



HAL
open science

Élaboration de nanoparticules composites à propriétés optiques non-linéaires pour des applications biomédicales

Rachid Ladj

► **To cite this version:**

Rachid Ladj. Élaboration de nanoparticules composites à propriétés optiques non-linéaires pour des applications biomédicales. Matériaux. Université Grenoble Alpes, 2012. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-01959826⟩

HAL Id: tel-01959826

<https://hal.science/tel-01959826v1>

Submitted on 19 Dec 2018

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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Science pour l'ingénieur**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Rachid LADJ

Thèse dirigée par **M. Ronan Le Dantec** et **M. Hamid Elaissari**
codirigée par **Yannick Mugnier**

préparée au sein du **Laboratoire Système et Matériaux pour la MEcatronique**
dans l'**École Doctorale Science et Ingénierie des Systèmes de L'environnement et des Organisation**

Elaboration de nanoparticule composite à propriétés optique non-linéaire pour des applications biomédicales

Thèse soutenue publiquement le **29 Novembre 2012**
devant le jury composé de :

M. Ronan LE-DANTEC

Professeur, Université de Savoie, Directeur de thèse

M. Hamid ELAISSARI

Directeur de Recherches, Université de Lyon, Co-Directeur de thèse

M. Benjamin CARBONNIER

Maitre de Conférences, Université Paris Est Creteil, Rapporteur

M. Amane JADA

Chargé de Recherches, Université de Haute Alsace, Rapporteur

M. Yannick Mugnier

Maitre de Conférences, Université de Savoie, Examineur

M. Mohamed CHEHIMI

Directeur de Recherches, Université Paris Diderot, Examineur



Remerciement

Je tiens à remercier le Professeur Hatem FESSI, directeur du Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP) de l'Université Lyon1 et le Professeur Laurent Tabourot, directeur du laboratoire SYstèmes et Matériaux pour la MEcatroniques (SYMME) de l'Université de Savoie pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires respectifs et de m'avoir permis ainsi de réaliser mes travaux de thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à Hamid Elaissari, Ronan Le-Dantec et Yannick Mugnier pour leur encadrement, leur soutien, leur bonne humeur et leurs conseils précieux qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions. Tout au long de ces années, il m'ont énormément appris, guidé et soutenu, et pour tout cela je leur en suis extrêmement reconnaissant.

Merci à Benjamin Carbonnier, Amane Jada pour avoir accepté la fonction de rapporteur de ce manuscrit et pour leur participation à mon jury de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe du LAGEP, particulièrement Jean Pierre Valour et Nadia Chapel qui sont des éléments clés du LAGEP et merci à Christelle Davanzo du laboratoire SYMME pour sa disponibilité et son soutien.

Il est maintenant temps de remercier tous les collègues du LAGEP et du SYMME. Au cours de ces années de travail, j'ai eu le plaisir de rencontrer beaucoup de gens : Mahbub, Naveed, Sami, Miloux, Ahmed, Sébastien, Géraldine, Audrey, Abir, Nassim, Claudia, Stéfino, Faiza, François, Delphine, Zouaoui, Sofiane, Basile, Hector, Moustapha, Cécile, Latifa, Jean Christophe... la liste est très grande...

Un gigantesque remerciement à ma grande famille pour leur accompagnement, leur soutien et leur encouragement tout au long de ma vie, tout particulièrement ma mère et mon père sans qui rien n'aurait été possible.

Enfin, je remercie infiniment ma femme de m'avoir soutenu et aidé tout au long de cette période et de m'avoir offert ma petite abeille Mélyna. Que le tout puissant protège ma famille et les guide vers un chemin de bonheur.

« Le sort de deux doigts c'est de vivre ensemble ».

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	3
----------------------------	---

Chapitre I : Synthèse et applications biomédicales des nanoparticules. Étude bibliographique

INTRODUCTION.....	11
I. SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES PAR VOIE CHIMIQUE.....	12
I.1. LA CO-PRECIPITATION.....	12
I.1.A. NOTIONS DE BASE.....	12
I.1.b. Etape de nucléation.....	13
I.1.c. Croissance.....	15
I.1.d. Phénomène d'agglomération.....	15
I.1.e. Mûrissement d'Ostwald.....	16
I.2.a. Formation des microémulsions.....	19
I.2.a.i. Les tensioactifs.....	19
I.2.a.ii. Diagramme de phase des systèmes ternaires.....	23
I.2.a.iii. Structure d'une microémulsion inverse.....	24
I.2.b. Réaction de co-précipitation en microémulsion.....	25
I.2.b.i. Principe.....	25
I.2.b.ii. Influence des paramètres expérimentaux.....	26
Effet du rapport w.....	26
Effet de la concentration des réactifs.....	27
Ajout d'électrolytes/ molécules additives.....	27
Effet du solvant.....	28
I.3. SYNTHÈSE EN MINIEMULSION.....	29
I.3.a. Étape d'émulsification.....	29
I.3.b. Stabilité de la miniémulsion.....	30
I.3.c. Principe de synthèse.....	31
II. SYNTHÈSE ET ENCAPSULATION DE NANOPARTICULES INORGANIQUES.....	33
II.1. REVUE n°1: "INDIVIDUAL INORGANIC NANOPARTICLES: PREPARATION, FUNCTIONALIZATION AND APPLICATION FOR IN VITRO BIOMEDICAL DIAGNOSTIC".....	33
II.2. REVUE n°2: "ENCAPSULATION OF INORGANIC NANOPARTICLES FOR IN VITRO AND IN VIVO BIOMEDICAL APPLICATIONS".....	73

Chapitre II : Synthèse de nanocristaux d'iodate de fer

INTRODUCTION.....	105
-------------------	-----

I. SYNTHÈSE CONTRÔLÉE PAR AJOUT DE POLYMERÉ EN MICROÉMULSIONS INVERSES	106
I.1. INTRODUCTION	106
I.2. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE : « EFFET DE LA NATURE DE POLYMERÉ »	106
I.2.a. <i>Protocol expérimental</i>	107
I.2.b. <i>Analyse de la morphologie des particules obtenues</i>	107
I.3. SYNTHÈSE PAR AJOUT DE POLY(ÉTHYLENE GLYCOL)	110
I.4. CONCLUSION SUR LA SYNTHÈSE PAR MICROÉMULSION INVERSE MODIFIÉE	112
II. SYNTHÈSE DES CRISTAUX D'IODATE DE FER VIA LA MINIÉMULSION INVERSE	113
II.1. INTRODUCTION	113
II.2. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	114
II.3. RESULTATS	115
II.4. CONCLUSION SUR LA SYNTHÈSE PAR MINIÉMULSION INVERSE	118
SHG ACTIVE $Fe(IO_3)_3$ PARTICLES: FROM SPHERICAL NANOCRYSTALS TO URCHIN-LIKE MICROSTRUCTURES THROUGH THE ADDITIVE-MEDIATED MICROÉMULSION ROUTE	119
CONCLUSIONS	129

Chapitre III : Encapsulation des nanoparticules inorganiques

INTRODUCTION	133
I. ENCAPSULATION PAR POLYMERISATION EN MINIÉMULSION INVERSE	134
I.1. INTRODUCTION	134
I.2. SYNTHÈSE DES TRAVAUX	135
<i>IN SITU</i> SYNTHESIS AND ENCAPSULATION OF IRON IODATE ($Fe(IO_3)_3$) NANOCRYSTALS ...	137
VIA INVERSE MINIÉMULSION POLYMERIZATION	137
II. ENCAPSULATION PAR ADSORPTION DE POLYMERÉ	157
II.1. INTRODUCTION	157
II.2. SYNTHÈSE DES TRAVAUX	158
CONCLUSION	159
CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES	181

Introduction Générale

Le domaine des nanobiotechnologies est en plein essor avec des applications potentielles dans plusieurs champs disciplinaires dont celui de l'imagerie biomédicale. Selon la technique utilisée, l'imagerie biomédicale peut nécessiter l'utilisation d'agents de contraste exogènes dans un but de comprendre des phénomènes physiologiques et de permettre de mieux diagnostiquer différentes pathologies.

Dans ce contexte, l'imagerie constitue un outil d'investigation de choix dans plusieurs champs de la médecine et de la biologie, de nombreuses techniques sont aujourd'hui couramment employées. Parmi celles-ci, l'imagerie optique est en pleine expansion avec en particulier la diffusion très large des techniques de microscopie confocale et de microscopie multiphotonique couplée au développement récent de nombreux marqueurs fluorescents. Cependant, les techniques de microscopie basées sur la fluorescence comportent certaines limitations comme l'autofluorescence des tissus (qui est importante aux longueurs d'ondes d'émission de la plupart des fluorophores) et le photoblanchiment des sondes organiques (qui limite les durées d'observation et peut induire une phototoxicité). De plus, les sondes optiques plus récentes basées sur des nanocristaux semiconducteurs (ou quantum dots) présentent aussi des inconvénients comme le « blinking », un clignotement de la fluorescence qui perturbe la formation des images et surtout une toxicité élevée qui les exclue de toute application *in vivo*. Par ailleurs, les techniques de microscopie cohérente basées sur des interactions optiques non-linéaires, et en particulier la génération de second harmonique (Second Harmonic Generation, SHG), sont aussi en plein essor dans le domaine de l'imagerie biologique. Dans ce contexte, le développement de sondes exogènes spécifiques pour la SHG est particulièrement prometteur. Ainsi, plusieurs équipes de recherche ont récemment démontré les potentialités de ces sondes formées par des nanocristaux non-centrosymétriques possédant la capacité de générer un signal de second harmonique. Contrairement aux marqueurs fluorescents classiques, les nanosondes SHG produisent des signaux cohérents, stables dans le temps et avec une grande flexibilité dans le choix de la longueur d'onde d'excitation. Ceci permet d'augmenter la profondeur d'imagerie dans les tissus, par exemple pour une excitation dans l'infrarouge, et de diminuer ainsi l'énergie lumineuse déposée dans le milieu.

Cependant, l'utilisation de telles sondes pour des applications biomédicales nécessite une caractérisation stricte de leur stabilité dans les milieux aqueux, l'amélioration de leur propriétés physico-chimiques, leur fonctionnalisation pour un marquage spécifique, l'étude de leur furtivité vis-à-vis du système immunitaire et l'évaluation de leur toxicité sur les systèmes biologiques. Pour répondre à ces exigences, l'encapsulation de matériaux inorganiques sous

forme d'objets colloïdaux de taille nanométrique est une piste attrayante. L'élaboration de ce type d'objet permet une protection du cœur inorganique de la particule contre la dégradation physique ou chimique. Une couche protectrice adaptée rend aussi possible la fonctionnalisation de la surface des nano-objets de structure cœur-écorce ainsi qu'un contrôle de leur taille et de leur morphologie. C'est pour cela que l'incorporation de nanoparticules inorganiques dans une matrice polymérique est une approche couramment utilisée afin de combiner les propriétés de biocompatibilité du polymère à celles des nanoparticules inorganiques.

Le travail de recherche présenté dans ce manuscrit de thèse est centré sur la fabrication et la caractérisation de nouvelles sondes SHG pour une utilisation en tant que marqueurs biologiques en imagerie optique non-linéaire. Au cours de ces travaux, différents procédés de synthèse et d'encapsulation ont été investis pour la préparation de ces nanoparticules hybrides combinant un matériau inorganique et des macromolécules organiques. Nos recherches ont été menées avec un souci de respecter au mieux les critères suivants propres aux applications visées, à savoir :

- une taille submicronique, de préférence inférieure à 100 nm, afin de faciliter le passage à travers la barrière biologique ;
- une faible polydispersité de taille et de forme ;
- une furtivité pour échapper au système immunitaire ;
- une stabilité physico-chimique dans le milieu aqueux satisfaisante ;
- leur biocompatibilité et biodisponibilité ;
- une faible toxicité vis-à-vis du milieu physiologique.

Les travaux de cette thèse ont été soutenus par le cluster MACODEV (MATériaux et COncception pour un DEveloppement durable) de la région Rhône-Alpes. Ils se sont déroulés dans le cadre d'une collaboration entre le LAGEP¹ de l'Université de Lyon-1 et le laboratoire SYMME² de l'Université de Savoie. D'autre part, cette thèse a eu pour cadre le projet Interreg NAOMI (NANo-sOndes Multifonctionnelles pour l'Imagerie), qui rassemble des laboratoires de recherche publics et des partenaires industriels de France et de Suisse³.

¹ Laboratoire de Génie dEs Procédés,

² SYstèmes et Matériaux pour la MEcatroniques,

³ Université de Savoie, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Université Lyon 1, Institut Universitaire de Pathologie de Lausanne, Université de Genève, Advanced Accelerator Applications et Epithelix.

Une part importante de ces travaux est consacrée à la synthèse de particules hybrides à base d'iodate de fer ($\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$). Ce matériau présente d'excellentes propriétés optiques non-linéaires et aussi, *a priori*, une très faible toxicité, adapté aux applications visées. Le laboratoire SYMME est engagé depuis quelques années sur la synthèse de ce matériau non-centrosymétrique en utilisant notamment la technique de *co*-précipitation en solution homogène et en microémulsion inverse. Les particules ainsi obtenues étaient exclusivement des bâtonnets de 10 à 20nm de diamètre et de longueur variable entre 100nm et 2 μm . L'absence d'un contrôle effectif de la taille et de la morphologie semblait démontrer que la structure cristalline et la nature polaire du matériau étaient responsables de cette croissance anisotrope. En effet, seules des structures unidimensionnelles étaient obtenues malgré l'utilisation de différents tensioactifs (AOT et Triton X-100) et de différentes phases organiques (isooctane, heptane, cyclohexane) dans une large gamme de concentrations en tensioactifs et réactifs.

Nos travaux de recherche ont été réalisés en parallèle et dans la continuité de ces résultats antérieurs. Une première étude centrée sur la synthèse de nanoparticules de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ a été menée en se basant sur un procédé de microémulsion modifié par l'ajout de molécules de faible poids moléculaire tel que le polyéthylène glycol (PEG). Par la suite, le procédé de miniémulsion inverse a fait l'objet d'une étude approfondie. Nous avons employé la synthèse *in situ* par polymérisation en miniémulsion inverse pour former et encapsuler le $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ dans une matrice polymérique biocompatible. Des études portant sur la stabilisation en milieu aqueux d'autres particules inorganiques ont également été réalisées, en particulier pour des nanocristaux de niobate de potassium (KNbO_3) dont les propriétés de génération de second harmonique sont également reconnues. Nous avons modifié et fonctionnalisé leur surface par un procédé simple et efficace sans ajout de tensioactif.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit sont scindés en 3 chapitres. Le **premier chapitre** présente tout d'abord les principales méthodes de synthèse utilisées durant nos travaux de recherche (*co*-précipitation, microémulsion inverse et miniémulsion inverse). Nous continuons par un état de l'art du domaine d'étude, présenté sous la forme de deux articles de revues (en cours de préparation) portant d'une part sur la synthèse et les applications biomédicales des nanoparticules inorganiques individuelles et d'autre part, sur les méthodes d'encapsulation et de fonctionnalisation de ces nanoparticules.

Nous poursuivons ce manuscrit par la partie expérimentale de nos travaux de recherche. Le **chapitre 2** décrit la synthèse de nanocristaux d'iodate de fer en utilisant deux procédés de synthèse. Nous présentons dans un premier temps les résultats obtenus *via* la microémulsion inverse modifiée par l'ajout de divers additifs. Cette partie décrit une étude préliminaire permettant d'évaluer l'influence de différents polymères sur les caractéristiques des nanoparticules obtenues, puis une étude approfondie en utilisant le PEG comme additif préférentiel. Ces travaux sont présentés sous forme d'un article accepté. Nous exposons ensuite la préparation des nanocristaux de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ par le procédé de miniémulsion inverse.

