillée que nous avons menée sur la synthèse de nanoparticules par microémulsion inverse pour concevoir un agent antibactérien à base d'argent, domaine d'application dans lequel les nanotechnologies sont en plein essor.

Après une première étude dont l'objectif était de comprendre et maîtriser les différents paramètres de notre synthèse en milieu micellaire influant sur la taille et la structure d'une nanoparticule de silice simple, nous avons appliquée cette technique à un système plus complexe. Nous souhaitons alors mettre au point une méthode d'encapsulation la plus souple possible généralisable au plus grand nombre d'espèces d'intérêt. Ainsi, nous avons montré que par cette voie, il est possible d'encapsuler avec succès des espèces moléculaires qu'elles soient hydrophiles ou hydrophobes, fonctionnalisables ou non par un silane ainsi que des nanoparticules. Par simple piégeage ou insertion covalente dans le réseau de polysiloxane, nous avons mis au point des nanoparticules fluorescentes qui présentent une résistance au photoblanchiment plus important que le fluorophore libre ainsi que des nanoparticules de structure cœur@coquille. De surcroit, la possibilité de combiner cœur(s) métallique(s) et fluorophores au sein d'une même nanoparticule ouvre la voie aux nanomatériaux multifonctionnels.

Dans l'objectif de synthétiser de tels nano-objets complexes, nous avons également prouvé qu'il est possible d'enchaîner dans un seul et même « nanoréacteur micellaire » les différentes étapes de conception d'un nano-objet fonctionnel de structure cœur@coquille à savoir, la synthèse du cœur métallique, de la matrice de silice, sa fonctionnalisation de

surface par des groupements réactifs jusqu'au greffage ultérieur d'une entité d'intérêt. L'optimisation de notre synthèse dans cette optique a permis de limiter les étapes intermédiaires de lavage tout en bénéficiant pour toutes les étapes de la présence protectrice de la micelle par rapport à une éventuelle agglomération des objets nanométriques. Les nanoparticules obtenues par cette voie présentent une très bonne stabilité colloïdale dans l'eau et peuvent alors être utilisées dans le cadre d'applications liées au domaine biomédical.

L'ensemble de notre travail de compréhension et d'optimisation de la synthèse de nanoparticules hybrides nous a permis de concevoir un nouvel agent antibactérien nanométrique composé d'une matrice de silice dans laquelle sont encapsulés des cœurs d'argent métallique. Non seulement les nanoparticules argent@silice ont montré une très bonne activité antibactérienne et ce pour des concentrations très faibles en objets mais également une capacité d'exercer un effet antibactérien au cours du temps. Cette propriété particulièrement intéressante est due à la structure cœur@coquille qui permet une libération progressive d'ions argent par oxydation continue du cœur métallique. Ainsi, comme nous l'avions imaginé préalablement à sa mise au point, ce nano-objet argent/silice a effectivement démontré ses capacités de réservoir d'ions argent.

En perspectives, il est tout à fait envisageable de rendre ses nano-objets antibactériens fluorescents par incorporation d'un fluorophore. Ainsi nous pourrions effectuer un suivi du devenir des nano-objets et leur éventuel passage dans l'organisme après mise en contact avec une plaie. Ce type d'étude entre parfaitement dans le cadre de la problématique actuelle d'évaluation de la toxicité des nanomatériaux actifs. Parallèlement, la souplesse de la synthèse permet d'imaginer différentes combinaisons d'objets dans le cadre par exemple de thérapie suivie en imagerie. Ainsi, nous pourrions combiner les propriétés de l'or comme agent de contraste X avec les propriétés cytotoxiques d'un agent photosensibilisant de type porphyrine dans le cadre de la thérapie photodynamique. Enfin, comme l'encapsulation dans une matrice de silice dont la surface peut être fonctionnalisée est un moyen efficace de surmonter d'éventuelles difficultés liées à une insertion de nano-objets dans un réseau ou leur stabilisation dans un milieu bien défini que nécessiteraient certaines applications spécifiques, notre technique de synthèse devrait trouver son utilité dans de nombreux domaines.

Annexes

Annexe A Partie expérimentale

Cette partie détaille les réactions étudiées dans les chapitres précédents. La première partie indique l'origine des réactifs de synthèse. Dans une deuxième partie de ce chapitre seront décrits les modes opératoires de synthèse des nanoparticules. Enfin, toutes les techniques et appareillages d'analyse utilisés au cours de ce travail sont précisés dans la troisième partie.

A.I Origine des réactifs de synthèse

Le Triton X-100, l'hexan-1-ol, le cyclohexane, l'ammoniaque (NH_4OH 28%) le tétraéthoxysilane (TEOS, 99,999%), le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES, 99%), le borohydrure de sodium (NaBH_4 , 98%), le tétrachloroaurate d'hydrogène ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), la fluorescéine isothiocyanate isomère I (FITC, 90%), le nitrate d'argent (AgNO_3 99%) et le sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) sont obtenus auprès d'Aldrich. Le O-(propargyloxy)-N-(triéthoxysilylpropyl) carbamate, (OPNTC 90%), le 3-(triéthoxysilyl)propylsuccinic Anhydride (TESPA, 94%) auprès de ABCR. La Flavine a été fournie par le partenaire industriel.

A.II Synthèses des nanoparticules : Description pour %W = 90,8%

Les nanoparticules ont été préparées en mélangeant dans un pilulier de 30 mL 1,77 mL ($2,9 \cdot 10^{-3}$ mol) de Triton X-100 ; 1,8 mL ($1,4 \cdot 10^{-2}$ mol) de n-hexanol ; 7,5 mL ($6,9 \cdot 10^{-2}$ mol) de cyclohexane. Ensuite les autres réactifs sont ajoutés à ce mélange (M_{90}) sous agitation magnétique à température ambiante selon la nature de la nanoparticule que l'on souhaitera obtenir. Dans la suite des protocoles, le mélange Triton X 100/cyclohexane/hexanol sera noté M_x avec $x = \%W$.

A.II.1 Nanoparticules de silice

0,480 mL ($2,7 \cdot 10^{-2}$ mol) d'eau distillée acidifiée à pH 2 avec HCl et 0,100 mL ($4,5 \cdot 10^{-4}$ mol) de TEOS sont ajoutés au mélange M_{90} . Après 30 mn d'agitation magnétique 0,060 mL ($8,0 \cdot 10^{-4}$ mol) d'ammoniaque sont ajoutés au mélange que l'on laisse une nuit sous agitation. Un équivalent en volume d'éthanol est par la suite additionné au mélange pour rompre l'équilibre de la microémulsion et récupérer les nanoparticules par centrifugation. Elles sont ensuite lavées 4 fois avec de l'éthanol avant d'être laissées à sécher à l'air libre.

Cette étape de récupération et lavage des nanoparticules sera la même pour toutes les synthèses de nanoparticules.

Ce protocole a été appliqué pour des valeurs de %W comprises entre 80 et 96% en gardant constants les rapports de concentration consignés dans le Tableau A-1.

Tableau A-1 : Rapports constants des réactifs sol-gel et des réactifs de la microémulsion

[TEOS]/[H ₂ O]	[TEOS]/[NH ₃]	[Triton X-100]/[hexanol]	[Triton X-100]/[cyclohexane]
0,0155	0,5584	0,2039	0,0421

Pour chaque valeur de %W, la concentration d'eau correspondante est déduite de celle du Triton X-100 qui est conservée égale à 0,249 mol/l. La concentration des autres composants est quant à elle déterminée à partir des rapports présentés dans le Tableau I-8.

A.II.2 Nanoparticules de flavine@SiO₂

La préparation des nanoparticules de flavine@SiO₂ est identique à celle des nanoparticules de silice seule, seule l'eau distillée acidifiée à pH 2 est remplacée par une solution aqueuse acidifiée à pH 2 de flavine (C= 5g/L).

A.II.3 Nanoparticule FITC@SiO₂

Sept solutions distinctes sont préparées en ajoutant au mélange M₉₀ 0,480 mL ($2,7 \cdot 10^{-2}$ mol) d'eau distillée acidifiée à pH 2 avec HCl et 0,080 mL ($3,6 \cdot 10^{-4}$ mol) de TEOS.

Parallèlement autant de solutions APTES-FITC ont été préparées avec des rapports molaire FITC : APTES respectivement de 1:7, 1:14, 1:28, 1:56, 1:113, 1:236, 1:472. Après une agitation de 30 mn 0,021 mL de chaque solution APTES-FITC est ajouté dans chacun des mélanges précédents.

Après 30 mn d'agitation magnétique 0,060 mL ($8,0 \cdot 10^{-4}$ mol) d'ammoniaque (25%) sont ajoutés dans chaque mélange que l'on laisse une nuit sous agitation.

A.II.4 Nanoparticule Au et Ag-DTDTPA@SiO₂

Le mode opératoire est similaire à celui de la silice seule, l'eau distillée acidifiée à pH 2 est remplacée par une solution aqueuse de nanoparticules Au-DTDTPA ou Ag-DTDTPA selon le cas. Les protocoles de synthèse des nanoparticules métallique ont été mis au point au laboratoire LPCML.

A.II.4.1 Nano-objets Au@DTDTPA

200 mg ($5,1 \cdot 10^{-4}$ mol) de H₂AuCl₄·3H₂O sont dissouts avec 60 mL de méthanol dans un ballon monocol de 250 mL. La solution est agitée magnétiquement à température ambiante durant 5 minutes. 40 mL d'une solution aqueuse contenant 256 mg ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mol) de DTDTPA sont ajoutés dans le ballon, puis 1,92 mL d'acide acétique 5 minutes plus tard.

185 mg ($4,9 \cdot 10^{-3}$ mol) de NaBH₄ sont dissouts dans 14 mL d'eau distillée puis la solution obtenue est introduite dans le ballon contenant le mélange H₂AuCl₄/DTDTPA, par fractions d'environ 1 mL. Le changement de couleur (de l'orange foncé au marron/noir) et le dégagement gazeux témoignent de la réduction de Au^{III} en Au⁰.

Le mélange est agité durant 1h00, puis 5 mL d'une solution de HCl 1N sont ajoutés. Le mélange est agité à nouveau 15 minutes.

Les nanoparticules Au@DTDTPA obtenues sont ensuite filtrées sous vide, en utilisant une membrane Osmonics en nylon de 0,2 µm de porosité. Elles sont lavées plusieurs fois avec de l'éthanol et de l'acétone. La poudre noire obtenue est séchée durant au moins une heure

sous pression réduite avant d'être récupérée et redispersée dans de l'eau distillée à une concentration d'environ 5g/L.

A.II.4.2 Nano-objets Ag@DTDTPA

Le mode opératoire est similaire à celui des nanoparticules Au-DTDTPA. Le sel d'or a été remplacé par 85 mg ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mol) d'un sel d'argent, AgNO_3 .

A.II.5 Nanoparticule Ag@SiO₂ one pot

A.II.5.1 $C_{\text{Ag}} = 2\text{g/L}$

0,480 mL d'une solution aqueuse contenant 1,5 mg ($8,9 \cdot 10^{-6}$ mol) d' AgNO_3 , 0,021 mL ($9,0 \cdot 10^{-5}$ mol) d'APTES, 0,3 mg ($8,9 \cdot 10^{-6}$ mol) de NaBH_4 et 0,080 mL ($3,6 \cdot 10^{-4}$ mol) de TEOS sont ajoutés à M_{90} . Après 30 mn d'agitation magnétique 0,060 mL ($8,0 \cdot 10^{-4}$ mol) d'ammoniaque sont ajoutés au mélange que l'on laisse sous une nuit d'agitation.

A.II.5.2 $C_{\text{Ag}} = 4\text{g/L}$

Pour $C_{\text{Ag}} = 4\text{g/L}$ les quantités d' AgNO_3 et de NaBH_4 ont été multipliées par deux.

A.II.6 Nanoparticule Au@SiO₂

Le mode opératoire est similaire à celui des nanoparticules Ag@SiO₂. 0,480 mL d'une solution aqueuse contenant 3,8 mg ($4,9 \cdot 10^{-6}$ mol) de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,021 mL ($9,0 \cdot 10^{-5}$ mol) d'APTES, 0,6 mg ($1,5 \cdot 10^{-5}$ mol) de NaBH_4 et 0,080 mL ($3,6 \cdot 10^{-4}$ mol) de TEOS sont ajoutés au mélange M_{90} . Après 30 mn d'agitation magnétique 0,060 mL ($8,0 \cdot 10^{-4}$ mol) d'ammoniaque sont ajoutés au mélange que l'on laisse une nuit sous agitation.

A.II.7 Nanoparticule Ag-FITC@SiO₂ et Au-FITC@SiO₂

Le mode opératoire est similaire respectivement à celui des nanoparticules Ag@SiO₂ et Au@SiO₂. Le volume d'APTES est remplacé par un volume équivalent d'une solution APTES-FITC de rapport molaire FITC:APTES 1:113.

A.II.8 Nanoparticule Ag@SiO₂-NH₂ et Ag@SiO₂-COOH

0,480 mL d'une solution aqueuse d' AgNO_3 de concentration massique d'argent égale à 4g/L, 0,021 mL ($9,0 \cdot 10^{-5}$ mol) d'APTES, 0,7 mg ($1,8 \cdot 10^{-5}$ mol) de NaBH_4 et 0,060 mL ($2,7 \cdot 10^{-4}$ mol) de TEOS sont ajoutés au mélange M_{90} . Après 30 mn d'agitation magnétique 0,060 mL ($8,0 \cdot 10^{-4}$ mol) d'ammoniaque sont ajoutés au mélange que l'on laisse une nuit sous agitation. Puis les silanes respectifs sont ajoutés, soit 0,021 mL ($9,0 \cdot 10^{-5}$ mol)

d'APTES pour former les nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂, ou 0,027 mL ($9,0 \cdot 10^{-5}$ mol) de TESPA pour former les nanoparticules Ag@SiO₂-COOH. Le mélange réactionnel est agité pendant 24h.

A.II.9 Nanoparticule Au@SiO₂-NH₂ et Au@SiO₂-COOH

Le mode opératoire est similaire respectivement à celui Ag@SiO₂-NH₂ et Ag@SiO₂-COOH. 0,480 mL d'une solution aqueuse de HAuCl₄, 3H₂O de concentration massique d'or égale à 4g/L, 0,021 mL ($9,0 \cdot 10^{-5}$ mol) d'APTES, 1,1 mg ($2,9 \cdot 10^{-5}$ mol) de NaBH₄ et 0,080 mL ($3,6 \cdot 10^{-4}$ mol) de TEOS sont ajoutés au mélange M₉₀. Après 30 mn d'agitation magnétique 0,060 mL ($8,0 \cdot 10^{-4}$ mol) d'ammoniaque sont ajoutés au mélange que l'on laisse une nuit sous agitation. Puis les silanes respectifs sont ajoutés, soit 0,021 mL ($9,0 \cdot 10^{-5}$ mol) d'APTES pour former les nanoparticules Ag@SiO₂-NH₂, ou 0,027 mL ($9,0 \cdot 10^{-5}$ mol) de TESPA pour former les nanoparticules Ag@SiO₂-COOH. Le mélange réactionnel est de nouveau agité pendant 24h.

A.II.10 Nanoparticule Ag@SiO₂-FITC fonctionnalisée par un MPEG par click chemistry

Le protocole de fonctionnalisation des nanoparticules Ag@SiO₂-FITC, par le PEG par click chemistry consiste à synthétiser préalablement le PEG-N₃ puis à réaliser la réaction de click chemistry dans la microémulsion inverse contenant les nanoparticules Ag@SiO₂-FITC fonctionnalisées avec des alcynes.

A.II.10.1 Modification du MPEG par une fonction terminale azoture

Le MPEG est préalablement séché à 78 °C sous argon par distillation azéotropique avec du toluène qui est ensuite évaporé sous vide. 10 g ($18 \cdot 10^{-3}$ mol) de MPEG séché sont mis en solution dans 150 mL de THF anhydre avec 4,9 g ($36 \cdot 10^{-3}$ mol) de la triéthylamine. Le mélange réactionnel est plongé dans un bain de glace pendant 15 minutes avant que 2,8 mL ($36 \cdot 10^{-3}$ mol) de chlorure de méthanesulfonyle n'y soit ajouté goutte à goutte. La synthèse est poursuivie à température ambiante pendant 24 heures puis purifiée par filtration. Le THF est évaporé sous vide. L'huile jaune obtenue est solubilisée dans 50 mL de dichlorométhane puis lavée successivement par des solutions fraîchement préparées d'HCl (2x50 mL ; 1 M), de NaOH (2x50 mL ; 1 M) et de NaCl (2x50 mL ; 1 M). Le

dichlorométhane est ensuite évaporé sous vide. On obtient 11,32 g d'une huile jaune de masse molaire $M = 638 \text{ g/mol}$.