Le **chapitre 3** présente les travaux réalisés avec comme objectif l'encapsulation des nanoparticules inorganiques SHG. Une première étude a consisté à exploiter le procédé de polymérisation en miniémulsion inverse pour réaliser simultanément la synthèse et l'encapsulation de nanoparticules d'iodate de fer. Ces travaux sont présentés sous forme d'un article scientifique en cours de préparation. Nous exposons par la suite nos travaux portant sur l'encapsulation de nanoparticules de niobate de potassium utilisant une macromolécule spécifique, l'aminodextran. La méthode d'adsorption de ce polymère est également présentée sous la forme d'un article scientifique en cours de préparation.

Nous terminons ce manuscrit par une **conclusion générale** regroupant les données clés de nos recherches et leurs **perspectives** pour la réalisation et l'utilisation de nanoparticules hybrides SHG.

Chapitre I :

Synthèse et applications biomédicales des nanoparticules Etude bibliographique

Introduction

Le domaine biomédical s'intéresse depuis quelques années au développement de nanoparticules inorganiques. Dans ce chapitre, nous décrivons des méthodes de synthèse de ces nanoparticules. Notre attention s'est particulièrement portée sur deux méthodes que nous avons exploitées pour la préparation des nanocristaux d'iodate de fer : la *co*-précipitation en microémulsion inverse et en miniémulsion inverse. Deux revues scientifiques viennent ensuite compléter cette première partie. La première revue traite de la préparation, de la fonctionnalisation et des applications des nanoparticules inorganiques dans le domaine de la santé. L'encapsulation de ces nanoparticules par diverses méthodes et leurs applications biomédicales *in vitro* et *in vivo* sont discutées dans la seconde revue.

I. Synthèse de nanoparticules par voie chimique

I.1. La *co*-précipitation

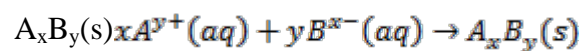
I.1.a. Notions de base

De nombreux matériaux inorganiques ont été synthétisés par *co*-précipitation de réactifs solubles en milieu aqueux. La *co*-précipitation est définie comme une cristallisation réactive³, entraînant la précipitation d'un produit de réaction entre plusieurs réactifs. Le mécanisme de *co*-précipitation n'est pas encore entièrement compris, en raison de la difficulté de décerner les processus de nucléation, de croissance, de mûrissement et d'agrégation.

Les réactions de *co*-précipitation ont cependant été décrites avec les caractéristiques suivantes⁴ :

- les produits de réaction sont des espèces généralement peu solubles en milieu aqueux, formées dans des conditions de forte sursaturation ;
- ces conditions entraînent la formation d'un grand nombre de petites particules, la nucléation est par conséquent une étape clé du processus ;
- des processus secondaires, tels que le mûrissement d'Ostwald et l'agrégation, influent considérablement la taille, la morphologie et les propriétés des particules finales ;
- les conditions de sursaturation étant nécessaires à la précipitation, de nombreux facteurs expérimentaux tels que l'agitation et la vitesse d'ajout des réactifs peuvent influencer la cinétique et la morphologie des particules finales.

Si l'on considère de manière générale la réaction de précipitation suivante :



Il est utile de définir la solubilité et la sursaturation qui sont des grandeurs fondamentales dans le processus de précipitation. La solubilité représente l'équilibre thermodynamique, alors que la sursaturation gouverne la cinétique des mécanismes de précipitation.

La relation d'équilibre entre le produit et les réactifs est donnée par la constante de solubilité K_s (Équation I.1):

$$K_s = (a_A)^x (a_B)^y \quad \text{Équation I.1}$$

avec a_A et a_B les activités du soluté A et du soluté B respectivement et K_s la constante de solubilité.

Le degré de sursaturation S est donné par l'Équation I.2 :

$$S = \frac{a_A a_B}{K_s} \quad \text{Équation I.2}$$

Nous pouvons noter que les réactions de *co*-précipitation sont relativement simples à décrire lorsque le milieu réactionnel ne contient que deux éléments.

I.1.b. Etape de nucléation

La formation des cristaux au sein d'une solution sursaturée nécessite la présence de nucléi autour desquels les molécules de soluté vont s'organiser. La nucléation est le mécanisme qui donne naissance à ces entités. Elle est considérée comme une étape limitante. Différents mécanismes de nucléation ont été distingués par Garside⁵ en fonction du site d'amorçage de la nucléation.

- la nucléation homogène se déclenche dans un milieu sursaturé exempt de cristaux ou d'autres particules solides ;
- la nucléation hétérogène est une production primaire en présence de particules solides dans le milieu ;
- la nucléation secondaire regroupe tous les mécanismes de production de nucléi liés à la présence de cristaux dans laquelle la solution est soit à l'équilibre, soit sursaturée.

La nucléation homogène est un mécanisme nécessitant une forte sursaturation. Les molécules de soluté dans la solution sursaturée forment des nucléi dont la distribution en taille suit la loi de Boltzmann. Les nucléi de taille inférieure à la taille critique se dissolvent alors que les autres constituent des entités solides qui vont croître. Le passage de l'état liquide à l'état solide nécessite une certaine énergie qui est associée à la création de cette interface. Cette énergie libre peut être calculée pour déterminer la taille critique.

En supposant que les nucléi soient sphérique, la variation d'énergie libre est composée d'un terme de surface et d'un terme de volume, suivant l'Équation I.3 :

$$\Delta G = \Delta G_{\text{Volume}} + \Delta G_{\text{Surface}} \quad \text{Équation I.3}$$

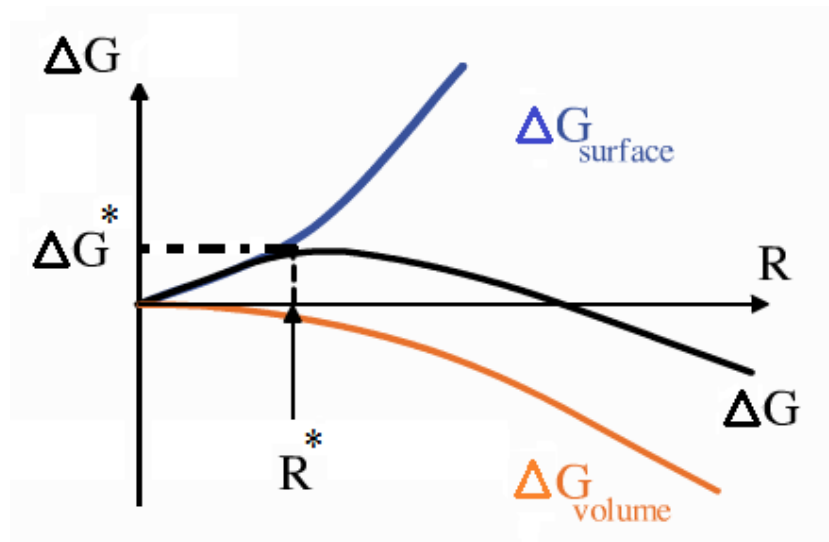


Figure I.1 : Représentation des variations de l'énergie libre d'un système (reproduit par Mullin⁶).

Comme il l'est représenté dans la Figure I.1, lorsque l'énergie du système atteint son maximum, des nucléi d'un rayon critique R^* apparaissent (nucléation), la croissance de nucléi continue ensuite avec la diminution de l'énergie du système jusqu'à atteindre la valeur zéro. Lorsque l'énergie est faible (négative) le nombre de nucléi capable de croître augmente. La cinétique de la croissance est fonction de la sursaturation dans des conditions expérimentales fixes (température, pression).

La représentation graphique du modèle de La Mer décrit la variation de la concentration en réactifs en fonction du temps au cours de la réaction de précipitation (Figure I.3).

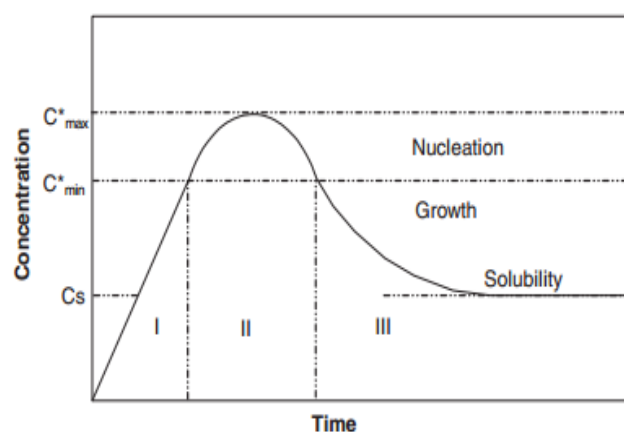


Figure I.2: Diagramme La Mer⁷.

La concentration en réactifs augmente jusqu'à une concentration minimale avant laquelle la nucléation n'a pas lieu (C^*_{min}). De manière plus concrète, la nucléation commence à partir de

ce point. La concentration du réactif augmente jusqu'à une concentration maximale de nucléation, C^*_{\max} . Par la suite, la diminution de la concentration est due à la nucléation, la croissance et la précipitation des particules. L'intervalle entre C_s et C^*_{\max} est appelé gamme de sursaturation. En dessous de C^*_{\min} , la nucléation cesse et la croissance se poursuit jusqu'à C_s .

I.1.c. Croissance

Le processus de croissance des nucléi de faible taille pour former des particules plus grosses fait intervenir différents mécanismes. Le mécanisme prédominant est basé sur le transport par diffusion de molécules dissoutes. Le mécanisme de convection en surface des particules peut également être considéré. Les gradients de concentration et la température sont les principaux facteurs qui déterminent le taux de croissance. La diffusion peut être externe, le soluté est présent dans la couche limite entourant la particule en formation, ou par incorporation de réactifs dans le réseau cristallin de la particule en croissance (croissance par intégration), comme représenté en Figure I.3



Figure I.3 : Représentation des phénomènes de croissance par diffusion.

I.1.d. Phénomène d'agglomération

Au cours de la précipitation ou après leur production, les nanoparticules peuvent adhérer les unes aux autres et former des agrégats de taille croissante sous l'influence de forces physiques (floculation et coagulation). Le phénomène de floculation est réversible alors que la coagulation est irréversible. Dans les deux cas, l'agrégation des nanoparticules est maintenue. Des processus ultérieurs peuvent toutefois rompre cette distinction. C'est notamment le cas de la coalescence.

L'agglomération est un phénomène de coagulation de particules en suspension, il est le résultat des interactions de Van der Waals qui ne dépendent que de la nature des matériaux en présence. L'agglomération peut ainsi engendrer des modifications des caractéristiques granulométriques : augmentation de la taille moyenne et diminution du nombre de particules. Des forces physiques sont à la base de ces phénomènes. La stabilisation est dite

électrostatique lorsque les forces répulsives sont générées par la présence des charges à la surface des particules. Par conséquent le pH peut modifier les charges de surface des particules et la nature de la double couche électrique. Il est donc un paramètre important dans la stabilité des suspensions colloïdales⁸. La Figure I.4 rassemble les différents phénomènes de déstabilisation colloïdale envisageables.

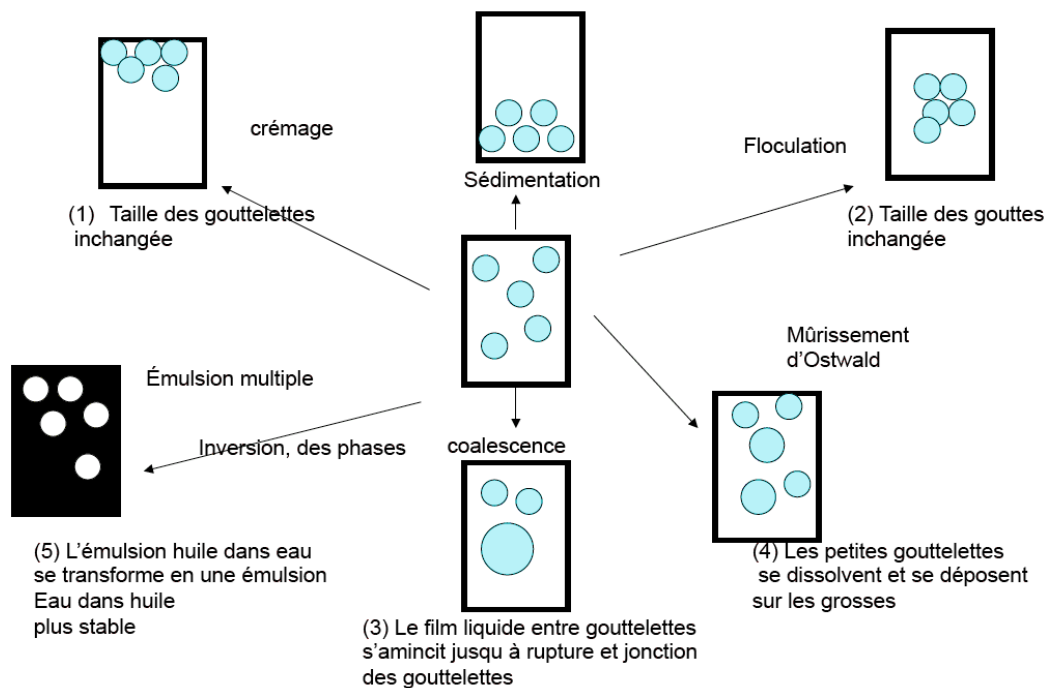


Figure I.4: Représentation schématique des processus de déstabilisation.

I.1.e. Mûrissement d'Ostwald

L'importance du mûrissement d'Ostwald (ou maturation d'Ostwald) sur la stabilité colloïdale des systèmes dispersés a été largement soulignée dans la littérature^{9,10}. Le mûrissement Ostwald est un phénomène par lequel les particules les plus grandes grossissent au détriment des plus petites (cf. Figure I.5) durant le processus de croissance en raison de l'effet Kelvin¹¹. Ce phénomène dit « de vieillissement » d'un système dispersé est régi par la solubilité des particules qui est inversement proportionnelle à leur rayon. La dépendance de la solubilité d'une particule par rapport à sa taille dans le cas d'une sphère de rayon r est géré par la relation de Gibbs-Thomson¹² (Équation I.4) :

$$\ln\left(\frac{c_r}{c_{eq}}\right) = \frac{2\gamma}{RT\rho r} \quad \text{Équation I.4}$$

avec C_r , la concentration en solution, C_{eq} , la concentration d'équilibre avec le solide de taille infinie, M la masse molaire du solide, ρ la masse volumique du solide, R la constante des gaz parfaits et T la température (K).

La cinétique liée au mûrissement d'Ostwald est régie par deux processus fondamentaux :

- la diffusion des molécules de soluté ;
- l'attachement ou le détachement (croissance des cristaux et dissolution) vers et à partir de la surface de la particule.

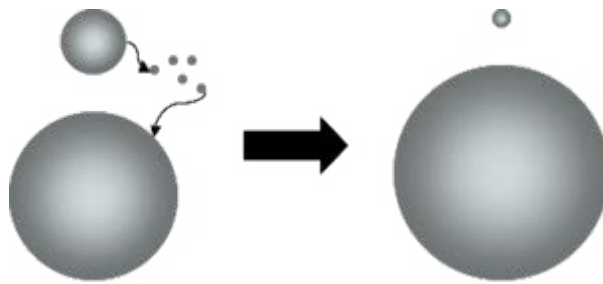


Figure I.5: Illustration schématique du phénomène de mûrissement d'Ostwald.

I.2. Synthèse en microémulsions inverses

Une microémulsion est définie comme un système thermodynamiquement stable dans laquelle deux phases non miscibles (l'eau et l'huile) sont mélangées pour former une suspension translucide¹³, la suspension micellaire. Les micelles, gouttelettes stabilisées par des tensioactifs présentant des structures sphériques ou ellipsoïdales (Figure I.6), peuvent être directes (huile dans eau) ou inverses (eau dans huile). Plus précisément, une microémulsion est un système ternaire composé d'eau, de molécules stabilisantes et de solvant organique ou quaternaire composé de ces trois éléments auxquels s'ajoute un *co*-surfactant. Pour une composition spécifique et à l'équilibre thermodynamique, les tensioactifs vont s'auto-assembler sous la forme de micelles de forme sphérique minimisant ainsi l'énergie d'interface¹⁴.