Dans une seconde étape le mésylate de MPEG synthétisé est solubilisé dans 100 mL de DMF en présence de 3,5 g ($53 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$) d'azoture de sodium. La réaction a lieu à $60 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 24 heures et sous protection UV. Le DMF est évaporé sous vide, l'huile brune obtenue est solubilisée dans 50 mL de dichlorométhane et lavée avec une solution fraîchement préparée de NaCl ($2 \times 50 \text{ mL}$; 1 M). Le dichlorométhane est ensuite évaporé sous vide. On obtient 10,24 g d'une huile brune (que l'on protégera des UV) de masse molaire $M = 585 \text{ g/mol}$.

A.II.10.2 Greffage du MPEG-N₃ sur les nanoparticules Ag@SiO₂-FITC par click chemistry

0,480 mL d'une solution aqueuse d'AgNO₃ de concentration massique d'argent égale à 4g/L, 0,021 mL ($9,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$) d'APTES, 0,7 mg ($1,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$) de NaBH₄ et 0,060 mL ($2,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$) de TEOS sont ajoutés au mélange M₉₀. Après 30 mn d'agitation magnétique 0,060 mL ($8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$) d'ammoniaque sont ajoutés au mélange que l'on laisse une nuit sous agitation. Puis 0,031 mL ($9,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$) d'OPNTC pour former les nanoparticules Ag@SiO₂-FITC alcyne. Le mélange réactionnel est de nouveau agité pendant 24h. 0,049 mL ($9,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$) de PEG-N₃ et 1,12 mg ($4,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$) de CuSO₄.5H₂O broyés dans un mortier et 1,07 mg ($5,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$) d'ascorbate de sodium sont ajoutés à la microémulsion.

A.III Techniques expérimentales

A.III.1 Viscosité

Les mesures de viscosité ont été obtenues par le biais d'un Vibro Viscosimètre AND modèle SV10. Les microémulsions inverses ont été préparées directement dans le creuset de mesure selon le protocole décrit à la partie A.II.1 mais en l'absence de TEOS. Toutes les mesures ont été enregistrées à la température de 25°C contrôlée par thermostat.

A.III.2 Diffusion Dynamique de Lumière (DLS)

Les mesures de taille ont été réalisées sur un analyseur de particules Zetasizer, modèle ZS90 (Malvern Instruments) à la température de 25°C . Pour effectuer nos mesures nous avons utilisé des cuves en quartz dans lesquelles nous avons directement préparées 2mL de microémulsions inverses selon le protocole décrit à la partie A.II.1 mais en l'absence de TEOS.

A.III.3 Analyses élémentaire par plasma à couplage inductif (ICP)

Les analyses ICP ont été réalisées au service d'analyse du CNRS à Vernaison ainsi qu'au laboratoire sur un appareil ICP-AES (optique) de la marque Varian, modèle 710-ES. Dans ce dernier cas, le matériel étudié a été minéralisé avec HNO₃ 67%.

A.III.4 Mesures électrochimiques

La quantité d'argent contenue dans les structures Core@Shell Ag@SiO₂ a également été évaluée par voie électrochimique en utilisant un ionomètre (CYBERSCAN 510) combinée avec une tête d'électrode double (ELIT 201) qui va accueillir l'électrode sélective d'ions (ESI) argent (ELIT 8211) et l'électrode de référence (ELIT 002).

A.III.5 Spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouges ont été effectués en réflexion diffuse sur un spectrophotomètre à transformée de Fourier (FT-IR) de la marque Perkin- Elmer, modèle Spectrum 1000.

A.III.6 Spectroscopie UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible ont été réalisés à température ambiante avec un WPA 800 diode array spectrometer. Des cuves en quartz avec une longueur optique de 1 cm ont été utilisées pour toutes les mesures.

A.III.7 Spectroscopie de fluorescence

Les spectres d'émission ont été mesurés à température ambiante en utilisant un spectrophotomètre Hitachi F-2500. Des cuves à quartz avec une longueur optique de 1 cm ont été utilisées pour toutes les mesures.

A.III.8 Microscopies Electroniques

L'utilisation de la microscopie électronique a permis d'obtenir des informations sur la structure, la taille et la morphologie des échantillons analysés.

A.III.8.1 Microscopie à Transmission (MET)

Les clichés ont été obtenus à partir d'un microscope JEOL 2010F opérant à 200 kV. Les échantillons ont été préparés en déposant une goutte de solution (C≈0,5g/L) sur une grille de carbone (200 mesh) qui est ensuite séché à l'air libre.

A.III.8.2 Microscopie à Balayage (MEB)

Les clichés ont été obtenus sur un microscope MEB QUANTA 250 ESEM FEG de chez FEI en mode Low vacuum à 1 Torr de pression. Les échantillons observés sont préparés en déposant quelques fibres textiles sur une pastille recouverte d'un adhésif.

A.III.9 Potentiel ζ

Le potentiel ζ , des nanoparticules fonctionnalisées a été déterminé en utilisant un analyseur de particules Zetasizer, modèle ZS90 (Malvern Instruments) à la température de 25°C.

Les solutions de mesure de concentration égale à 0,1mg/mL sont préparées en dispersant chaque type de nanoparticules dans trois solutions salines (0,01 M de NaCl) de pH différent : une neutre, une acide contenant 10^{-3} M de HCl et une basique contenant 10^{-3} M de NaOH.

La présence du sel permet de rendre les solutions plus conductrices afin de pouvoir effectuer les mesures. Les solutions sont passées aux ultrasons (1 min) avant chaque acquisition et le pH a été relevé avant chaque mesure.

Annexe B Dosage par fluorescence de la quantité de FITC non encapsulée

Le but de l'étude est de déterminer la quantité de FITC non encapsulée dans les nanoparticules donc présente dans les bains de lavage.

Le lavage des nanoparticules consiste à ajouter un équivalent en volume d'éthanol au mélange de microémulsion puis récupérer les nanoparticules par centrifugation. L'étape de lavage est répétée 4 fois. Pour le dosage de la FITC non encapsulée. Les cinq solutions successives de surnageant ont été réunies dans une seule fiole jaugée complétée à 100 mL avec de l'éthanol. Cette solution sera appelée S_{lavage} .

Pour établir la courbe d'étalonnage, nous avons préparé une série de solutions modèles de composition similaire à S_{lavage} soit un mélange équivalent à 11,71 ml de microémulsion complété à 100 mL avec de l'éthanol et dans lequel des quantités connues de FITC ont été introduites. Nous nous sommes placés dans une gamme de concentration très faible en FITC (Absorbance < 0,2) afin de s'affranchir des phénomènes de réabsorption qui empêcherait d'établir une loi de proportionnalité entre la concentration en fluorophore et l'intensité de fluorescence de la solution.

Nous avons enregistré un spectre de fluorescence pour chaque solution étalon de concentration en FITC connue après excitation à 490 nm Figure B-1.

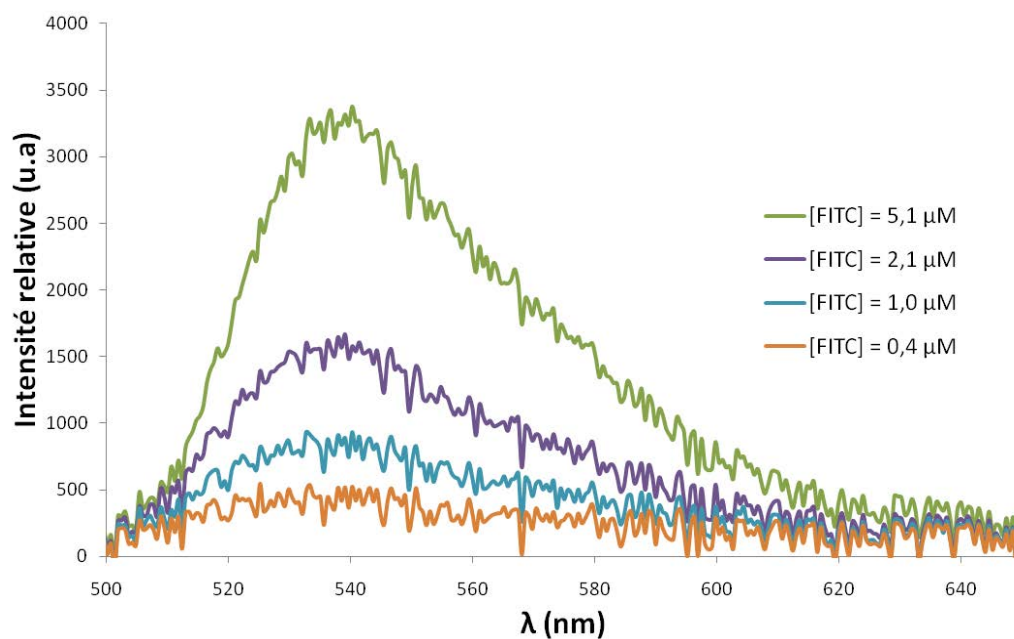


Figure B-1 : Spectres de fluorescence des solutions étalon de FITC dans les conditions de lavage ($\lambda_{exc} = 490\text{nm}$)

La courbe de l'intensité de fluorescence à 538 nm en fonction de la concentration molaire en FITC qui en est déduite (Figure B-2) a ensuite été utilisée comme courbe d'étalonnage.