Les microémulsions inverses sont de nos jours largement utilisées en tant que « nano-réacteurs », ils représentent un milieu confiné qui joue un rôle de gabarit ou de « template » pour la synthèse de nanomatériaux. Dans certains cas, on peut obtenir en fonction de la composition initiale des microémulsions un excellent contrôle des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules synthétisées, telles que la taille, la morphologie et la surface. En particulier, la distribution de taille étroite des nano-objets finaux est à relier aux distributions monomodales des gouttelettes dont la taille peut être ajustée entre 5 et 100nm. Pour cela, le « rapport w » qui est défini comme le rapport molaire entre l'eau et le tensioactif, doit être ajusté. En pratique, chaque système et chaque matériau nécessite une étude expérimentale complète puisque de nombreux facteurs expérimentaux comme la vitesse d'agitation, la température, la nature du surfactant et de la phase huile ou encore la concentration en proportion stœchiométrique ou non des réactifs, influencent très fortement les cinétiques de formation des particules et leur distributions de taille.

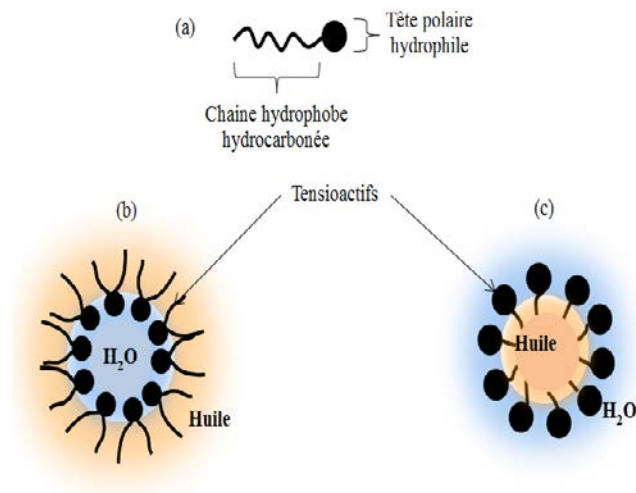


Figure I.6: Illustration schématique de la structure d'un tensioactif (a), d'une micelle inverse eau dans huile (b) et d'une micelle directe huile dans eau (c).

La littérature décrit de nombreuses études utilisant les microémulsions inverses pour synthétiser différents types de nanoparticules, dont les nanoparticules métalliques et bimétalliques, les boîtes quantiques (quantum dots), les oxydes métalliques, les nanoparticules polymériques (les latex)^{4,15}. Mais avant d'aborder ces aspects, il est utile de rappeler quelques notions de bases sur les tensioactifs et leur auto-organisation.

I.2.a. Formation des microémulsions

Nous allons discuter dans cette partie des principaux paramètres relatifs à la formation des microémulsions.

I.2.a.i. Les tensioactifs

Les tensioactifs (ou agents de surface) sont des molécules composées d'un groupement polaire hydrophile (tête polaire) et d'un groupement hydrophobe composé d'une ou de plusieurs chaînes aliphatiques de longueurs variables. La partie polaire est stable dans l'eau alors que la partie hydrophobe s'oriente vers la phase organique. Les tensioactifs permettent de diminuer la tension superficielle entre deux phases non miscibles. Plusieurs types de tensioactifs peuvent être utilisés pour obtenir des systèmes micellaires : des tensioactifs ioniques (cationiques, anioniques ou zwitterioniques) et des tensioactifs non ioniques.

La solubilisation des tensioactifs ioniques dans l'eau entraîne l'ionisation des têtes polaires chargées en libérant des contre ions dans la phase aqueuse. Le tensioactif anionique le plus

communément utilisé pour les synthèses de nanoparticules est le bis(2-éthylhexyl) sulfosuccinate de sodium (AOT) (Figure I.7 (a)) dont la structure chimique permet de faire varier le rapport eau/tensioactif dans une large gamme en ayant toujours des micelles inverses sphériques. Le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) est quant à lui un tensioactif cationique utilisé pour diverses applications, par exemple pour l'extraction de l'ADN en milieu aqueux¹⁶ et pour la synthèse de nanoparticules inorganiques d'or¹⁷ (Figure I.7 (b)).

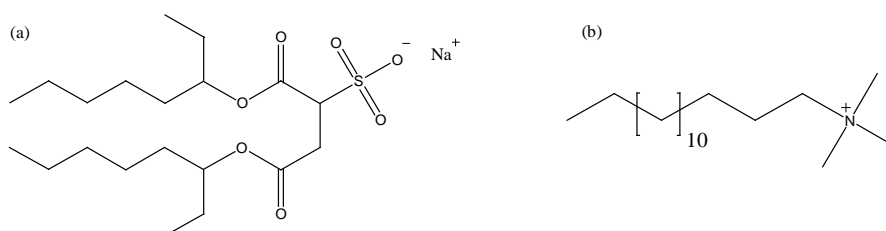


Figure I.7: Structure chimique de l'AOT (a) et du CTAB (b).

La combinaison du caractère cationique et anionique est propre aux tensioactifs zwitterioniques (amphotères), nous pouvons citer comme exemple de molécules les phospholipides et les dérivés d'acide aminé.

Les tensioactifs non-ioniques contiennent un groupement polaire non chargé dont l'affinité avec l'eau est due aux interactions fortes dipôle-dipôle résultant de liaisons hydrogènes. Parmi les tensioactifs non-ioniques, le sorbitan mono-oléate (span[®]80), le tétraéthylène glycol monododecylether (C₁₂E₄) sont des tensioactifs d'intérêt pour la synthèse de nanoparticules inorganiques. La fonction tensioactive de ce dernier est modulée par le nombre d'unités d'oxyde d'éthylène qui composent la tête hydrophile et par la longueur de la chaîne hydrocarbonée hydrophobe (Figure I.8).

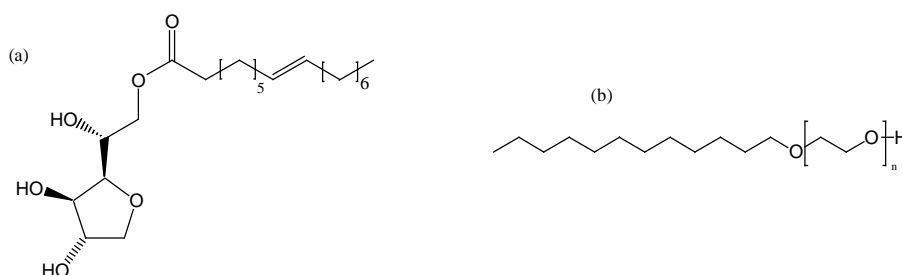


Figure I.8: Structure chimique du Span 80 (a) et C₁₂E₄ (b).

Concentration Micellaire Critique (CMC)

Les tensioactifs en solution ont tendance à s'auto-assembler, cette propriété principale est caractérisée par la concentration micellaire critique (CMC). La CMC est la concentration en tensioactifs au-delà de laquelle les micelles commencent à se former. Lorsque des tensioactifs sont ajoutés dans une solution aqueuse, ils se placent immédiatement en surface avec la tête hydrophile dans l'eau et la queue hydrophobe à l'extérieur (interface air/eau). Une fois la surface saturée, l'ajout supplémentaire de tensioactifs dans la solution rend possible l'établissement de structures organisées au sein du liquide. La CMC peut être mesurée en déterminant par exemple la courbe spécifique de la tension de surface en fonction de la concentration en molécules tensioactives (Figure I.9).

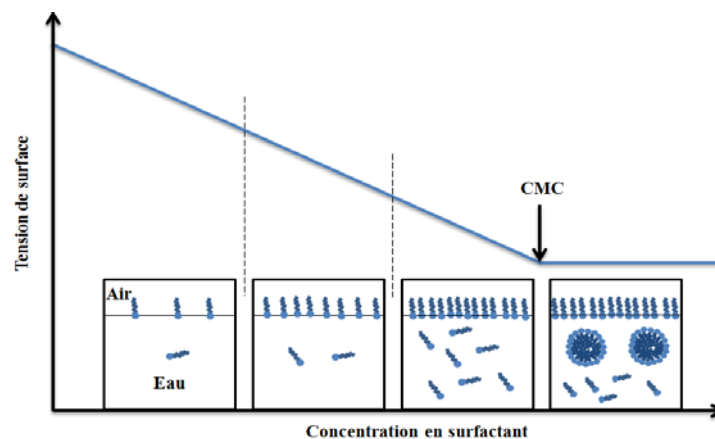


Figure I.9: Schéma représentatif de la formation des micelles en fonction de la concentration en tensioactifs.

La formation des nanogouttelettes dans le cas des microémulsions est spontanée contrairement à ce que nous verrons dans le cas des miniémulsions

Auto-assemblage des tensioactifs

L'auto-assemblage des tensioactifs peut conduire, en fonction de la composition du milieu et du tensioactif utilisé, à diverses structures au sein de la suspension telles que des micelles, des phases hexagonales ou lamellaires. Dans chaque cas, le phénomène d'auto-assemblage est un processus spontané ne nécessitant aucun apport d'énergie. La Figure I.10 rassemble les différentes structures possibles obtenues par auto-assemblage de tensioactifs.

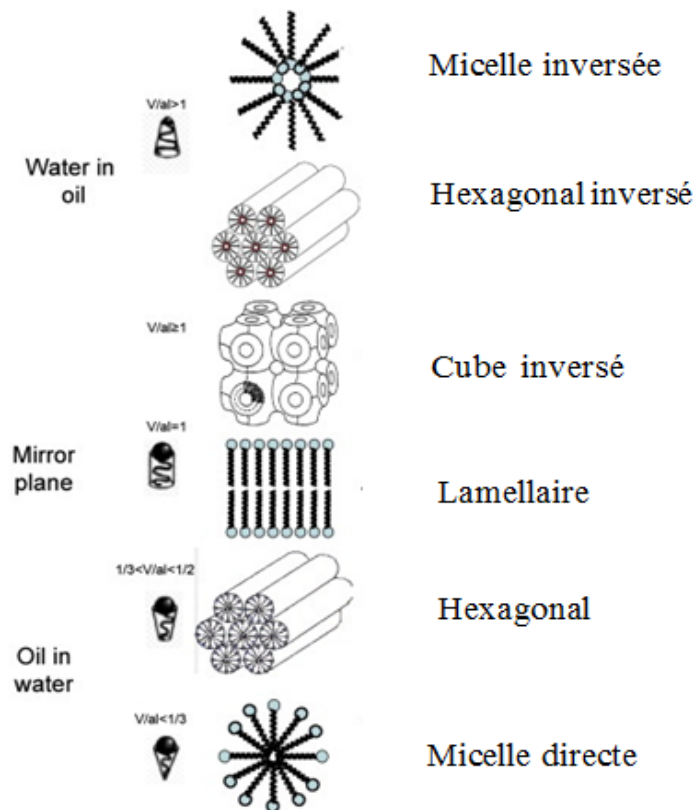


Figure I.10 : Schéma représentant différents systèmes d’auto-assemblage de tensioactifs¹⁸.

Israelachvili *et al.*¹⁹ et Tanford *et al.*²⁰ ont proposé une description semi-quantitative de la relation entre la forme moléculaire des tensioactifs et la formation de phases par auto-assemblage. Ils ont défini le paramètre critique d’empilement (Critical Packing Parameter, P) comme étant le rapport du volume de la partie hydrophobe de la molécule (v) sur le produit de la longueur maximale de cette partie (l_c) par la surface optimale occupée par la molécule (a_0) à l’interface entre l’agrégat et le solvant (a_0, l_c). P décrit ainsi l’importance relative des parties hydrophobes et hydrophiles pour chaque tensioactif.

$$P = v / a_0 \cdot l_c \quad \text{Équation I.5}$$

Différentes structures d’auto-assemblage peuvent être favorisées suivant P (Figure I.10). Si P est faible ($P < 1$), des structures telles que des micelles sphériques, hexagonales ou des phases cubiques sont facilitées. Une valeur P proche de 1 favorise une phase lamellaire. La formation de vésicules ou de liposomes peut également avoir lieu lorsque le tensioactif est dispersé dans l’eau. Si P est grand ($P > 1$), des structures d’auto-assemblage inverses, telles que des micelles inverses, hexagonales inverses ou des structures cubiques inverses sont produites. La

concentration en tensioactif est aussi un paramètre clé pour la description des phases formées. Nous allons décrire dans la prochaine partie le diagramme de phase dans les systèmes ternaires (huile/eau/tensioactifs) permettant de comprendre et contrôler la formation de microémulsions inverses.

I.2.a.ii. Diagramme de phase des systèmes ternaires

Winsor²¹ a décrit un diagramme de phase théorique basé sur la variation des trois composants de la microémulsion (Figure I.11). Ce diagramme de phase donne une représentation des effets de la proportion de chaque composant sur la structure des systèmes auto-organisés.

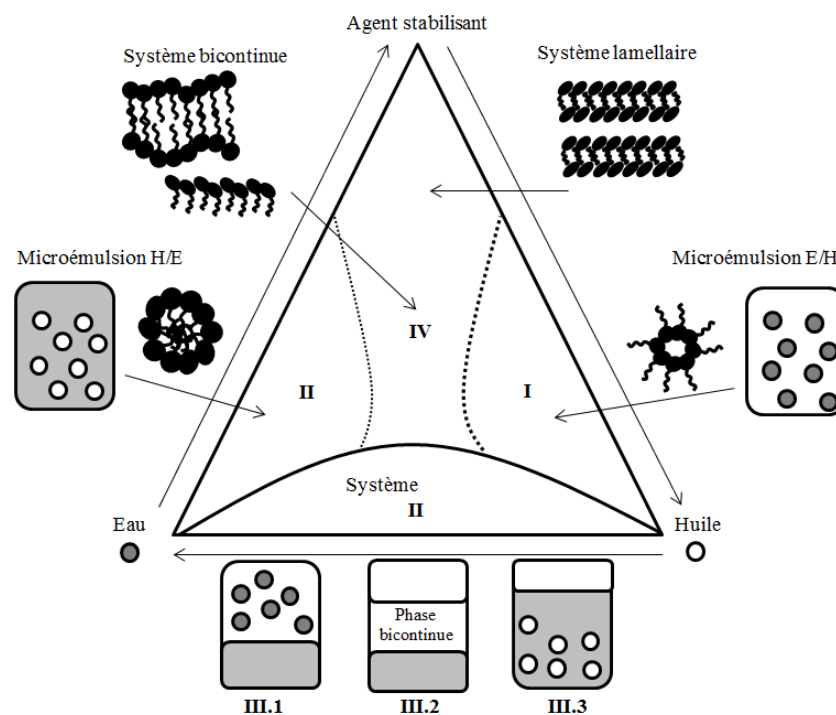


Figure I.11 : Diagramme de phase théorique pour des systèmes de microémulsion.

Les sommets du diagramme correspondent à une quantité de 100% du composé correspondant : eau, huile et agents stabilisants (tensioactifs seul ou mélange tensioactifs/*co*-tensioactifs), dans des conditions expérimentales fixes. La température, la pression ou encore la présence d'excipients (des polymères par exemple) sont des facteurs influençant le nombre de domaines.

Des microémulsions inverses constituées de gouttelettes d'eau dans l'huile sont obtenues avec une teneur faible en eau (domaine I, Figure I.11) alors que des microémulsions directes composées de gouttelettes d'huile dans l'eau sont obtenues avec une teneur en eau importante (domaine II, Figure I.11) et une quantité suffisante en agents stabilisants. Il existe une

situation intermédiaire entre ces deux domaines dans lequel les tensioactifs s'auto-assemblent en monocouche ou en bicouche, séparant les phases aqueuses et organiques (domaine IV). Un système biphasique peut apparaître lorsque la teneur en agent stabilisant est faible (domaine III).