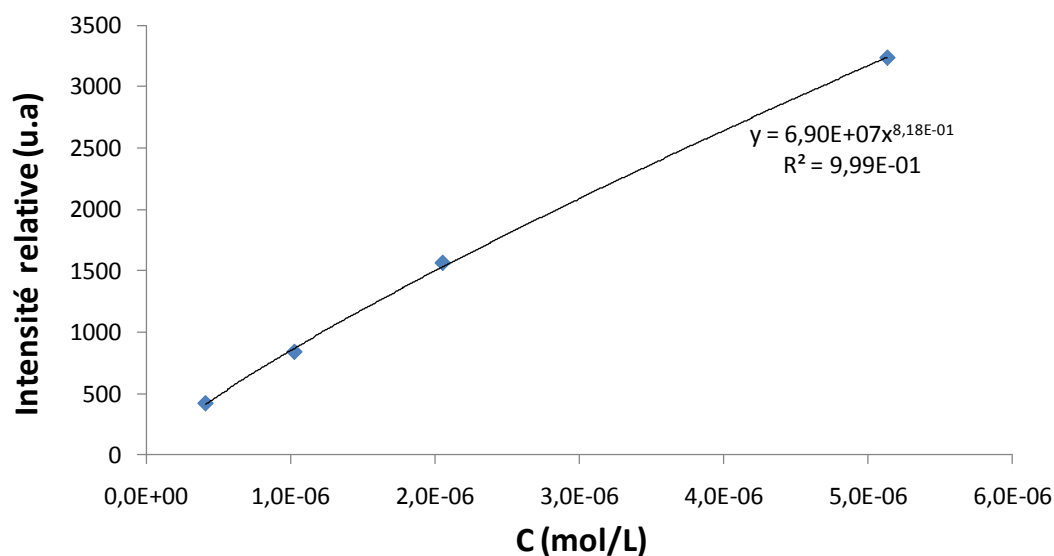


Figure B-2 : Courbe d'étalonnage par fluorescence ($\lambda_{exc} = 490\text{nm}$) de la FITC dans une solution de composition similaire à S_{lavage}

Annexe C Masse d'une nanoparticule FITC@SiO₂ (0,4%)

L'expression de la masse d'une nanoparticule (m_{Np}) est donnée par l'équation :

$$m_{np} = \frac{m_{FITC} + m_{polysiloxane}}{\text{nombre de nanoparticules}}$$

m_{FITC} , la masse de FITC encapsulée est déterminée expérimentalement égale à 0,11 mg.

L'expression de $m_{polysiloxane}$ la masse de la couche de polysiloxane est donnée par :

$$m_{polysiloxane} = (x + y)M_{Si} + \frac{1}{2}(4x+3y)M_O + yM_{H_2NC_3H_6}$$

Avec M_{Si} , M_O et $M_{H_2NC_3H_6}$ respectivement masse molaire du silicium, de l'oxygène et de la chaîne aminopropyle et x et y respectivement nombre de moles de TEOS et d'APTES.

Le nombre de nanoparticules est égal au rapport entre le volume total de polysiloxane ($V_{polysiloxane}$) et le volume d'une nanoparticule (V_{np}). $V_{polysiloxane}$ est déduit de la masse de polysiloxane en prenant comme masse volumique ρ égale à 2g/L

$$V_{polysiloxane} = \frac{m_{polysiloxane}}{\rho}$$

V_{Np} est quant à lui déduit du rayon des nanoparticules mesuré par MET

$$V_{Np} = \frac{4}{3}\pi r^3$$

Les valeurs numériques sont consignées dans le Tableau C-1.

Tableau C-1 : Valeurs numériques de calcul de la masse d'une nanoparticule

% massique FITC par rapport silice (%m_{FITC})	0,4%
Nombre de mole de TEOS (mol)	$3,6.10^{-4}$
Nombre de mole d'APTES (mol)	$9,0.10^{-5}$
Masse de silice (mg)	31,38
Diamètre nanoparticules (nm)	72,0
Volume d'une nanoparticule (nm³)	$1,95.10^5$
volume total de silane (cm³)	$1,57.10^{-2}$
Nombre total de nanoparticules	$8,03.10^{-13}$
masse de FITC encapsulée (mg)	0,11
masse totale FITC@SiO₂ (mg)	31,50
masse d'une particule FITC@SiO₂ (g)	$3,92.10^{-16}$

Annexe D Dosage électrochimique des ions argent

La quantité d'argent contenue dans les structures cœur@coquille Ag@SiO₂ a été quantifiée par voie électrochimique en utilisant un ionomètre (CYBERSCAN 510) combinée avec une tête d'électrode double (ELIT 201) qui va accueillir l'électrode sélective d'ions (ESI) argent (ELIT 8211) et l'électrode de référence (ELIT 002).

Préalablement aux mesures, il est nécessaire d'étalonner l'appareil avec des solutions d'AgNO₃ de concentration connue. Pour cela, une solution d'AgNO₃ 1000 ppm est préparée dans une fiole de 100 ml. Ensuite par dilutions successives sont obtenues des solutions d'AgNO₃ de 100, 10 et 1ppm. Pour équilibrer la force ionique entre les échantillons 2% v/v d'une solution NaNO₃ 5M est ajouté dans chacune des solutions d'étalonnages. Pour se placer dans les mêmes conditions de pH que les échantillons dosés, nous avons ajusté le pH des solutions étalon avec HNO₃.

Pour procéder aux mesures environs 100 mg de nanoparticules ou 1g de textile sont mélangés avec 0,5ml d'acide nitrique HNO₃ (65%). Environ 1 heure après, le mélange est complété jusqu'à 100ml avec de l'eau distillée, dans lesquels 2ml d'une solution NaNO₃ 5M sont rajoutés.

Bibliographie

1. **Manach, Jean-Marc.** Nanotechnologies : ce qui se vend. *Le Monde.fr*. [En ligne] 09 octobre 2009. [Citation : 12 octobre 2009.] http://www.lemonde.fr/technologies/article/2009/10/09/nanotechnologies-ce-qui-se-vend_1251924_651865.html#ens_id=1241569.
2. **Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du travail.** *Les nanomatériaux : Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement*. 2006.
3. **Stöber, W., Fink, A., Bohn, E.** Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres. *J. Colloid Interface Sci.* 1968, Vol. 26, pp. 62-69.
4. **Levy, L., Sahoo, Y., Kim, K.-S., Bergey, E.J., Prasad, P.N.** Nanochemistry: Synthesis and Characterization of Multifunctional Nanoclinics for Biological Applications. *Chem. Mater.* 2002, Vol. 14, p. 3715–3721.
5. **Zhao, X., Bagwe, R. P., Tan, W.** Developement of Organic- Dye-Doped Silica Nanoparticles in a Reverse Microemulsion. *Adv. Mater.* 2004, Vol. 16, pp. 173-176.
6. **Spuch-Calvar, M., Rodríguez-Lorenzo, L., Morales, M. P., Álvarez-Puebla, R. A., Liz-Marzán, L. M.** Bifunctional Nanocomposites with Long-Term Stability as SERS Optical Accumulators for Ultrasensitive Analysis. *J. Phys. Chem. C.* 2009, Vol. 113, pp. 3373-3377 .
7. **Lu, Y., Yin, Y. D., Li, Z. Y., Xia, Y. A.** Synthesis and Self-Assembly of Au@SiO₂ Core-Shell Colloids. *Nano Lett.* 2002, Vol. 2, pp. 785-788.
8. **Corriu, R., Nozières, P., Weisbuch, C.** *Nanosciences et Nanotechnologie*. Paris : TEC & DOC, 2004. p. 34.
9. **Storhoff, J.J., Mirkin, C.A.** Programmed Materials Synthesis with DNA. *Chem. Rev.* 1999, Vol. 99, pp. 1849–1862.
10. **Rosi, N.L., Mirkin, C.A.** Nanostructures in Biodiagnostics. *Chem. Rev.* 2005, Vol. 105, pp. 1547–1562.
11. **Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L., O'Connor, C. J.** Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.* 2004, Vol. 104, pp. 3893-3946.
12. **Gillberg, G., Lehtinen, H., Friberg, S.** NMR and IR Investigation of the Conditions Determining the Stability of Microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 1970, Vol. 33, p. 40.
13. **Schulman, J. H., Stoeckenius, W., Prince, L. M.** Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *J. Phys. Chem.* 1959, Vol. 63, pp. 1677–1680.
14. **Hoar, T. P., Schulman, J. H.** Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro- micelle. *Nature.* 1943, Vol. 152, pp. 102-103.