I.2.a.iii. Structure d'une microémulsion inverse

Les microémulsions inverses permettent de solubiliser (dispenser) des molécules hydrophiles telles que des peptides, des protéines, des enzymes ou encore des ions. Elles sont exploitées pour la synthèse de nanomatériaux.

La taille d'une gouttelette d'eau stabilisée dans une phase organique est typiquement de l'ordre de la dizaine de nanomètre. Le cœur de la micelle formant un réservoir d'eau est caractérisé par le paramètre $W = [H_2O]/[S]$. Pileni²² a suggéré que le rayon du réservoir d'eau, R_w , dépend linéairement de la teneur en eau. Cela peut être expliqué par un modèle géométrique en supposant que les gouttelettes d'eau soient des sphères monodisperses, que la surface occupée par une molécule de tensioactif soit constante et que toutes les molécules de tensioactifs participent à l'interface. La Figure I.12 représente une micelle inverse avec au centre l'eau dite « libre » et une couche d'eau dite « liée » d'épaisseur d . l_c correspond à la longueur de la chaîne hydrocarbonée et d_h est l'épaisseur des têtes polaires. R_w s'exprime sous la forme :

$$R_w = \frac{3V_{aq}[H_2O]}{\sigma[S]} \quad \text{Équation I.6}$$

Avec V_{aq} le volume d'eau occupé dans la micelle, σ la surface occupée par la tête polaire du tensioactif et $[S]$ la concentration en tensioactifs.

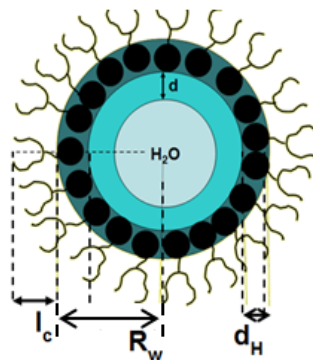


Figure I. 12: Structure d'une micelle inverse.

Ce modèle géométrique simple permet de démontrer la proportionnalité entre le rayon de la micelle et le paramètre W . R_w va ainsi augmenter linéairement avec la quantité d'eau si la concentration en tensioactifs reste fixe.

I.2.b. Réaction de *co*-précipitation en microémulsion

I.2.b.i. Principe

Dans le cadre de la synthèse de nanoparticules en microémulsions inverses, celles-ci peuvent jouer un rôle de gabarit (les « nanoréacteurs ») et limiter les réactions chimiques telles que les réactions catalytiques²³, la *co*-précipitation²⁴ ou les réactions de Maillard²⁵. Dans le cas de la *co*-précipitation, la réaction chimique se produit généralement après mélange de deux microémulsions initiales contenant chacune l'un des deux réactifs piégé dans le cœur aqueux. Ces systèmes étant dynamiques, le mouvement Brownien est responsable de collisions entre gouttelettes qui conduisent à des dimères et au processus d'échange intermicellaire. L'échange intermicellaire entre le cœur de deux micelles est très rapide (à l'échelle de la microseconde) et permet la réaction chimique entre les réactifs conduisant à la formation de molécules finales (produit de la réaction). L'étape suivante est la fission du dimère conduisant d'une part à une micelle contenant le produit et d'autre part à une micelle « vide » contenant exclusivement de l'eau. Le mécanisme général de la synthèse de nanoparticules en microémulsion inverse est schématisé dans la Figure I.13.

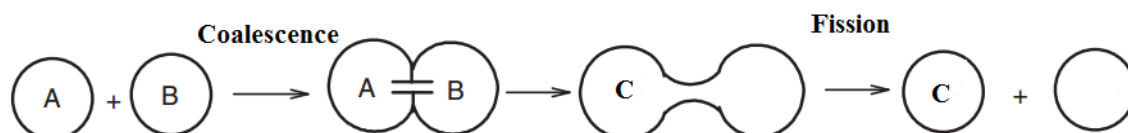


Figure I.13: Mécanisme de Formation de précipitation dans la micelle inverse.

Un dimère est thermodynamiquement instable, son temps de demi-vie a été estimé entre 10^{-3} et 10^{-2} secondes²⁶ et toutes les collisions entre gouttelettes ne forment pas systématiquement des dimères. Les réactions de *co*-précipitation, la nucléation et la formation de particules dépendent donc fortement des propriétés du film de tensioactifs. L'un des paramètres est la flexibilité du film qui lui permet de se réorganiser plus ou moins facilement comme indiqué par la Figure I.14²⁷. La courbure du film associée à cette flexibilité dépend du type de tensioactif, des conditions thermodynamiques, de la nature de la phase organique, du rapport w et de la présence d'excipients tels que des polymères ou des *co*-surfactants (des alcools par

exemple). De plus, elle affecte directement le taux d'échange intermicellaire qui est désigné par le coefficient d'échange (k_{ex}).

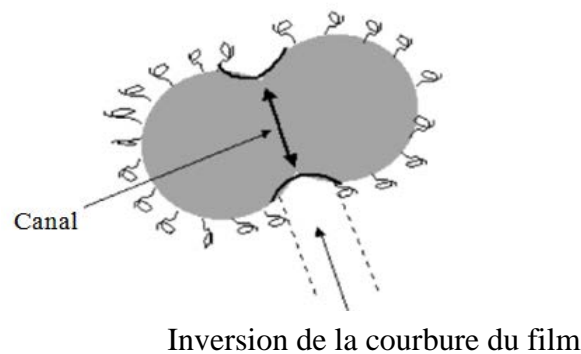


Figure I.14 : Représentation schématique d'un dimère formé après collision de deux gouttelettes.

A titre d'exemple, l'analyse temporelle de la précipitation du carbonate de calcium (CaCO_3) en microémulsions inverses a été effectuée par Rauscher *et al.*²⁴. Ils ont estimé des temps pour chaque processus : la réaction chimique (10^{-12} - 10^{-8} sec), l'échange intermicellaire (10^{-8} - 10^{-3} sec), la nucléation (10^{-12} - 10^{-8} sec) et la croissance des particules (10^{-3} - 10^{-1} sec). Nous pouvons alors considérer que les particules produites sont formées instantanément et que c'est l'échange intermicellaire qui limite la réaction puis la nucléation.

1.2.b.ii. Influence des paramètres expérimentaux

Effet du rapport w

L'influence du rapport w a été étudié intensivement par plusieurs équipes de recherche (*e.g.* Pileni *et al.*²⁸, Lopez-Quintela *et al.*²⁹) en tant que paramètre d'importance pour le contrôle de la taille et de la morphologie des particules obtenues par microémulsions inverses^{30,31}. De manière générale, c'est toute la cinétique de formation des particules associée aux étapes de réaction chimique (limitée ou pas par l'échange micellaire), de nucléation et de croissance des particules qui dépend du rapport w³².

A l'échelle nanométrique, une diminution de w augmente la rigidité du film, réduit l'échange intermicellaire, diminue le temps de vie du dimère et la taille du canal intermicellaire et conduit ainsi à la production de particules monodisperses de taille petite. Inversement, la taille et la polydispersité peuvent augmenter jusqu'à une valeur limite pour laquelle l'ajout d'eau n'influence plus les caractéristiques physico-chimiques des particules. C'est le cas des

particules de cuivre produites dans des microémulsions à base d'AOT³³. Cependant, il est à noter que cette tendance ne peut s'appliquer à tous les types de nanomatériaux.

Effet de la concentration des réactifs

De manière générale, la concentration en réactifs a un effet important sur la taille, la polydispersité, la forme, la cinétique de formation et la cristallinité des particules finales. La taille des particules peut augmenter de manière linéaire avec cette concentration^{34,35} pour des quantités initiales stœchiométriques mais cette règle n'est pas générale. Si l'un ou l'autre des réactifs est en excès, les interactions organiques-inorganiques à l'interface entre particules primaires et films de tensioactifs sont considérablement modifiées. Ainsi la forme, la cristallinité des particules finales et l'apparition éventuelle de formes complexes hybrides de taille micrométrique peuvent être considérées. Historiquement, cela a d'abord été démontré sur des nanoparticules d'oxydes de Ba₂CrO₄ et Ba₂SO₄^{36,37} avant d'être largement discuté dans les revues^{38,39}. Une autre étude récente montre aussi que pour BaSO₄, des proportions initiales stœchiométriques (ou proches de la stœchiométrie) conduisent à la formation de nanoparticules sphériques dont la taille est limitée par le film de tensioactifs⁴⁰. Lorsque l'un des réactifs est en excès, la concentration en électrolytes dans les micelles augmente et perturbe le film de tensioactifs ce qui aboutit à des particules en forme de cubes ou de plaquettes.

Ajout d'électrolytes/ molécules additives

Comme indiqué précédemment, l'utilisation d'un réactif en excès modifie considérablement les interactions organiques-inorganiques. De manière générale, c'est aussi le cas lorsque des électrolytes ou des additifs sont volontairement ajoutés dans la phase aqueuse. Selon les ajouts, il peut y avoir perturbation du film de tensioactifs et stabilisation (ou non) de certaines faces cristallographiques avec comme conséquence que la taille et la forme des particules finales peut très rapidement varier dans un faible intervalle de compositions des microémulsions initiales^{41,42}. A titre d'exemple, l'adsorption sélective de molécules ou d'ions sur différentes facettes d'un nanocristal affecte la croissance cristalline dans certaines directions⁴³. De la même manière, l'effet du pH a été discuté sur la forme de ferrites de NiZn nanostructurés⁴⁴. A pH acide, des nanocristaux en forme d'aiguille se forment alors que des sphères sont observées à pH plus élevé. Il est à noter que tous ces aspects seront aussi discutés

dans le chapitre II en ce qui concerne la synthèse de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ en microémulsions avec ajout ou non de molécules de PEG et pour différentes valeurs de w .

Effet du solvant

La flexibilité du film de tensioactifs dépend également de la nature du solvant organique (apolaire), elle affecte la taille finale des nanoparticules. Historiquement, Pileni *et al.*²² ont observé que l'isooctane permet d'obtenir des nanoparticules d'argent de taille plus importante qu'avec le cyclohexane. De même, des études ultérieures montrent que la nature du solvant affecte le taux de la croissance, la taille finale des nanoparticules et la polydispersité^{45,46} de nanoparticules de chlorure d'argent et de cuivre.

Ces différences notables proviennent d'une différence significative du taux d'échange intermicellaire qui varie d'un facteur de dix entre les deux solvants^{47,48}. En effet, les molécules de cyclohexane pénètrent plus facilement entre les chaînes hydrophobes du tensioactif (AOT) en raison de son faible volume moléculaire ce qui augmente la rigidité du film de tensioactif. Au contraire l'isooctane a un volume moléculaire plus important ce qui rend l'interface plus flexible. Cela favorise la nucléation d'un grand nombre de petites particules qui s'arrêtent de croître lorsque l'ensemble des réactifs est consommé.

Cet effet du solvant a également été rapporté avec l'utilisation d'un tensioactif cationique comme le CTAB et le butanol en tant que *co*-surfactant⁴⁹. Des particules plus grosses ont été obtenues avec le n-octane par rapport à l'isooctane de volume moléculaire plus faible.

I.3. Synthèse en miniémulsion

Les nanoparticules structurées peuvent être préparées par la méthode de miniémulsion qui est une méthode attractive pour un large public académique et industriel⁵⁰. Une miniémulsion est un système colloïdal stable composé de deux phases non miscibles, une phase dispersée et une phase continue^{51,52}. Selon la nature de la phase dispersée et dispersante, la miniémulsion peut être directe (huile dans eau) ou inverse (eau dans huile). La technique de préparation de nanoobjets par miniémulsion est très polyvalente en raison des nombreuses possibilités réactionnelles dans les nanogouttelettes permettant ainsi l'obtention de nanoparticules polymériques, inorganiques, ou hybrides avec des tailles comprises entre 50 et 300nm, comme l'ont rapporté Landfester *et al.*⁵³. Les réactions mises en jeu peuvent être des réactions de polymérisation²⁵, de cristallisation⁵⁴ ou encore de polycondensation⁵⁵. Par exemple, la réaction de polymérisation radicalaires en miniémulsion permet la préparation de nanoparticules polymériques (des latex), de nanoparticules hybrides et de composites de taille et de morphologie contrôlées⁵⁶.

La décomposition des amorceurs de polymérisation hydrophobes ou hydrophiles tels que le potassium *persulfate* (*KPS*) et l'azo-bis-isobutyronitrile (*AIBN*) génère des radicaux dans le milieu. Ces derniers amorcent la réaction de polymérisation composée d'une première phase de nucléation, d'une phase de propagation permettant de générer des oligomères, et d'une étape de terminaison concluant la polymérisation. La charge des particules finales peut être définie par la nature chimique de l'amorceur. L'étape d'émulsification, la concentration et la nature du tensioactif, l'agent de pression osmotique sont des éléments clés dans le contrôle des paramètres physico-chimiques des particules finales.

I.3.a. Étape d'émulsification

L'étape d'homogénéisation (émulsification) nécessite un apport important d'énergie qui permet la déformation et la rupture des gouttelettes. Ces phénomènes peuvent être générés par des techniques de cisaillement fort (ultraturax). Cependant pour l'obtention de gouttelettes de taille fine et de distribution homogène, l'utilisation d'équipements hautement énergétiques est nécessaire. A l'échelle du laboratoire les sondes à ultrasons ont été largement décrites comme une méthode d'émulsification efficace⁵⁷. Pour la production de quantités plus importantes, les homogénéisateurs à haute pression sont privilégiés⁵⁸. L'émulsification par ultrasons est principalement gouvernée par des phénomènes de cavitation⁵⁹. Des bulles générées créent des ondes de choc et la formation de jets de liquide de grande vitesse⁶⁰. De manière générale, l'augmentation de la durée de traitement aux ultrasons conduit à une diminution de la taille

des gouttelettes et par conséquent à l'augmentation de l'interface huile/eau. Ainsi, la quantité de tensioactif apparaît être d'une grande importance dans les phénomènes de recouvrement interfaciale et influe donc la stabilité colloïdale des miniémulsions générées. La miniémulsion atteint une taille de gouttelettes minimale qui est principalement fonction de la nature et de la quantité des différents composants et de l'énergie apportée⁶¹. La taille des nanogouttelettes évolue rapidement sous l'effet des ultrasons avant d'atteindre un état pseudo-stationnaire. À concentration en tensioactif fixe (généralement inférieur ou égale à la CMC), la taille et la distribution de taille est contrôlée par un équilibre de vitesse de fusion et de fission des gouttelettes permettant une diminution de la polydispersité des gouttelettes et l'obtention d'un état stationnaire (cf. Figure I.15)⁶².

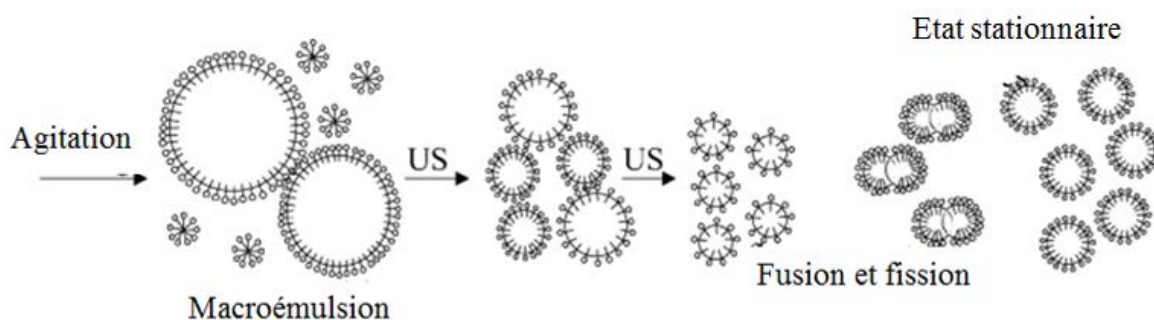


Figure I.15 : Schéma de la formation d'une miniémulsion par ultrason.

I.3.b. Stabilité de la miniémulsion

La nature et la quantité de tensioactif employé pour préparer les miniémulsions préviennent la coalescence des gouttelettes et donc contrôlent la stabilité colloïdale de la dispersion. Le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un tensioactif ionique largement décrit dans la littérature comme modèle pour préparer des miniémulsions directes^{63,64}. Récemment, des travaux montrent que les tensioactifs cationiques et non-ioniques peuvent être utilisés efficacement pour obtenir des miniémulsions stables et des particules finales exposant une distribution de taille étroite après polymérisation. Le span[®]80, l'AOT et le copolymère poly(éthylène-*co*-butylène)-*b*-poly(oxyéthylène) (cf. Figure I.16) ont été utilisés pour préparer les miniémulsions inverses^{61,65,66}. Ce copolymère est un tensioactif non-ionique comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe d'une masse de 3700 g/mol chacune. Il a été démontré que ce copolymère est plus efficace en raison de sa structure macromoléculaire qui apporte une forte stabilisation stérique, cette stabilisation est prédominante dans le cas des miniémulsions inverses.

Poly(éthylène-co-butylène)-*b*-poly(oxyde éthylène)

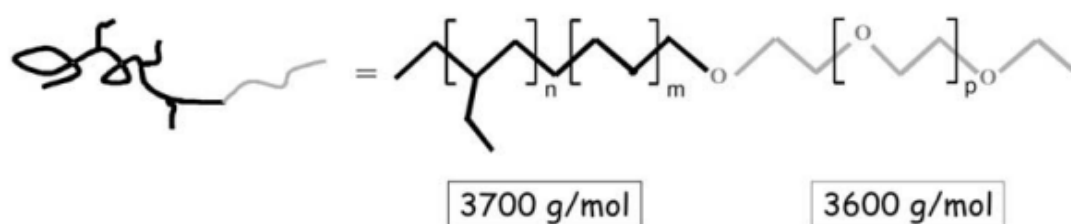


Figure I.16 : Représentation schématique du copolymère block amphiphile employé pour la miniémulsion inverse⁶¹.

De plus, le mûrissement d'Ostwald peut être limité par l'ajout d'agent de pression osmotique, hydrophobe pour les miniémulsions directes (hexadécane) et hydrophiles pour les miniémulsions inverses (chlorure de sodium). La particularité des agents de pression osmotique est de présenter une faible solubilité dans la phase continue afin d'augmenter la pression de Laplace au sein des gouttelettes et donc augmenter la stabilité colloïdale. L'agent de pression osmotique ne peut pas diffuser d'une gouttelette à l'autre et est piégé dans chaque gouttelette, fournissant ainsi une pression osmotique à l'intérieur des gouttelettes, ce qui s'oppose à la pression de Laplace⁶⁷.

I.3.c. Principe de synthèse

Le principe primordial de la miniémulsion est de transformer des nanogouttelettes obtenues par émulsification en particules. Ce principe est basé sur la suppression des phénomènes de déstabilisation classiquement observées dans des émulsions (coalescence et mûrissement d'Ostwald). Le procédé de synthèse en miniémulsion inverse utilisé dans nos travaux découle de la microémulsion inverse. Dans la microémulsion la réaction chimique permettant la formation d'iodate de fer est générée par l'étape d'émulsification. Au contraire, le mélange de deux miniémulsions inverses contenant les réactifs ne conduit à aucune formation de particules d'iodate de fer, la seconde étape d'émulsification par l'ultrason induit la réaction chimique dans les gouttelettes (cf. chapitre II et III).

La synthèse des nanoparticules d'iodate de fer, d'une part par la méthode de miniémulsion inverse et d'autre part, par la microémulsion inverse a été représentée schématiquement dans la Figure I.17.

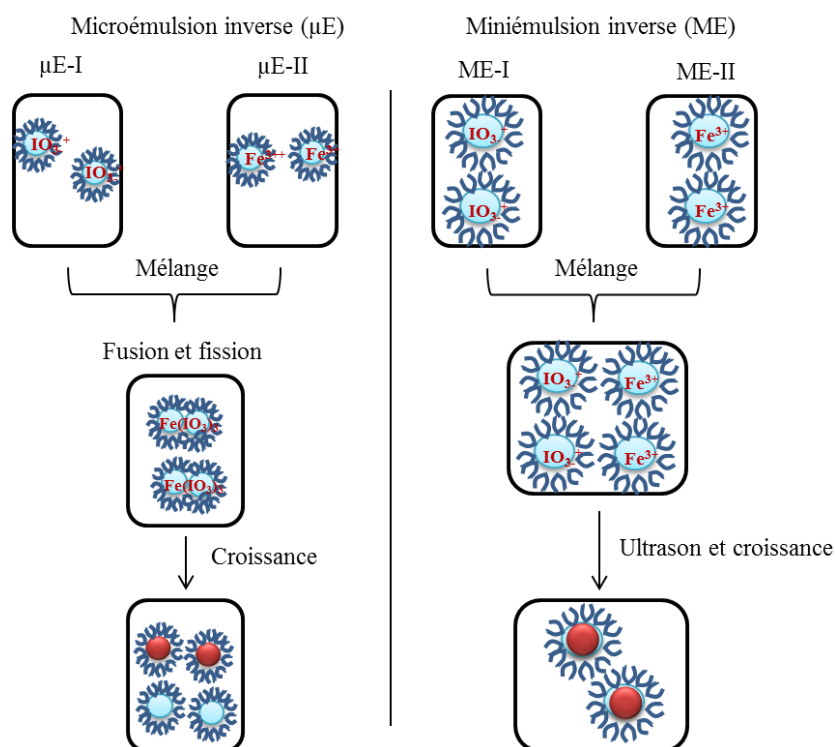


Figure I.17 : Représentation schématique de la formation des nanoparticules d'iodate de fer par la méthode de microémulsion inverse et miniémulsion inverse.

Le Tableau I.1 rassemble des données comparatives caractéristiques des procédés de microémulsion et de miniémulsion.

Tableau I.1 : Comparatif de deux méthodes de synthèse de nanoparticules inorganiques (microémulsion vs miniémulsion).

Microémulsion	Miniémulsion
Spontanée	Fragmentation à haute énergie
Tension interfaciale très proche de zéro	Tension interfaciale supérieure de zéro
Quantité importantes en tensioactif (très supérieure de la CMC)	Quantité faible en tensioactif (inférieure ou égale à la CMC)
Généralement nécessite l'ajout de co-tensioactifs	Ne nécessite pas l'ajout du co-tensioactif
Taille comprise entre 5 et 50 nm	Taille comprise entre 50-300 nm
Présence des processus de coalescence et de fission	Stabilité contre la coalescence et le mûrissement d'Ostwald
Nombre de micelle n'est pas égale au nombre de particules (nucléation secondaire)	Le nombre des gouttelettes égale au nombre de particules finales (nucléation primaire)

II. Synthèse et encapsulation de nanoparticules inorganiques

Cette deuxième partie du chapitre traite l'état de l'art portant sur les applications biomédicales des nanoparticules inorganiques. Cette étude bibliographique est traitée sous la forme de deux articles de revue en anglais, précédés pour chacun d'entre eux par une synthèse en français.

II.1. Revue n°1: “*Individual inorganic nanoparticles: preparation, functionalization and application for in vitro biomedical diagnostic*”

Les nanoparticules sont utilisées dans des domaines très variés et en particulier pour les bionanotechnologies. Dans ce domaine, différents types de particules colloïdales (organiques, inorganiques, hybrides et composites) sont exploitées. Par exemple, nous pouvons citer les particules à propriétés magnétiques ou fluorescentes, les colloïdes conducteurs, les nanogels stimulables, les latex, les vésicules, les capsules, l'or colloïdal etc... Ces particules sont d'ores et déjà exploitées dans un grand nombre d'applications en relation directe avec la santé humaine.

Dans la plupart des cas, les particules sont utilisées comme outils de détection et/ou moyens de transport dans les microsystèmes, l'imagerie biomédicale, le tri cellulaire, la préparation d'échantillons et comme vecteur dans le domaine thérapeutique. Deux propriétés (magnétique et photophysique) sont largement exploitées dans le diagnostic biomédical à tous niveaux. Le caractère magnétique permet de réduire et d'accélérer les étapes de lavage et de concentration tout en facilitant le transport indispensable dans les microsystèmes et ceci grâce à l'utilisation d'un simple aimant ou électroaimant. Le caractère photophysique facilite la détection et la quantification des cibles (protéine, acide nucléique, virus, bactérie, cellules...). Les particules présentant ces propriétés sont généralement inorganiques.

La préparation de nanoparticules inorganiques a suscité une attention particulière ces dernières décennies. Les nanoparticules les plus utilisées et les plus rapportées dans la littérature sont les oxydes de fer. Ces oxydes sont essentiellement préparés par *co*-précipitation de deux sels, un sel ferreux et un sel ferrique en milieu fortement basique. Il est ainsi possible d'obtenir des oxydes de fer de taille nanométrique (taille moyenne comprise entre 5 et 12nm), qui peuvent être cationiques ou anioniques en fonction de la formulation élaborée. Les propriétés magnétiques dépendent principalement de la nature d'oxyde obtenu et par conséquent du rapport molaire des deux sels et de la température du milieu réactionnel. Il existe d'autres méthodes de synthèse plus complexes qui permettent d'avoir des oxydes de tailles, de morphologies et de propriétés physiques contrôlées.

La silice colloïdale est préparée en utilisant le procédé sol-gel qui permet d'obtenir des particules de tailles variables. Ce procédé de préparation est basé sur l'utilisation de dérivés silanes (le tetraethylorthosilicate, TEOS) qui précipitent en milieu basique suite à une réaction de polycondensation. L'utilisation d'un stabilisant permet de contrôler la taille finale des particules.

Les nanoparticules métalliques (nanoparticules d'or ou d'argent) ont été largement étudiées pour la recherche sur le cancer au cours des dernières années en raison de leur synthèse facile, des possibilités de modification de leur surface, de leurs propriétés optiques intéressantes ainsi que leur excellente biocompatibilité. La méthode la plus utilisée pour la fabrication de ces nanoparticules est la précipitation dans la phase aqueuse. Cette méthode consiste à solubiliser des sels métalliques dans l'eau (acide tétrachloraurique ou nitrate d'argent) suivie par une réduction. La nature de l'agent réducteur a démontré un effet remarquable sur les caractéristiques des particules. Plusieurs agents réducteurs ont été étudiés pour contrôler la taille et améliorer la stabilité colloïdale des nanoparticules. Parmi les plus connus nous pouvons citer le citrate de sodium ainsi le borohydrure de sodium. Récemment, de nouvelles approches plus « environnementales » ont été développées afin de minimiser les déchets organiques, en réduisant au maximum l'emploi de produits toxiques (les solvants) et en utilisant des réactions rapides et efficaces.

Les quantum Dots ou boîtes quantiques sont des nanocristaux semi-conducteurs de très faibles dimensions (CdSe, CdS, CdTe, ZnSe, ZnO, ZnS, GaN, GaP, GaAs et InAs). Ils peuvent être préparés en milieu dispersé en présence d'un support solide tel qu'une matrice polymère. Le procédé le plus simple consiste à contrôler la formation des nanocristaux en présence d'agents stabilisants en milieu micellaire direct ou inverse. Par exemple, la synthèse de sulfure de cadmium (CdS) a été réalisée en utilisant un mélange de sels de Cd^{2+} et S^{2-} dans le méthanol en présence d'un agent stabilisant. La taille des nanocristaux, qui contrôle les propriétés optiques, dépend de la nature physico-chimique du milieu.

Les particules de génération de second harmonique, au centre de nos travaux de thèse, ont été proposées plus récemment comme une nouvelle génération de sondes pour l'imagerie biomédicale. La génération de second harmonique est un processus non-résonant par lequel deux photons de fréquence ω se combinent pour former un photon à 2ω . Excité par un laser émettant par exemple à 800nm, une particule génère un signal de second harmonique à 400nm (la longueur d'onde divisée par deux) qui peut être exploité pour la détection. L'efficacité de

cette émission est très faible en comparaison avec la fluorescence. Cependant, les techniques de microscopie optique non-linéaire se sont considérablement développées ces dernières années : l'utilisation de lasers femtosecondes permet une détection aisée de ces nanosondes SHG. Les principaux avantages liés à ces sondes proviennent du caractère non-résonant de la génération de second harmonique :

- (i) Accordabilité en longueur d'onde : les sondes peuvent être excitées dans le proche infrarouge par exemple, permettant une séparation spectrale aisée avec les signaux parasites issus de l'échantillon biologique et également d'imager les tissus sur une grande profondeur de pénétration ;
- (ii) Photostabilité : dans les conditions standards d'excitation, les sondes montrent une grande stabilité de l'émission permettant de suivre des processus biologiques sur un long terme. D'autre part, les sondes ne présentent pas de phénomène de clignotement (« blinking ») comme cela est observé pour les quantum dots.

Du point de vue matériau, ces sondes sont constituées de nanoparticules cristallines de structures non-centrosymétriques, condition indispensable à l'observation d'un signal SHG. Actuellement, les nanocristaux utilisés par les différents groupes de recherche impliqués dans cette thématique sont d'une part, des quantum dots comme le CdSe ou CdS qui ont d'excellentes propriétés de SHG mais présentent une toxicité élevée et d'autre part, des oxydes comme le ZnO, le KNbO₃, le BaTiO₃, le KTP ou le Fe(IO₃)₃. Il est intéressant de noter que peu de travaux ont décrit la synthèse spécifique de nanocristaux non-centrosymétriques, ce qui constitue l'originalité de nos travaux de recherche.

La fonctionnalisation des nanoparticules inorganiques est largement rapportée dans la littérature et répond à des attentes multiples et complémentaires. Cela consiste à modifier la surface des nanoparticules par des groupements fonctionnels tels que les thiols, les amines, les carboxyles ou encore les hydroxy. Cette modification peut apporter certains avantages tels que l'augmentation de la stabilité physico-chimique ou la spécificité de ciblage. De nombreuses méthodes de fonctionnalisation des nanoparticules inorganiques ont été étudiées :

- La modification par « échange et ajout de ligands » lors de la synthèse, comme par exemple dans le cas de nanoparticules d'or ;
- L'adsorption de polymères à la surface par interactions électrostatiques, comme par exemple dans le cas de nanoparticules magnétiques ;
- Le greffage covalent réalisé par des réactions chimiques à la surface des particules (Click Chemistry) ;

- La silanisation des particules avec formation d'une couche de silice autour des particules ;
- L'encapsulation par un polymère en miniémulsion, en microémulsion, en dispersion.

Ces particules inorganiques sont largement utilisées dans des applications biomédicales *in vitro*. Les applications des nanoparticules colloïdales, en particulier celles discutées dans la revue, sont multiples : marquage, traçage et imagerie et détection ou la livraison véhiculée. Les nanoparticules d'oxyde de fer magnétique ont été largement utilisées pour la séparation et la purification de biomolécules, comme sondes pour l'identification et l'hybridation d'ADN/ARN et pour la détection de protéines, d'acides nucléiques, de virus et de bactéries. Les nanoparticules d'or peuvent être utilisées en tant que marqueurs de spectroscopie afin de cibler des acides nucléiques et des protéines. Pour détecter et marquer les cellules, les quantum dots sont utilisées comme sondes luminescentes en imagerie biomédicale. Les nanosondes de génération de seconde harmonique peuvent contourner les problèmes rencontrés en utilisant des marqueurs fluorescents conventionnels (photoblanchiment et clignotement). De plus, ce type de nanosondes est adapté pour l'imagerie des tissus en profondeur sans affecter ou endommager le système biologique.