15. **Salager, J-L., Antóna, R.E., Sabatinib, D. A., Harwellc, J. H., Acostac, E. J., Tolosaa, L. I.** Enhancing Solubilization in Microemulsions—State of the Art and Current Trends. *J. Surfactants and Detergents*. 2005, Vol. 8, pp. 3-21.
16. **Briant, J.** *Phénomènes d'interface, agents de surface: Principes et modes d'action*. Paris : Technip, 1989.
17. **Schulman, J. H., Riley, D. P.** X-ray investigation of the structure of transparent oil-water disperse systems I. *J. Colloid Sci.* 1948, Vol. 3, pp. 383-405.
18. **Kumar, P. B., Satya, P. M.** Microemulsions : An Overview. *J. Dispersion Science And Technology*. 1997, Vol. 18, pp. 301-367 .
19. **Shinoda, K., Hutchinson, E.** Pseudo-phase separation model for thermodynamic calculations on micellar solutions. *J. Phys. Chem.* 1962, Vol. 66, pp. 577-582.
20. **Winsor, P.** *Solvent Properties of Amphiphilic Compounds*. London : Butterworth, 1954.
21. **Paul, B. K. et Moulik, S. P.** Uses and applications of microemulsions. *Current Science*. 2001, Vol. 80, pp. 990 – 1001.
22. **Kumar, P., Mittal, K. L., [éd.]**. *Handbook of microemulsion science and technology*. New York : Marcel Dekker Inc, 1999. p. 15.
23. **Lanteri, P., Bordes, C.** *Formulation des composés siliconés et fluorés*. Essonne : Edp Sciences, 2005. pp. 42-55.
24. **Israelachvili, J. N.** *Intermolecular and Surface Forces*. 2e édition. New York : Academic, 1991.
25. **Tanford, C.** *The Hydrophobic Effect* . New York : Wiley, 1980.
26. **Griffin, W. C.** Classification of Surface-Active Agents by HLB. *J. Soc. Cosmet. Chemists*. 1949, Vol. 1, pp. 311-326.
27. **Griffin, W. C.** Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chemists*. 1954, Vol. 5, pp. 249-256.
28. **Totten, G. E.** *handbook of hydrolic fluid technology*. New York : Marcel Dekker, 2000. p. 855.
29. **Davies, J. T., Rideal, E. K.** *Interfacial Phenomena*. 2e édition. london : Academic Press, 1963. p. 371.
30. **Bancroft, W. D.** The theory of emulsification V. *J. Phys. Chem.* 1913, Vol. 17, pp. 501-519 .
31. **Tiren, Gu., Galera-Gomez, P. A.** The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X-100 in water. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 1999, Vol. 147, pp. 365–370.

32. **Shinoda, K., Saito, H.** The stability of O/W type emulsions as a function of temperature and the HLB of emulsifiers: The emulsification by PIT-method. *J. Colloid Interface Sci.* 1969, Vol. 30, pp. 258–263.
33. **Mitsui, T., Machida, Y., Harusawa, F.** An Application of the Phase-inversion-temperature Method to the Emulsification of Cosmetics. I. Factors Affecting the Phase-inversion Temperature. *Bulletin of the Chemical Society of Japan.* 1970, Vol. 43, pp. 3044-3048.
34. **Anton, N., Gayet, P., Benoit, J-P., Saulnier, P.** Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *Int. J. Pharm.* 2007, Vol. 344, pp. 44–52.
35. **Salager, J-L., Anton, R., Anderez, J. M., Aubry, J-M.** Formulation des microémulsions par la méthode du HLD. *Techniques de l'Ingénieur.* J 2 157.
36. **Bayrak, Y., Iscan, M.** Phase Inversion Temperatures of Triton X-100/1-Butanol/Hydrocarbon/Water Systems. *Journal Of Surfactants And Detergents.* october 2004, 4, pp. 363-366.
37. **Zbu, D. M, Feng, K. I, Schelly, Z. A.** Reverse Micelles of Triton X-100 in Cyclohexane. Effects of Temperature, Water Content, and Salinity on the Aggregation Behavior. *J. Phys. Chem.* 1992, Vol. 96, pp. 2382-2385.
38. **Schwuger, M-J., Stickdornt, K., Schomacker, R.** Microemulsions in Technical Processes. *Chem. Rev.* 1995, Vol. 95, pp. 849-864.
39. **Zulauf, M., Eicke, H-F.** Inverted Micelles and Microemulsions in the Ternary System H₂O/Aerosol-OT/Isooctane. *J. Phys. Chem.* 1979, Vol. 83, pp. 480-486.
40. **Kumar, C., Balasubramanian, D.** Studies on the Triton X-100:Alcohol:Water. *J. Colloid Interface Sci.* 1979, Vol. 69, pp. 271-279.
41. **Jolivet, P.** *De la solution a l'oxyde. Condensation des cations en solutions aqueuse chimie de surface des oxydes.* Paris : EDP Sciences, 1994.
42. **Matsoukas, T., Gulari, E.** Dynamics of growth of silica particles from ammonia-catalyzed hydrolysis of tetra-ethyl-orthosilicate. *J. Colloid Interface Sci.* juillet 1988, Vol. 124, pp. 252–261.
43. **Matsoukas, T., Gulari, E.** Monomer-addition growth with a slow initiation step: a growth model for silica particles from alkoxides. *J. Colloid Interface Sci.* 1989, Vol. 132, pp. 13–21.
44. **Lootens, D.** *Ciments et suspensions concentrées modèles.* Thèse Université Pierre et Marie Curie. 2004. p. 119.
45. **Bogush, G. H., Zukoski, C. F.** Studies of the kinetics of the precipitation of uniform silica particles through the hydrolysis and condensation of silicon alkoxides. *J. Colloid Interface Sci.* 1991, Vol. 142, pp. 1–18.

46. **van Blaaderen, A., van Geest, J., Vrij, A.** Monodisperse Colloidal Silica Spheres from Tetraalkoxysilanes: Particle Formation and Growth Mechanism. *J. Colloid Interface Sci.* 1992, Vol. 154, pp. 481-501.
47. **van Blaaderen, A., Kentgens, A. P. M.** Particle morphology and chemical microstructure of colloidal silica spheres made from alkoxysilanes. *J. Non-Cryst. Solids.* 1992, Vol. 149, pp. 161-178.
48. **Harris, M. T., Brunson, R. R., Byers, C. H.** The base-catalyzed hydrolysis and condensation reactions of dilute and concentrated TEOS solutions. *J. Non-Cryst. Solids.* 1990, Vol. 121, pp. 397-403.
49. **Harris, M.T.** *Ultrafine Precursor Powders by Homogenous Precipitation and Electrodispersion.* Ph.D. dissertation, Univ. of Tennessee. 1992.
50. **Boukari, H., Long, G. G., Harris, M. T.** Polydispersity during the Formation and Growth of the Stöber Silica Particles from Small-Angle X-Ray Scattering Measurements. *J. Colloid Interface Sci.* 2000, Vol. 229, pp. 129-139 .
51. **Giesche, H.** Synthesis of Monodispersed Silica Powders I. Particle Properties and Reaction Kinetics. *J. Eur. Ceram. Soc.* 1994, Vol. 14, pp. 189-204.
52. **Boukari, H., Lin, J. S., Harris, M. T.** Small-Angle X-Ray Scattering Study of the Formation of Colloidal Silica Particles from Alkoxides: Primary Particles or Not? *J. Colloid Interface Sci.* 1997, Vol. 194, pp. 311-318 .
53. **Giesche, H.** Synthesis of Monodispersed Silica Powders II. Controlled Growth Reaction and Continuous Production Process. *J. Eur. Ceram. Soc.* 1994, Vol. 14, pp. 205-214.
54. **Capek, I.** Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w / o) microemulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2004, Vol. 110, pp. 49-74.
55. **Pileni, M. P.** Reverse Micelles as Microreactors. *J. Phys. Chem.* 1993, Vol. 97, pp. 6961-6973.
56. **Osseo-Asare, K., Arriagada, F. J.** Preparation of SiO₂ Nanoparticles in a Non-Ionic Reverse Micellar System. *Colloids Surf.* 1990, Vol. 50, pp. 321-339.
57. **Pileni, M-P., Zemb, T., Petit, C.** Solubilization by reverse micelles solute localization and struture perturbation. *Chem. Phys. Lett.* 1985, Vol. 118, pp. 414-420.
58. **Sharma, P., Brown, S., Varshney, M., Moudgil, B.** Surfactant-Mediated Fabrication of Optical Nanoprobes. *Adv Polym Sci.* 2008, Vol. 218, pp. 189-233.
59. **Bagwe, R. P., Yang, C., Hilliard, L. R., Tan, W.** Optimization of dye-doped silica nanoparticles prepared using a reverse microemulsion method. *Langmuir.* 2004, Vol. 20, pp. 8336-8342.
60. **Egan, R. W., Jones, M. A., Lehninger, A. L.** Hydrophile-Lipophile Balance and Critical Micelle Concentration as Key Factors Influencing Surfactant Disruption of Mitochondrial Membranes. *J. Biol. Chem.* 1976, Vol. 251, pp. 4442-4447.

61. **Karp, G.** *Biologie cellulaire et moléculaire*. 2e édition. Paris : De Boeck, 2004.
62. **Kaushik, P., Vaidya, S., Ahmad, T., Ganguli, A. K.** Optimizing the hydrodynamic radii and polydispersity of reverse micelles in the Triton X-100/water/cyclohexane system using dynamic light scattering and other studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2007, Vol. 293, pp. 162–166.
63. **Valeur, B., Keh, E.** Determination of the Hydrodynamic Volume of Inverted Micelles Containing Water by the Fluorescence Polarization Technique. *J. Phys. Chem.* 1979, Vol. 83, pp. 3305-3307.
64. **Pileni, M. P., Brochette, P., Hickel, B., Lerebours, B.** Hydrated Electrons in Reverse Micelles: 2 Quenching of Hydrated. *J. Colloid Interface Sci.* 1984, Vol. 98, pp. 549-554.
65. **Chhabra, V., Ayyub, P., Chattopadhyay, S., Maitra, A. N.** Preparation of acicular $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ particles. *Materials Letters*. 1996, Vol. 26, pp. 21-26.
66. **Day, R. A., Robinson, B. H., Charke, J. H. R., Doherty, J. V.** Characterisation of Water-containing Reversed Micelles. *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1*. 1979, Vol. 75, pp. 132 - 139.
67. **Li, B., Xie, Y., Liu, Y., Huang, J., Qian, Y.** Sonochemical synthesis of nanocrystalline silver tellurides Ag_2Te and Ag_7Te_4 . *Journal of Solid State Chemistry*. 2001, Vol. 158, pp. 260-263.
68. **Mooney, M.** The viscosity of a concentrated suspension of spherical particles. *J. colloid. Sci.* 1951, Vol. 6, pp. 162-170.
69. **Roscoe, R.** The viscosity of suspensions of rigid spheres. *Brit. J. Appl. Phys.* 1952, Vol. 3, pp. 267-269 .
70. **Falco, J. W., Walker, R. D., Shah, D. O.** Effect of phase-volume ratio and phase-inversion on viscosity of microemulsions and liquid crystals. *AIChE Journal*. 1974, Vol. 20, pp. 510 - 514.
71. **Matsumoto, S., Sherman, P.** The Viscosity of Microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 1969, Vol. 30, pp. 525-536.
72. **Pillai, V., Kumar, P., Hou, M. J., Ayyub, P., Shah, D. O.** Preparation of nanoparticles of silver halides, superconductors and magnetic materials using water-in- oil microemulsions as nano-reactors. *Adv. Colloid. Interface Science*. 1995, Vol. 55, pp. 241-269.
73. **Koole, R., van Schooneveld, M. M., Hilhorst, J., Donega, C. D., t Hart, D. C., van Blaaderen, A., Vanmaekelbergh, D., Meijerink, A.** On the incorporation mechanism of hydrophobic quantum dots in silica spheres by a reverse microemulsion method. *Chem. Mat.* 2008, Vol. 20, pp. 2503-2512.
74. **Wang, L., Zhao, W., Tan, W.** Bioconjugated Silica Nanoparticles: Development and Applications. *Nano Res.* 2008, Vol. 1, p. 99 115.

75. **Montalvo, G., Valiente, M., Rodenas, E.** Study of the phase diagram of the CTAB/benzyl alcohol/water system. *J. Colloid Interface Sci.* 1995, Vol. 172, pp. 494-501.
76. **Diaspro, A., Robello, M.** Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2000, Vol. 55, pp. 1-8.
77. **Stokes, G. G.** On the change of refrangibility of light. *Phil. Trans. R. Soc.* 1852, Vol. 142, pp. 463-562.
78. **Rusinova, E., Tretyachenko-Ladokhina, V., Vele, O. E., Senear, D. F., Alexander Ross, J. B.** Alexa and Oregon Green dyes as fluorescence anisotropy probes for measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions. *Analyt. Biochem.* 2002, Vol. 308, pp. 18-25.
79. **Valeur, B.** *Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters.* New York : J.W. Sons, 1993. pp. 25-84.
80. **Moog, R. S., Ediger, M. D., Boxer, S. G., Fayer, M. D.** viscosity dependence of the rotational reorientation of rhodamine B in mono and polyalcohols. Picosecond transient grating experiments. *J. Phys. Chem.* 1982, Vol. 86, pp. 4694-4700.
81. **Vogel, P.** *Chimie Organique Moderne.* 1e édition. Paris : De Boeck , 1998.
82. **Casey, K.G., Quitevis, E.L.** Effect of solvent polarity on nonradiative processes in xanthene dyes: Rhodamine B in normal alcohols. *J. Phys. Chem.* 1988, Vol. 92, pp. 6590-6594 .
83. **Zhang, Y., Kemper, C., Bakke, A., Haugland, R. P.** Novel flow cytometry compensation standards: Internally stained fluorescent microspheres with matched emission spectra and long-term stability. *Cytometry.* 1998, Vol. 33, pp. 244-248.
84. **Wittmershaus, B. P., Skibicki, J. J., McLafferty, J. B., Zhang, Y., Swan, S.** Spectral Properties of Single BODIPY Dyes in Polystyrene Microspheres and in Solutions. *J. Fluoresc.* 2001, Vol. 11, pp. 119-128.
85. **Yang, H.H., Qu, H. Y., Lin, P., Li, S. H., Ding, M. T., Xu, J. G.** Nanometer fluorescent hybrid silica particle as ultrasensitive and photostable biological labels. *Analyst.* 2003, Vol. 128, pp. 462-466.
86. **Lian, W., Litherland, S. A, Badrane, H., Tan, W., Wu, D., Baker, H. V., Gulig, P. A, Lim, D. V., Jin, S.** Ultrasensitive detection of biomolecules with fluorescent dye-doped nanoparticles. *Anal. Biochem.* 2004, Vol. 334, pp. 135-144.
87. **Swadeshmukul, S., Zhang, P., Wang, K., Rovelyn, T., Tan, W.** Conjugation of Biomolecules with Luminophore-Doped Silica Nanoparticles for Photostable Biomarkers. *Anal. Chem.* 2001, Vol. 73, pp. 4988-4993.
88. **Tan, W., Wang, K., He, X., Zhao, X., Drake, T., Wang, L., Bagwe, R.** Bionanotechnology Based on Silica Nanoparticles. *Med. Res. Rev.* 2004, Vol. 24, pp. 621-638.