La revue ci-jointe présente un état de l'art plus large et plus détaillé des nanoparticules inorganiques les plus utilisées dans le biomédical et en particulier dans les bionanotechnologies.

Individual inorganic nanoparticles: preparation, functionalization and *in vitro* biomedical diagnostic applications

R.Ladj^{1,2}, A. Bitar¹, M. Eissa^{1*}, Y. Mugnier², R. Le Dantec², H. Fessi¹, A. Elaissari¹

¹) University of Lyon, F- 69622, Lyon, France; University of Lyon-1, Villeurbanne, CNRS, UMR 5007, LAGEP-CPE-308G, 43 bd. du 11 Nov.1918, F-69622, Villeurbanne, France.

²) SYMME, Université de Savoie, BP 80439, 74944, Annecy Le Vieux Cedex, France.

* Corresponding author: e-mail: mm.essa@nrc.sci.eg
Phone: +33-472431841, Fax: +33-472431682

Abstract

Inorganic nanoparticles become the focus of modern materials science due to their potential technological importance, particularly in the bionanotechnology, which stems from their unique physical properties including size-dependent optical, magnetic, electronic, and catalytic properties. The present article presents an overview on the currently used individual inorganic nanoparticles for *in vitro* biomedical domain. These inorganic nanoparticles include iron oxides, gold, silver, silica; quantum dots (QDs) and second harmonic generation (SHG) particles. For each of these interesting nanoparticles, the main issue starting from preparation, until bio-related applications are presented.

1. Introduction

In the past decades, considerable attention has been paid to the use of inorganic nanoparticles in various technological fields, particularly in bionanotechnology. The main advantage of inorganic nanoparticles is attributed to their intrinsic properties such as optical and superparamagnetic properties as well as some biological activities (i.e. anti-bacteria or specific interactions...)¹. Indeed, these inorganic nanoparticles are commonly used as solid phase supports for the immobilization of biomolecules such as oligonucleotides, peptides, ligands, proteins or antibodies. Due to their interesting properties, numerous efforts have been devoted to the synthesis of such nanoparticles using various approaches². Interestingly, the specific optical or magnetic features of the inorganic nanoparticles are sometimes exploited and integrated in Microsystems in order to elaborate medical devices providing fast analysis

with high sensitivity for low volume analyte, similar to that existing in large-scale analysis equipments. Such systems are called micro-Total Analysis Systems (μ -TAS) in which all steps are concentrated in one device³. Indeed, tools, devices and systems with highly automated operations are highly needed in biomedical diagnostic, clinical analysis and nanomedicine. In addition, the small size and robust mechanics are important for routine applications, easy-to-use portable devices, as well as low price and low running costs. The present review focuses on some interesting inorganic nanoparticles, which have fascinating properties and found promising application in the biotechnological field. In addition, the various synthesis approaches of these inorganic nanoparticles will also be mentioned in addition to some interesting applications *in vitro* biomedical diagnostic. These inorganic particles include iron oxides, silica, gold, silver, SHG-active nanoparticles and quantum dots.

2. Iron oxide nanoparticles

Magnetic nanoparticles exhibit many interesting properties that can be exploited in a variety of applications, including magnetic seals and inks, magnetic recording media, catalysts, ferrofluids and also in biomedical imaging, theranostics magnetic hyperthermia and targeted drug delivery⁴⁻²³. Among the iron oxides, magnetite (Fe_3O_4) or maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) are the most commonly used *in vitro* and *in vivo* diagnostic applications. This can be attributed to their superparamagnetic properties, biocompatibility and low toxicity in the human body, simple and low cost preparation. The individual magnetic nanoparticles have large constant magnetic moment and behave like a giant paramagnetic atom with a fast response to applied magnetic field with negligible remanence (residual magnetism)²³. Thus, the coupling of biomolecules (proteins, antibodies, antigens,... etc) to magnetic nanoparticles is exploited to achieve simple, rapid, and specific separation of biomolecules under the effect of an external magnetic field, as compared to the conventional filtration and centrifugation processes, which are laborious and time consuming^{24,25}. Accordingly, magnetic iron oxide nanoparticles have been extensively used in separation and purification of biomolecules, as probes for DNA/RNA hybridization and identification, and for protein and nucleic acids detection²⁶⁻³⁵. In addition, they are also used for *in vivo* diagnostic (Magnetic Resonance Imaging (MRI)), as nanocarriers in drug delivery systems, and therapeutic agents for cancer treatments^{5,6,9-15}. In order to be conveniently used in bio-related applications, the ideal magnetic supports should have high magnetic properties, small size and narrow size distribution, high surface functionality, well defined morphology, in addition to nontoxicity and biocompatibility²³. These characteristics can be achieved by optimization of the synthesis

process in order to prepare structured colloidal particles bearing a reactive shell with well defined properties³⁶.

2.2. Synthesis of aqueous iron oxide nanoparticles

During the last years, various efficient synthetic approaches have been used for preparation of highly stable and monodisperse magnetic nanoparticles. These techniques include, applied physical methods, for instance the gas phase deposition and liquid or wet phase method such as the sol-gel, hydrothermal, and water in oil (w/o) microemulsion routes⁴.

2.2.1 Gas phase deposition method

Gas phase deposition process is based on thermal decomposition (pyrolysis) of iron containing precursors (organometallic compounds or iron organic salts) at high temperature to precipitate iron particles from the gas phase³⁷ or by pyrolysis using laser beam³⁸ as shown in Figure (1). These techniques lead to formation of highly uniform magnetic nanoparticles, but with low yield. In addition they require using high-tech equipments, and in turn high cost.

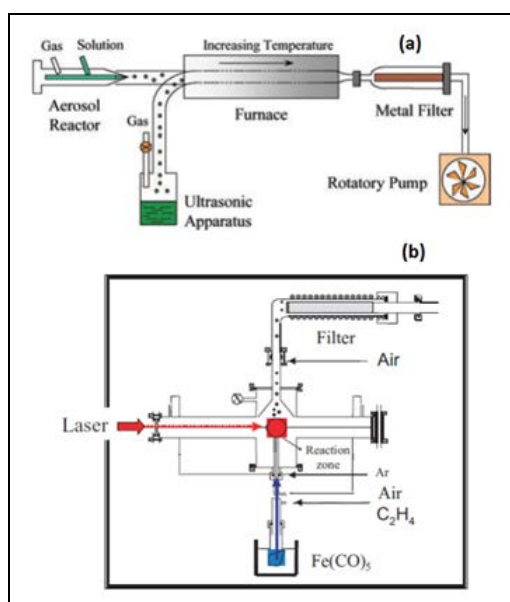


Figure 1. Schematic illustration of (a) spray and (b) laser pyrolysis processes for preparation of iron oxide nanoparticles⁷.

2.2.2 Sol-gel method

This method involves hydrolysis and condensation of metal alkoxides leading to dispersion of metal oxide particles in a sol, followed by drying or gelling through solvent removal or by chemical reaction²³. Usually, the hydrolysis process of alkoxide is carried out using acid or

base. Some iron oxides nanoparticles and their alloys have been prepared using this method to produce ferromagnetic bismuth iron oxide films, iron-doped titanium oxide thin films, iron oxide-alumina thin films and mixed iron oxides³⁹⁻⁴⁹. The rate of hydrolysis and condensation, pH of the reaction medium, temperature and solution composition have remarkable effect on the final properties of the obtained nanoparticles. However, the contamination from byproduct of reactions and the need of an annealing post-treatment of the products are disadvantages of this method.

2.2.3 High pressure hydrothermal method

This method relies on enforced hydrolysis and dehydration of iron salts (nitrates, sulfates, chlorides, acetates, etc) by water at elevated temperature and pressure. The obtained metal oxides have very low solubility in water leading to high supersaturated solution, and consequently very fine crystals are obtained⁵⁰. Particle size, shape and morphology of the obtained iron oxide particles are greatly affected by the reaction conditions including, type and concentration of iron salt and temperature. Many workers have used this method using different techniques for preparation of 10 nm in size iron oxide particles. These techniques involve the in situ precipitation of iron oxides within porous structures like porous carbon pellets^{9,51}. Another technique depends on synthesis of iron oxide nanoparticles by using continuous flow reactors. In this method, the flowing iron oxide solution is subjected to rapid heating through contact with super critical water in the reactor within residence time of 5-30 s in order to control crystal growth^{50,52-54}. Further techniques were published in the literature using this method⁵⁵⁻⁶².

2.2.4 Wet chemical method

This method is considered as the most widely used for the preparation of magnetic nanoparticles. In addition to the high yield obtained, it is very simple, low cost, and is more effective in controlling of the nanoparticles size and composition⁴. Synthesis of iron oxides nanoparticles, either magnetite (Fe₃O₄) or maghemite (γ-Fe₂O₃), is carried out through co-precipitation chemical reaction by simple addition of an alkali to aqueous Fe²⁺/Fe³⁺ salt solution under inert atmosphere with or without heating^{63,64}. Usually, for preparation of magnetite nanoparticles, a mixture of aqueous chloride solution of Fe²⁺ and Fe³⁺ at a molar ratio of 1:2 is used. The chemical reaction associated to the precipitation of magnetite is:



Physico-chemical properties of the synthesized magnetic nanocrystals depend mainly on the type of salt used (e.g. chlorides, sulfates, nitrates, etc), $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ratio, pH and ionic strength of the precipitation medium. Furthermore, saturation magnetization values of the obtained magnetite nanoparticles were experimentally determined to be generally lower than that of the bulk material. Generally, the obtained magnetite nanoparticles tend to aggregate into large clusters because of their large surface area and dipole-dipole interaction, which lead to reduction in their intrinsic superparamagnetic properties. Accordingly, the control and modification of magnetic nanoparticles surfaces are of paramount importance for bio-related applications, not only to prevent their agglomeration and improved colloidal stability (maintain their nanometric sizes), but also to enhance their water solubility, biocompatibility, biorecognition affinity and nonspecific adsorption to cells²³. In this regard, several approaches have been investigated for stabilization of iron oxide particles via modification of their surfaces using low molecular weight ligands like fatty acids (e.g., oleic acid), surfactants or functionalized polymers (synthetic or natural) like proteins, starch, nonionic detergents or polyelectrolytes⁶⁵.

2.2.5. *Water in oil (w/o) microemulsion method*

A micro emulsion is a thermodynamically stable dispersion of two immiscible liquids, where the microdomain of either or both liquids is stabilized by an interfacial film of surfactant⁶⁵. Water in oil (w/o) microemulsions consist of nanosized water droplets dispersed in an oil phase and stabilized by surfactant molecules at water/oil interface (Figure 2). The surfactant-covered water pools offer a unique environment for formation of nanoparticles of tailored size and shape. Accordingly, various magnetic nanoparticles were prepared using this method such as iron oxide nanoparticles^{66,67}, magnetic polymeric iron oxide nanoparticles and silica-coated iron oxide nanoparticles. A variety of surfactants have been commonly used such as bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT), sodium dodecyl sulfate (SDS), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), and polyvinylpyrrolidone (PVP)⁶⁸⁻⁷⁶. The two-microemulsion method is the most commonly used approach in the synthesis of inorganic particles: reactants are first separately dissolved in the aqueous phase of two identical w/o microemulsions, and after mixing, a succession of elementary steps including the chemical reaction, the nucleation and finally the nanoparticle growth by autocatalysis and ripening can lead to the formation of nanoparticles with adjustable size. Size control and the dynamics of nanoparticle formation can be achieved by varying, for instance, the droplet size, the initial concentration of reactants and the nature of surfactants⁶⁷.

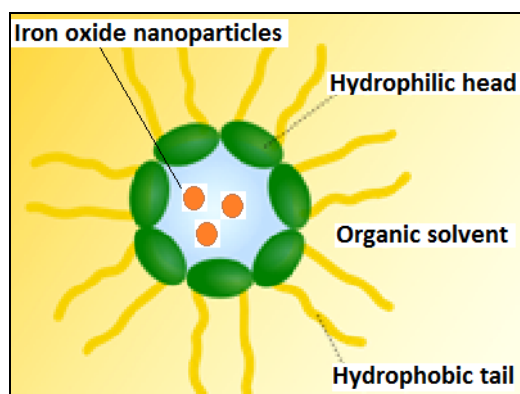


Figure 2. Water in oil (w/o) micro-emulsion droplet containing iron oxide nanoparticles.

2.3 Phase transfer: Synthesis of iron oxide nanoparticles containing surfactant (ferrofluid)

The preparation of ferrofluids has been firstly reported by Rosenweig⁷⁷ and Papell⁷⁸. It has been focused on the elaboration of stable magnetic nanoparticles dispersions. Since then, and due to the original association of liquid and magnetic properties, numerous papers dealt with the study of ferrofluids and their use in various industrial^{79,80} and biomedical fields⁸¹. In order to achieve stable colloidal suspension of magnetic nanoparticles (ferrofluid) in organic or aqueous media, the surface of iron oxide nanoparticles is coated with carboxylate surfactants (e.g. lauric acid or oleic acid) or phosphonate and phosphate-based surfactants (e.g. hexadecylphosphonic acid, dodecylphosphonic acid). The most popular example is the coating of magnetic nanoparticles with oleic acid (C₁₈H₃₄O₂) in organic medium, e.g. octane⁸². Afterward, oleic acid-coated magnetic nanoparticles are transferred to surfactant aqueous solution under high agitation in order to get high colloidally stable magnetic ferrofluid in aqueous medium (Figure 3). The obtained magnetic ferrofluids (in organic or aqueous media) can be used as a template for further encapsulation with various types of polymers⁸³.

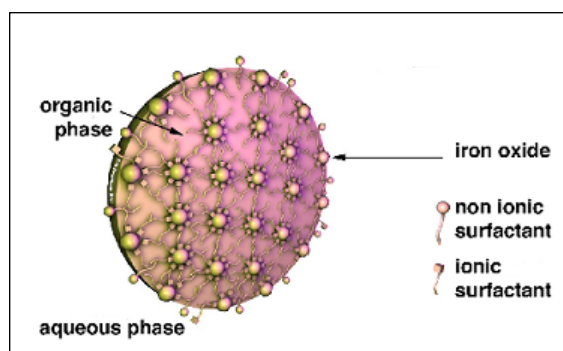


Figure 3. Ferrofluid droplet dispersed in aqueous medium⁸²

2.4. Biomedical applications

Magnetic particles have been largely used in numerous *in vitro* biomedical applications and principally in sample preparation and in bionanotechnology⁸². Various applications have been reported starting from iron oxide nanoparticles to micrometer-size magnetic latex particles. The use of magnetic particles is mainly motivated by the possible particles separation and particle guidance in microsystems, by using an external magnetic field. To be conveniently used in biomedical field, the particles should be chemically modified via specific surface chemistry, polymers adsorption or by their incorporation in colloidal polymer particles via chemical or physical encapsulation process⁶⁵. Basically, magnetic particles are mainly used as solid support of biomolecules in order to enhance the specific capture of the targeted biomolecules. For instance, the individual magnetic nanoparticles were conducted in specific capture and isolation of bacteria⁸⁴. In this context, iron oxide nanoparticles are first chemically modified with specific reactive shell by introducing commonly used functionalized compounds such as carboxylic acid, amines or thiols⁸². Then, the selected antibody (as anti-bacteria) is chemically grafted on the magnetic nanoparticles. These sensitive nanoparticles are then mixed with bacteria containing sample at a given buffer condition (i.e. pH, salinity). The recognized bacteria are then easily extracted using permanent magnetic field, whereas, the individual magnetic nanoparticles are less sensitive to the applied field, and consequently remain in the supernatant. The extracted bacteria can be used for extracting nucleic acid after bacteria growing step⁷.

Recently, Salmonella bacteria in milk were captured by antibody-conjugated magnetic nanoparticles (MNPs) and separated from analyte samples by applying an external magnetic field⁸⁵. The MNP–Salmonella complexes were re-dispersed in a buffer solution then exposed to antibody-immobilized TiO₂ nanocrystals (TNs), which absorb UV light. The assay exhibited high sensitivity toward low concentrations of Salmonella bacteria (Figure 4). The detection limit of Salmonella in milk was found to be more than 100 cfu mL⁻¹.

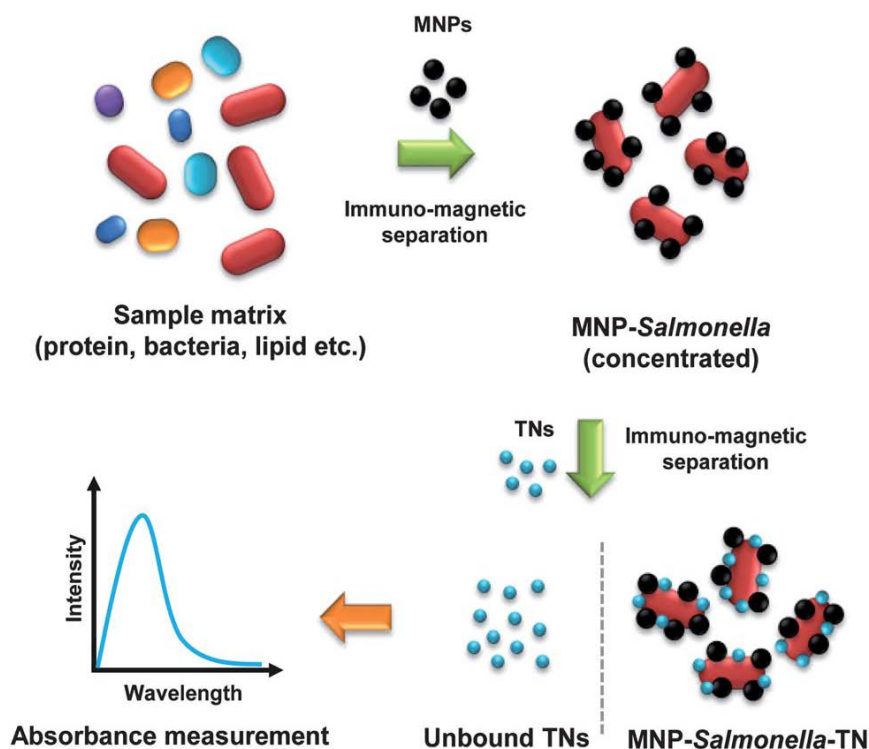


Figure 4: Schematic illustration for detection of the pathogenic bacteria using magnetic nanoparticles and optical nanoprobes⁸⁵.

Colloidal magnetic nanoparticles have been recently used as labels in magneto-resistive detectors. As reported by Schotter et al⁸⁶, this technology has been used in biomedical field for detection by exploring the possibilities offered by giant magneto-resistance (GMR), (Figure 5). For instance, streptavidin containing magnetic nanoparticles are used to detect biotin containing single stranded DNA fragment after hybridization with the capture probe which first immobilized on GMR surface. Using such approach, it was possible to detect DNA even at low concentration lower than 16 pg/ μ l⁸⁶.

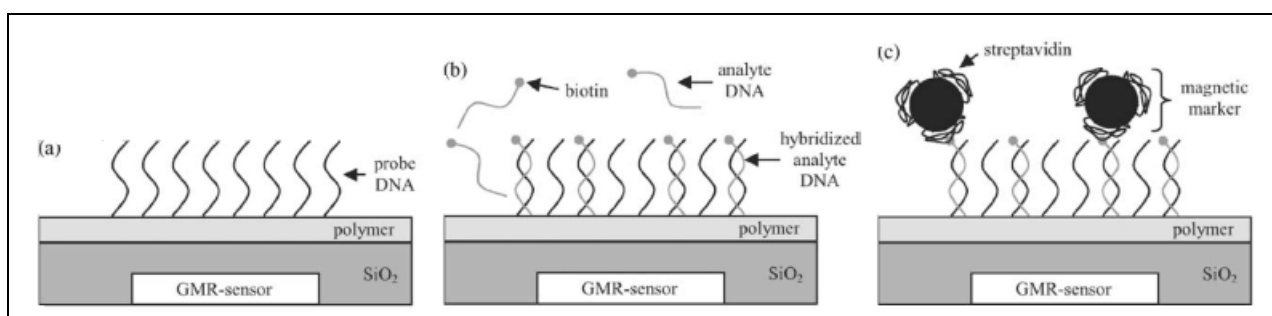


Figure 5: Schematic illustration of magneto-resistive biosensor for ssDNA detection via hybridization process. Adapted from⁸⁶.

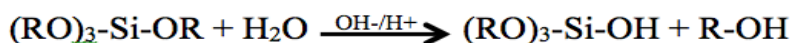
3. Silica nanoparticles

Silica nanoparticles (SiNPs) are considered as the mainstay-building unit in designing and development of nanostructures for large variety of applications. Thus, SiNPs have been widely used in polymer industries⁸⁷, research^{88,89}, and bionanotechnologies such as biomolecules adsorption^{90,91} and bioimaging⁹². Recently, bionanotechnology based on SiNPs developed and created novel techniques for treatment, imaging, drug delivery and diagnostic. The importance of SiNPs in biomedical applications is attributed to their unique characteristics such as the facile and inexpensive production, controlled particles size, biocompatibility and their highly active surfaces.

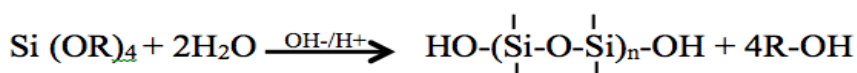
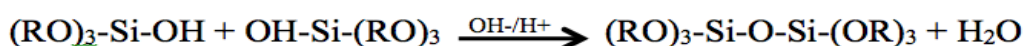
3.1. Synthesis

In general, sol-gel process is most commonly used for preparation of SiNPs with controlled size and narrow size distribution, which are very key factors in bionanotechnology. Silica particles, with size range from 0.05 to 2 μm , have been firstly prepared by Stöber et al.⁹³ using sol-gel process of tetraethylorthosilicate (TEOS) in presence of ammonia solution as a catalyst. Since then, thousands of articles have reported the synthesis of SiNPs using this method. Silica particles are usually obtained through two consecutive reactions, hydrolysis and condensation. The synthetic route of sol-gel process for preparation of silica particles from tetraethylorthosilicate (TEOS) is indicated in scheme (1).

1- Hydrolysis:



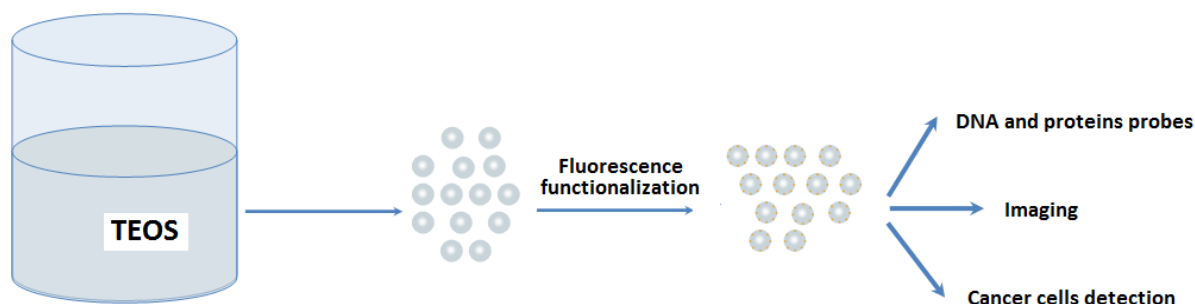
2- Polycondensation:



Scheme 1: Sol-gel process for preparation of silica particles

Sol-gel process is very sensitive to the experimental conditions that affect the rate of hydrolysis and condensation reactions. The effect of pH and catalyst type on hydrolysis and condensation of tetraethylorthosilicate (TEOS) was investigated by Cihlar⁹⁴. Both acid and base can catalyze the hydrolysis, whereas, at neutral medium (pH 7), the rate of TEOS hydrolysis was minimum. On the other hand, the condensation reaction rate in acidic

conditions becomes faster than when carried out in basic conditions. Scheme 2 shows the synthesis and potential biomedical applications of silica nanoparticles.



Scheme 2: Synthesis and biomedical applications of silica nanoparticles.

Another interesting method was developed for SiNPs preparation using the reverse microemulsion technique⁹⁵. This method is based on the hydrolysis of TEOS inside the water droplets, which contain the hydrolyzing catalyst, in oil phase. In general, ammonium hydroxide was used as a catalyst, and it was found that it had a remarkable effect on the morphology of silica particles obtained⁹⁶. Consequently, hundreds of articles extensively studied the reaction parameters which affect the formation of microemulsion, morphology, size and surface properties of the obtained SiNPs^{97,98}. Usually, during the hydrolysis reaction of TEOS, four alcohol molecules are produced. Venditti et al⁹⁹ studied the effect of produced ethanol during the hydrolysis of TEOS on the microemulsion structure. In another study, it was found that the morphology and the size of SiNPs obtained from sodium silicate by reverse microemulsion process are greatly affected by the presence of alcohol in the reaction media, in addition to the reaction temperature and sodium silicate concentration¹⁰⁰.

3.2. *In vitro* biomedical diagnostic by SiNPs

To be conveniently used in *in vitro* biomedical diagnostic applications, silica surface functionalization is of paramount importance. The primary surface-active silanol groups of SiNPs are advantageous for further conjugation with various affinity ligands or biomolecules, which broad their use in various biomedical applications^{89,101}. Generally, silica nanoparticles are used as support for other detectable materials such as fluorescent labels commonly used in bioimaging. Wang et al.¹⁰² reported SiNPs encapsulated with three organic dyes that can be stimulated by fluorescence resonance energy transfer (FRET). These fluorescent nanoparticles have multiple emission signatures excited by a single wavelength. Multicolor FRET silica nanoparticles are useful in biological applications such as in proteins and nucleic acids

detection. Similarly to fluorescent SiNPs prepared as efficient cell tags¹⁰³, fluorescein isothiocyanate (FITC) was used to label 30 nm SiNPs. Moreover, FITC-doped silica nanoparticles were used for cancer diagnostic and bioimaging⁹². FITC-SiNPs (80 nm in size) were conjugated with TAT (a cell penetrating peptide) and then treated with human lung adenocarcinoma (A-549). A specific labeling was observed demonstrating the sensitivity of these particles to detect cancer cells.

Moreover, SiNPs were applied also in photodynamic therapy and drug delivery in vitro study¹⁰⁴. Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) are well known as good drug carriers due to their surface construction, which allow carrying different molecules and drugs. In this context, authors prepared multifunctional MSNs, which can kill cancer cells by drugs and photodynamic therapy. The load ability of MSNs was useful to prepare fluorescent silica nanoparticles¹⁰⁵, which were used to study the drug release in vitro and the imaging for human cervical cancer cells (HeLa).

4. Gold nanoparticles

Gold nanoparticles (AuNPs) have unique properties including high surface-to-volume ratios, high dispersibility in a liquid medium, uniformity in size, optical and electrochemical properties and catalytic activity, in addition to other versatile features like chemical inertness, low toxicity, easy preparation, easy modification, and easy control of particle size. These properties have facilitated their use as key materials in biological and medical applications including bioseparations and immunoassay diagnostic. Therefore, gold nanoparticles have been extensively studied in many fields such as sensors¹⁰⁶, biosensors¹⁰⁷, drug and genes delivery^{108,109}, cancer therapy¹¹⁰ and imaging¹¹¹.

4.1. Synthesis

Like all other nanoparticles, various methods and techniques were used to prepare gold nanoparticles; most of them are based on the precipitation of gold ions from their salts, followed by surface modification to enhance their colloidal stability. Generally, HAuCl₄ aqueous solutions are used to synthesize gold nanoparticles¹¹² by reducing gold ions to metallic gold nanoparticles. Several reducing agents have been used to obtain Au nanoparticles from HAuCl₄ such as citric acid, sodium citrate¹¹³, gallic acid¹¹⁴ and luminal¹¹⁵. In addition, other methods are worth to be mentioned such as microwave power¹¹⁶, self reduction¹¹⁷, and more recently, the green synthesis of metallic gold nanoparticles from microorganisms^{118,119} and plant extracts^{120,121}.

4.2. Biomedical applications

Gold nanoparticles have large polarizability in the optical region with the consequence that spectroscopic enhancements such as Rayleigh Resonance (RR) and Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) can be fully exploited. RR spectroscopy was applied to study the incorporation of gold nanoparticles (2.5-4.5 nm) into the capsid of brome mosaic virus (BMV)¹²². Figure 6 presents the gold nanoparticles inside BMV virus. RR spectroscopy was chosen due to its sensitivity as demonstrated on single particles. This way of application can employ gold nanoparticles as spectroscopy markers, in order to target nucleic acids and proteins.

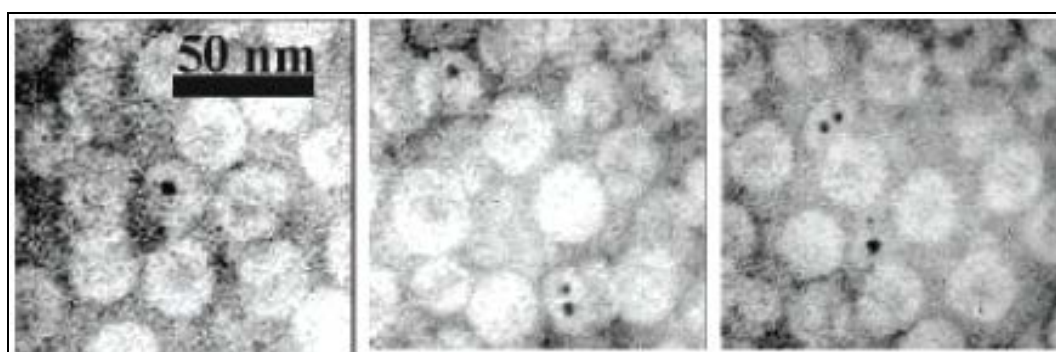


Figure 6: Transmission electron micrograph of gold nanoparticles enclosed in BMV virus dissociated and reassociated¹²².

Furthermore, chemiluminescence property of gold nanoparticles was also exploited and applied to detect proteins-gold bio-nancomposites¹¹¹. Proteins and antibodies were immobilized onto gold nanoparticles without any effect on the biological activity, so these gold bio-composite nanoparticles are used as powerful tools in immunoassay. As contrast agents, gold nanoparticles were widely used for bioimaging¹²³ due to their unique properties especially the biocompatibility even for in vitro applications. In pharmaceutical analysis by fluorescence, gold nanoparticles have been used to raise the sensitivity of levofloxacin (LVX) detection in commercial pharmaceutical tablets¹²⁴. The detection limit of LVX using gold nanoparticles rose up to $2,1 \times 10^{-10}$ mol/l.

5. Silver nanoparticles

Silver nanoparticles have a noble metallic nanostructure and because of their unique properties they are applied in many fields such as in catalysis¹²⁵, optics¹²⁶, nanotechnology^{127,128} and bioengineering¹²⁹. Silver nanoparticles were prepared via several

techniques such as chemical reduction¹³⁰, electrochemical methods¹³¹, photochemical methods¹³², irradiation¹³³ and biochemical methods¹³⁴.