89. **Raccurt, O., Diop, B. N., Roux, S., Tillement, O.** *Process for modifying aramid fibers and process for dyeing said fibers.* EP1978152 europe, 08 octobre 2008.
90. **Haugland, R.P.** *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.* 9e édition. Oregon : Probes Molecular, 2002.
91. **Ogawa, M., Nakamura, T., Mori, J., Kuroda, K.** Luminescence of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) Cations ([Ru(bpy)₃]²⁺) Adsorbed in Mesoporous Silica. *J. Phys. Chem. B.* 2000, Vol. 104, pp. 8554-8556 .
92. **Bagwe, R. P., Hilliard, L. R., Tan, W.** Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding. *Langmuir.* 2006, Vol. 22, pp. 4357-4362.
93. **Ha, S-W., Camalier, C. E., Beck Jr, G. R., Lee, J-K.** New method to prepare very stable and biocompatible fluorescent silica nanoparticles. *Chem. Commun.* 2009, pp. 2881–2883.
94. **Ganschow, M., Wark, M., Wöhrle, D., Schulz, G.** Anchoring of Functional Dye Molecules in MCM-41 by Microwave-Assisted Hydrothermal Cocondensation. *Angew. Chem Int. Ed.* 2000, Vol. 39, pp. 160-163.
95. **Zhao, X., Tapeç-Dytioco, R., Tan, W.** Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated nanoparticle. *J. Am.Chem. Soc.* 2003, Vol. 125, pp. 11474-11475.
96. **Pastoriza-Santos, I., Liz-Marzán, L. M.** Colloidal silver nanoplates. State of the art and future challenges. *J Mater. Chem.* 2008, Vol. 18, pp. 1724-1737.
97. **Sperling, R.A., Rivera Gil, P., Zhang, F., Zanella, M., Parak, W. J.** Biological applications of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 2008, Vol. 37, pp. 1896–1908.
98. **Wilson, R.** The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chem. Soc. Rev.* 2008, Vol. 37, pp. 2028–2045.
99. **Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D. J., Kiely, C.** Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, pp. 1655-1656.
100. **Burda, C., Chen, X., Narayanan, R., El-Sayed, M. A.** Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Rev.* 2005, Vol. 105, pp. 1025-1102.
101. **Ahmad, T., Ramanujachary, K. V., Lofland, S. E., Ganguli, A. K.** Magnetic and electrochemical properties of nickel oxide nanoparticles obtained by the reverse-micellar route. *Solid State Sciences.* 2006, Vol. 8, pp. 425–430.
102. **Lisiecki, I., Pileni, M. P.** Synthesis of Copper Metallic Clusters Using Reverse Micelles as Microreactors. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, Vol. 115, pp. 3887-3896.
103. **Tanori, J., Pileni, M. P.** Control of the Shape of Copper Metallic Particles by Using a Colloidal System as Template. *Langmuir.* 1997, Vol. 13, pp. 639–646.

104. **Petit, C., Taleb, A., Pileni, M. P.** Cobalt Nanosized Particles Organized in a 2D Superlattice: Synthesis, Characterization, and Magnetic Properties. *J. Phys. Chem.* 1999, Vol. 103, pp. 1805-1810.
105. **Legrand, J., Petit, C., Pileni, M. P.** Domain Shapes and Superlattices Made of 8 nm Cobalt Nanocrystals: Fabrication and Magnetic Properties. *J. Phys. Chem. B.* 2001, Vol. 105, pp. 5643-5646.
106. **Petit, C., Lixon, P., Pileni, M. P.** In Situ Synthesis of Silver Nanocluster in AOT Reverse Micelles. *J. Phys. Chem.* 1993, Vol. 97, pp. 12974-12983.
107. **Taleb, A., Petit, C., Pileni, M. P.** Synthesis of Highly Monodisperse Silver Nanoparticles from AOT Reverse Micelles: A Way to 2D and 3D Self-Organization. *Chem. Mater.* 1997, Vol. 9, pp. 950-959.
108. **Graf, C., Vossen, D. L. J., Imhof, A., van Blaaderen, A.** A general method to coat colloidal particles with silica. *Langmuir.* 2003, Vol. 19, pp. 6693-6700.
109. **Chen, M. M. Y., Katz, A.** Synthesis and Characterization of Gold-Silica Nanoparticles Incorporating a Mercaptosilane Core-Shell Interface. *Langmuir.* 2002, Vol. 18, pp. 8566-8572.
110. **Liz-Marzán, L. M., Giersig, M., Mulvaney, P.** Synthesis of nanosized gold-silica core-shell particles. *Langmuir.* 1996, Vol. 18, pp. 4329-4335.
111. **Liz-Marzán, L. M., Giersig, M., Mulvaney, P.** Homogeneous silica coating of vitreophobic colloids. *Chem. Commun.* 1996, pp. 731-732.
112. **Debouttière, P.-J., Roux, S., Vocanson, F., Billotey, C., Beuf, O., Favre-Réguillon, A., Lin, Y., Pellet-Rostaing, S., Lamartine, R., Perriat, P., Tillement, O.** Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Adv. Funct. Mater.* 2006, Vol. 16, pp. 2330-2339.
113. **Alric, C., Taleb, J., Le Duc, G., Mandon, C., Billotey, C., Le Meur-Herland, A., Brochard, T., Vocanson, F., Janier, M., Perriat, P., Roux, S., Tillement, O.** Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, Vol. 130, pp. 5908-5915.
114. **Martino, A., Yamanaka, S. A., Kawola, J. S., Loy, D. A.** Encapsulation of Gold Nanoclusters in Silica Materials via an Inverse Micelle/Sol-Gel Synthesis. *Chem. Mater.* 1997, Vol. 9, pp. 423-429.
115. **Leon, V.** *Etude des effets de confinement dans la silice mésoporeuse et dans certaines nanostructures carbonées.* Thèse de l'université d'Orléans. 2006. p. 41.
116. **Ung, T., Liz-Marzán, L. M., Mulvaney, P.** Controlled method for silica coating of silver colloids. Influence of coating on the rate of chemical reactions. *Langmuir.* 1998, Vol. 14, pp. 3740-3748.

117. **Daniel, M-C. et Astruc, D.** Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* 2004, Vol. 104, pp. 293-346.
118. **Mie, G.** Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions. *Ann. Phys.* 1908, Vol. 25, pp. 377-445.
119. **Ye, J., Van de Broek, B., De Palma, R., Libaers, W., Clays, K., Van Roy, W., Borghs, G., Maes, G.** Surface morphology changes on silica-coated gold colloids. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2008, Vol. 322, pp. 225-233.
120. **Quinten, M., Leitner, A., Krenn, J. R., Aussenegg, F. R.** Electromagnetic energy transport via linear chains of silver nanoparticles. *Opt. Lett.* 1998, Vol. 23, pp. 1331-1333.
121. **Smith, J. E., Medley, C. D., Tang, Z., Shangguan, D., Lofton, C., Tan, W.** Aptamer-Conjugated Nanoparticles for the Collection and Detection of Multiple Cancer Cells. *Anal. Chem.* 2007, Vol. 79, pp. 3075-3082.
122. **Aslan, K., Wu, M., Lakowicz, J. R., Geddes, C. D.** Fluorescent Core-Shell Ag@SiO₂ Nanocomposites for Metal-Enhanced Fluorescence and Single Nanoparticle Sensing Platforms. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, Vol. 129, pp. 1524-1525.
123. **Tovmachenko, O.G., Graf, C., van den Heuvel, D., van Blaaderen, A., Gerritsen, H.** Fluorescence Enhancement by Metal-Core/Silica-Shell Nanoparticles. *Adv. Mater.* 2006, Vol. 18, pp. 91-95.
124. **Bridot, J. L., Faure, A. C., Laurent, S., Rivière, C., Billotey, C., Hiba, B., Janier, M., Josserand, V., Coll, J-L., V., Elst, LV., Muller, R., Roux, S., Perriat, P., Tillement, O.** Hybrid Gadolinium Oxide Nanoparticles: Multimodal Contrast. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, Vol. 129, pp. 5076-5084.
125. **Verwey, E. J. W., Overbeek, J. T. G.** *Theory of the stability of lyophobic colloids.* Amsterdam : Elsevier, 1948.
126. **Derjaguin, B. V., Landau, L.** Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochim.* 1941, Vol. 14, pp. 633-662.
127. **Gao, F., Luo, F., Yin, J., Wang, L.** Preparation of aminated core-shell fluorescent nanoparticles and their application to the synchronous fluorescence determination of γ -globulin. *Luminescence.* 2008, Vol. 23, pp. 392-396.
128. **Kumar, R., Roy, I., Ohulchanskyy, T. Y. et Goswami, L. N., Bonoiu, A. C., Bergey, E. J., Trampusch, K. M., Maitra, A., Prasad, P. N.** Covalently Dye-Linked, Surface-Controlled, and Bioconjugated Organically Modified Silica Nanoparticles as Targeted Probes for Optical Imaging. *ACS Nano.* 2008, Vol. 2, pp. 449-456.
129. **Hermanson, G. T.** *Bioconjugate Techniques.* 2e édition. London : Academic Press, 2008.

130. **Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B.** Click Chemistry : Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, Vol. 40, pp. 2004-2021.
131. **Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., K. B., Sharpless.** A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, Vol. 41, pp. 2596-2599.
132. **Meldal, M., Tornøe, C. W.** Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* 2008, Vol. 108, pp. 2952-3015.
133. **Binder, W. H., Sachsenhofer, R.** 'Click' chemistry in polymer and materials science. *Macromol. Rapid Commun.* 2008, Vol. 28, pp. 15-54.
134. **Hein, J. E., Tripp, J. C., Krasnova, L. B., Sharpless, K. B., Fokin, V. V.** Copper(I)-Catalyzed Cycloaddition of Organic Azides and 1-Iodoalkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, Vol. 48, pp. 8018-8021.
135. **Tornøe, C.W., Christensen, C., Meldal, M.** Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* 2002, Vol. 67, pp. 3057-3064.
136. **Devaraj, N. K., Keliher, E. J., Thurber, G. M., Nahrendorf, M., Weissleder, R.** 18F Labeled Nanoparticles for in Vivo PET-CT Imaging. *Bioconj. Chem.* 2009, Vol. 20, pp. 397-401.
137. **Meldal, M.** Polymer "Clicking" by CuAAC Reactions. *Macromol Rapid Commun.* 2008, Vol. 29, pp. 1016-1051.
138. **Hafrén, J., Zou, W., Córdova, A.** Heterogeneous Organoclick Derivatization of Cellulose. *Macromol. Rapid. Commun.* 2006, Vol. 27, pp. 1362-1366.
139. **Halila, S., Manguian, M., Fort, S., Cottaz, S., Hamaide, T., Fleury, E., Driguez, H.** Syntheses of Well-Defined Glyco-Polyorganosiloxanes by "Click" Chemistry and their Surfactant Properties. *Macromol. Chem. Phys.* 2008, Vol. 209, pp. 1282-1290.
140. **Boisselier, E., Salmon, L., Ruiz, J., Astruc, D.** How to very efficiently functionalize gold nanoparticles by "click" chemistry. *Chem. Comm.* 2008, pp. 5788-5790.
141. **Li, Y., Benicewicz, B. C.** Functionalization of Silica Nanoparticles via the Combination of Surface-Initiated RAFT Polymerization and Click Reactions. *Macromolecules.* 2008, Vol. 41, pp. 7986-7992.
142. **Harris, J.M., Chess, R.B.** Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, Vol. 2, pp. 214-221.
143. **Faure, A. C., Dufort, S., Josserand, V., Perriat, P., Coll, J-L., Roux, S., Tillement, O.** Coatings, Control of the in vivo Biodistribution of Hybrid Nanoparticles with Different Poly(ethylene glycol). *Small.* 2009, Vol. 5, pp. 2565-2575.

144. Liu, Y., Shipton, M. K., Ryan, J., Kaufman, E. D., Franzen, S., Feldheim, D.L. Synthesis, Stability, and Cellular Internalization of Gold Nanoparticles Containing Mixed Peptide-Poly(ethylene glycol) Monolayers. *Anal. Chem.* 2007, Vol. 79, pp. 2221-2229.
145. Xie, J., Xu, C., Kohler, N., Hou, Y., Sun, S. Controlled PEGylation of Monodisperse Fe₃O₄ Nanoparticles for Reduced Non-Specific Uptake by Macrophage Cells. *Adv. Mat.* 2007, Vol. 19, pp. 3163-3166.
146. Bentzen, E. L., Tomlinson, I. D., Mason, J., Gresch, P., Warnement, M. R., Wright, D., Sanders-Bush, E., Blakely, R., Rosenthal, S. J. Surface Modification To Reduce Nonspecific Binding of Quantum Dots in Live Cell Assays. *Bioconj. Chem.* 2005, Vol. 16, pp. 1488-1494.
147. Kohler, N., Fryxell, G.E., Zhang, M. A. Bifunctional Poly(ethylene glycol) Silane Immobilized on Metallic Oxide-Based Nanoparticles for Conjugation with Cell Targeting Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, Vol. 126, pp. 7206-7211.
148. Ostaci, R. V., Damiron, D., Capponi, S., Vignaud, G., Léger, L., Grohens, Y., Drockenmuller, E. Polymer Brushes Grafted to "Passivated" Silicon Substrates using Click Chemistry. *Langmuir.* 2008, Vol. 24, pp. 2732-2739.
149. He, X., Nie, H., Wang, K., Tan, W., Wu, X., Zhang, P. In Vivo Study of Biodistribution and Urinary Excretion of Surface-Modified Silica Nanoparticles. *Anal. Chem.* 2008, Vol. 80, pp. 9597-9603.
150. Peng, J., Wang, K., Tan, W., He, X., He, C., Wu, P., Liu, F. Identification of live liver cancer cells in a mixed cell system using galactose-conjugated fluorescent nanoparticles. *Talanta.* 2007, Vol. 71, pp. 833-840.
151. Klejbor, I., Stachowiak, E. K., Bharali, D. J., Roy, I., Spodnik, I., Morys, J., Bergey, E. J., Prasad, P. N., Stachowiak M. K. ORMOSIL nanoparticles as a non-viral gene delivery vector for modeling polyglutamine induced brain pathology. *J Neurosci Methods.* 2007, Vol. 165, pp. 230-243.
152. Sambhy, V., MacBride, M. M., Peterson, B. R., Sen, A. Silver Bromide Nanoparticle/Polymer Composites: Dual Action Tunable Antimicrobial Materials. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, Vol. 128, pp. 9798-9808.
153. Klasen, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns.* 2000, Vol. 26, pp. 131-138.
154. Jeon, H-J., Yi, S-C., Oh, S-G. Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO₂ thin films by sol-gel method. *Biomaterials.* 2003, Vol. 24, pp. 4921-4928.
155. Liong, M., France, B., Bradley, K. A., Zink, J. I. Antimicrobial Activity of Silver Nanocrystals Encapsulated in Mesoporous Silica Nanoparticles. *Adv. Mater.* 2009, Vol. 21, pp. 1684-1689.
156. Galya, T., Sedlařík, V., Kuřitka, I., Novotný, R., Sedlaříková, J., Sába, P. Antibacterial Poly(vinyl Alcohol) Film Containing Silver Nanoparticles: Preparation and Characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* 2008, Vol. 110, pp. 3178-3185.

157. **Kong, H., Jang, J.** Antibacterial Properties of Novel Poly(methylmethacrylate) Nanofiber Containing Silver Nanoparticles. *Langmuir*. 2008, Vol. 24, pp. 2051-2056.
158. **Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y.** Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Coll Int Sc*. 2009, Vol. 145, pp. 83-96.
159. **Sambhy, V., MacBride, M. M., Peterson B. R., Sen, A.** Silver Bromide Nanoparticle/Polymer Composites: Dual Action Tunable Antimicrobial Materials. *J. AM. CHEM. SOC.* 2006, Vol. 128, pp. 9798-9808.
160. **Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S-I., Tsuschido, T.** Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. *App Env Micro*. 2003, Vol. 69, pp. 4278 - 4281.
161. **Thomas, S.** World Wide Wounds. [En ligne] Novembre 2004. [Citation : 17 Octobre 2007.]
<http://www.worldwidewounds.com/2004/november/Thomas/Introducing-Silver-Dressings.html#ref86>.
162. **Chen, X., Schluesener, H. J.** Nanosilver: A nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters*. 2008, Vol. 176, pp. 1-12.
163. **Hall, R. E., Bender, G., Marquis, R. E.** Inhibitory and cidal antimicrobial actions of electrically generated silver ions. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 1987, Vol. 45, pp. 779-84.
164. **Maple, P. A., Hamilton-Miller, J. M., Brumfitt, W.** Comparison of the in-vitro activities of the topical antimicrobials azelaic acid, nitrofurazone, silver sulphadiazine and mupirocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1992, Vol. 29, pp. 661-68.
165. **Roy, D., Semsarilar, M., Guthrie, J. T., Perrier, S.** Cellulose modification by polymer grafting: a review. *Chem. Soc. Rev.* 2009, Vol. 38, pp. 2046-2064.
166. **Laurent, A., De Lambert, B., Charreyre, M-T., Mandrand, B., Chaix, C.** A one step derivatization of controlled pore glass for oligonucleotide solid-phase synthesis. *Tetrahedron Lett.* 2004, Vol. 45, pp. 8883-8887.
167. **Martínez-Urreaga, J., De La Orden, M. U.** Modification of cellulose with amino compounds: A fluorescence study. *Carbohydr. Polym.* 2007, Vol. 69, pp. 14-19.
168. **Wang, X., Wang, C.** The antibacterial finish of cotton via sols containing quaternary ammonium salts. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2009, Vol. 50, pp. 15-21.
169. **Gaffet, E.** Nanoargent/Nano silver. [En ligne] Avril 2009. [Citation : 10 septembre 2010.] http://www.vivagora.org/IMG/pdf/Presentation_Eric-Gaffet_2-avril-2009.pdf.
170. **Bech, L., Meylheuc, T., Lepoittevin, B., Roger, P.** Chemical Surface Modification of Poly(ethyleneterephthalate) Fibers by Aminolysis and Grafting of Carbohydrates. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 2007, Vol. 45, pp. 2172-2183.