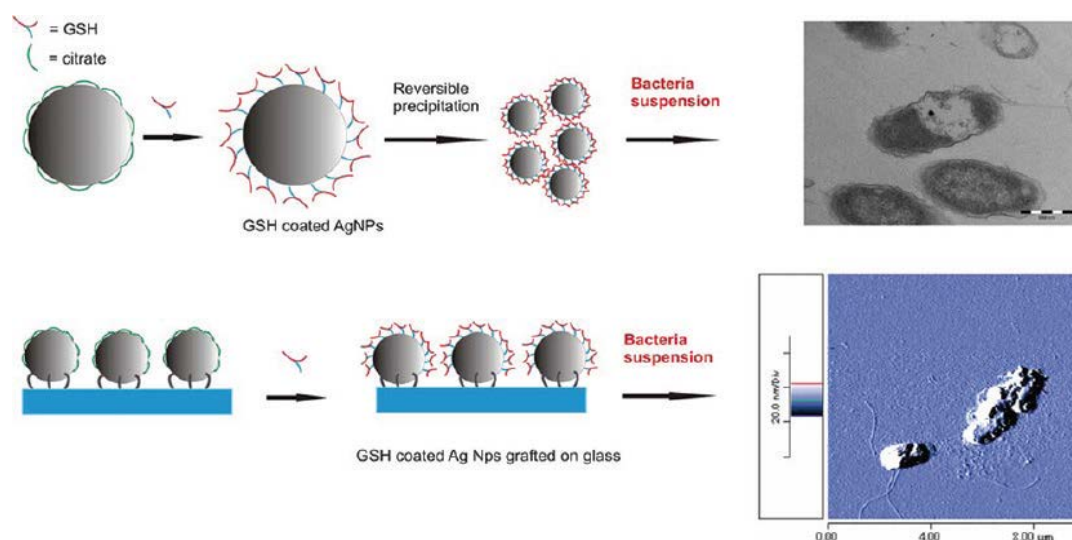
5.1. Synthesis

Like gold nanoparticles, metallic silver nanoparticles can be prepared by chemical reduction of silver ions (Ag^+) from a solution in presence of a reducing agent. The nature of reducing agent has remarkable effect on the particles characteristics. For instance, the use of a strong reductant such as borohydride¹³⁵ led to the formation of small and almost monodisperse particles, whereas, weak reducing agent such as citrate results in polydispers and larger particles¹³⁶.

Recently, a more interesting novel approach was developed to synthesize Ag nanoparticles, considering the environmental perspective; this is the green synthesis approach¹³⁷. By using this approach, less of organic solvents were used and instead Ag nanoparticles were precipitated in aqueous solutions of polysaccharides. In addition, Ag^+ ions can be precipitated in the biologic medium catalyzed by the biomolecules produced in this medium, such as enzyme, proteins, polysaccharides, amino acids and vitamins¹³⁸.

5.2. Biomedical applications

In addition to the previously mentioned characteristics of AgNPs, they are excellent substrates for surface enhanced Raman scattering^{139,140}, have high catalytic activity for accelerating some chemical reactions¹⁴¹ and the most important characteristic of silver NPs is that they are bactericide¹⁴². Consequently, hundreds of works reported their utilization as anti-bacteria. Scheme 3 presents the effects of two states of glutathione (GSH) coated silver nanoparticles, free and immobilized. It was found that free nanoparticles have more intense effect on bacteria than those who were immobilized. This is due to the nanoparticles penetration inside the cell cytoplasm, whereas the effect of immobilized nanoparticles stays superficial.



Scheme 3: Effect of free and immobilized glutathione (GSH) coated silver nanoparticles on *Escherichia coli*¹⁴².

Morones et al. defined the antibacterial activity of silver nanoparticles and proposed a mechanism of their action against bacteria (gram negative and gram positive)¹⁴³.

Silver nanoparticles cause oxidative damage for proteins on the membrane but not for DNA¹⁴⁴. Furthermore, the bactericidal effect of silver nanoparticles was tested on multidrug-resistant bacteria¹⁴⁵, and it was found that silver nanoparticles could inhibit the bacterial growth immediately after its contact with bacteria; it kills the bacteria via bactericidal mechanism, which was valid for large number of bacteria. Dal Lago et al.¹⁴⁶ tested two synthesized silver nanoparticles differ in size, small (8.5 nm) and large (11 nm). They found that the bactericidal activity of silver nanoparticles, tested on four bacteria, is dependent on their size; the smaller AgNPs in size has more bactericide effect than the larger one. Moreover, silver nanoparticles prepared via biological ways were used to prepare antimicrobial coating, wound dressing and biomedical devices¹⁴⁷. Recently, an interesting work elaborated new DNA-silver nanoclusters fluorescence switch¹⁴⁸ depending on pH of the medium. This construction was exploited to design one of the functional molecular devices (molecular logic gate), which considered as one of the key components of molecular information processing and storage. Depending on the type of DNA used, the fluorescence can be changed, which provides a variety of choices and applications such as bio-labeling and biosensing.

6. SHG-active nanoparticles

Noncentrosymmetric nanomaterials with Second Harmonic Generation (SHG) properties have recently emerged as new non-resonant exogenous biomarkers with tremendous promise in bioimaging. The unique optical properties of SHG-active particles arise from their crystalline structure that lacks a center of inversion symmetry. Accordingly, nanoparticles with typical size of ~ 100 nm are able to generate second harmonic signals without phase matching-conditions contrary to bulk materials¹⁴⁹. In the nonlinear optical process of SHG, two incident photons of frequency ω are coherently converted in one photon at 2ω in the noncentrosymmetric core. The frequency conversion efficiency is sufficiently high, predominantly attributed to a volume effect¹⁵⁰, so that SHG from discrete nanoparticles (in the 100 nm size range) can be easily monitored. This was already demonstrated in a series of proof-of-concept experiments where the 3D orientation of single nanocrystal could be also retrieved^{151–153}.

In contrast with Two-Photon Excited fluorescence (TPEF), a unique feature of SHG is the involvement of virtual states (see Figure (7)) with the consequence that the incident energy is not lost in the nanomaterial due to nonradiative vibrational relaxation or internal conversion. Therefore, this non-resonant interaction inherent to SHG probes can be fully exploited in multiphoton microscopy in terms of coherent optical response¹⁵⁴, photostability (no bleaching and blinking)^{153,155} excitation-wavelength tunability for deep imaging¹⁵⁶, and narrow emission bands. These latter properties are amenable for employing them for long-term *in-vitro* and *in-vivo* imaging (especially by using infrared excitation to reduce unwanted thermal effects in the transparency range of tissues) within spectral windows that can be easily separated from other (auto)-fluorescence signals^{155,157}. In addition and similarly to TPEF, SHG is associated with the simultaneous presence of two photons at the focus of a microscope objective and this contributes to a good lateral resolution and, more generally, to a ‘natural’ 3D optical sectioning even in the absence of confocal pinholes. Accordingly, applications of SHG nanoprobe are expected to rapidly increase in molecular imaging of living cells and tissues^{158–160} because their much higher stability and versatility can complement the approach based on commonly used fluorescent labels, dyes and quantum dots^{161–164}.

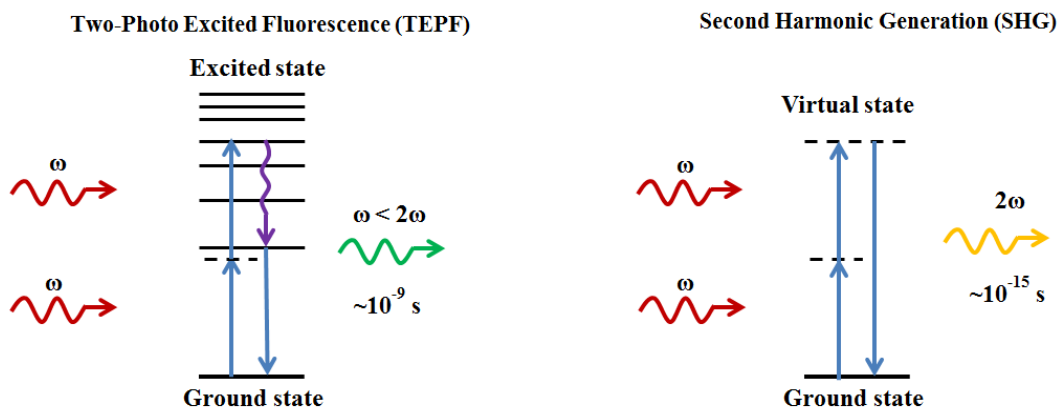


Figure 7: Perrin-Jablonski fluorescence diagram (left) and energy-level diagram (right) of two-photon excited fluorescence and SHG, respectively¹⁶⁵.

Among noncentrosymmetric nanocrystals, quantitative assessments of the SHG efficiency (which is qualified by the orientation averaged hyperpolarizability) were firstly addressed by ensemble measurements using Hyper-Rayleigh Scattering (HRS) technique to colloidal suspensions of quantum dots (QDs) such as CdSe, CdS and $\text{Cd}_x\text{Zn}_{1-x}\text{S}$ ^{166–169}. For these SHG-active structures of typical size ranging from 2 to 15 nm, a size-effect was clearly demonstrated below 10 nm. The normalized hyperpolarizability per unit cell can indeed exceed bulk values by one order of magnitude for the smallest particles. A bulk contribution ascribed to quantum confinement and a less dominant surface contribution were proposed. Remarkably, an enhancement was also evidenced by individual inspection of CdTe and CdTe/CdS QDs smaller than 15 nm in two recent ‘single-dot’ studies^{170,171} confirming the great potential of these very small labels for bioimaging as they simultaneously combine SHG and fluorescence (see the next section) properties.

However, and especially if *in-vivo* imaging is concerned, the high degree of toxicity of these Cadmium-based QDs^{172,173} may appear as a severe limitation. Later on, inorganic Cd-free nonlinear optical probes were thus developed and a great number of studies are already devoted to potassium niobate (KNbO_3)¹⁷⁴, lithium niobate (LiNbO_3)¹⁷⁵, barium titanate (BaTiO_3)^{176,177}, potassium titanyl phosphate (KTiOPO_4 , KTP)¹⁵³, iron iodate [$\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$]¹⁵² and zinc oxide (ZnO)¹⁷⁸. Besides, for most of them, their SHG properties and biocompatibility were recently compared in a comprehensive survey¹⁵⁵. For this second family of SHG-active nanoparticles whose typical diameters all lie at about 100 nm, the optical contrast at 2ω is excellent so that a proper choice of a given (nano)-material for future developments should consider several criteria and not only the nonlinear optical response. Among them, the synthesis of nanoparticles with size and shape control, their dispersion and water-stabilization,

their functionalization and obviously their cytotoxicity are of key importance. In this regard, only ZnO was proven to be highly toxic for cell imaging in two recent investigations^{155,179} contrary to a previous study¹⁷⁸.

6.1. Synthesis of SHG-active nanoparticles

Preparation of the above mentioned Cd-based QDs that all have in common a zinc blende crystal structure is described in the next section. With respect to noncentrosymmetric oxide nanoparticles, synthesis has been addressed through different chemical and physical routes. For niobate materials, hydrothermal conditions were used for KNbO₃ nanowires¹⁷⁴ and solvothermal treatments in the case of < 50 nm LiNbO₃ nanoparticles for which shape control could be achieved by simply varying the initial amounts of reactants¹⁸⁰. Reduction of niobium salts and subsequent hydrolysis with LiH is another possible route for LiNbO₃¹⁷⁵. Dry nanopowders of BaTiO₃ and ZnO are commercially available and protocols for their water-stabilization and surface modification were already investigated^{150,177}. Usually, sol-gel processes and hydrothermal treatments are well appropriate for the elaboration of these two nanomaterials^{165,178,181}. For KTP, individual nanoparticles could be successfully prepared after centrifugation of raw powder¹⁵³ and finally, Fe(IO₃)₃ nanorods were obtained after coprecipitation of iron nitrate and iodic acid either in aqueous solutions¹⁸² or in reverse microemulsions¹⁸³.

6.2. Biomedical applications of SHG-active nanoparticles

Several recent studies have highlighted the various benefits of using SHG nanoprobe in real bioimaging applications. Kachynski et al¹⁷⁸ were the first to use ZnO nanoparticles as high contrast probes for targeting KB cells. ZnO nanocrystals, with dimensions less than 100nm, were stabilized in water using phospholipids micelles and incorporated with folic acid. A clear intracellular accumulation of the targeted ZnO was observed on the nonlinear optical microscope.

Later on, Hsieh et al. proposed barium titanate nanoparticles coupled with immunoglobulin G antibody as specific probes. Surface modification of BaTiO₃ nanocrystals has been achieved with amine groups after silane-conjugation with aminopropyltriethoxysilane (APTES), followed by functionalization with IgG secondary antibody¹⁷⁶. The high specific labeling of such nanocrystal conjugates was demonstrated in an antibody microarray and by *in vitro* cells imaging (Figure 8).

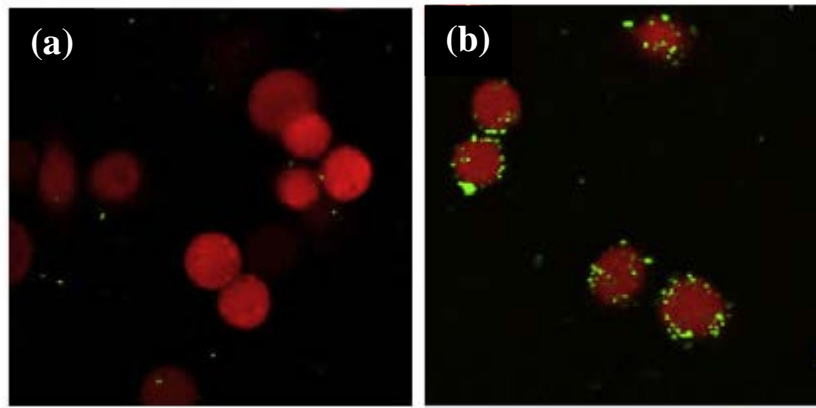


Figure 8: Merged images of SHG (green) and fluorescence images (red) of HeLa cells labeled with secondary-antibody-BaTiO₃ conjugates: (a) the cells were first labeled with the primary antibody specific to the HLA class I molecules present on the cell membrane and then labeled with the 2nd-Ab-BaTiO₃ (b) the control sample where the cells were not labeled with primary antibody but under otherwise identical conditions¹⁷⁶.

The same group has moreover given an evidence of the deep imaging potentialities of such markers¹⁸⁴. Indeed, uncoated individual BaTiO₃ nanocrystals have been efficiently used as contrasting markers for deep detection (50 μm and 120 μm) through mouse tail tissue *in vitro*, as shown in Figure (9) and (10).

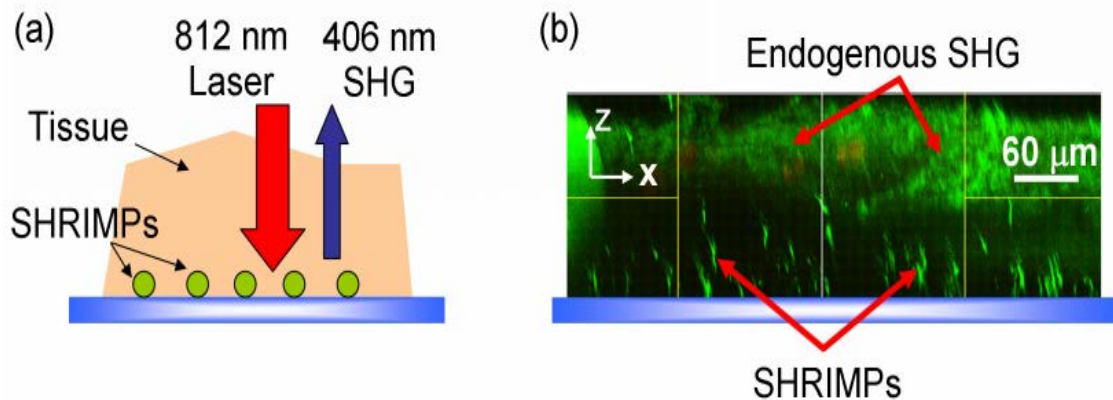


Figure 9: In vitro sample for SHG imaging. (a) Sample diagram (b) Scanning confocal imaging of 300 nm SHG probes (ie SHRIMPs) embedded 120 μm below an in vitro mouse tail tissue¹⁸⁴.

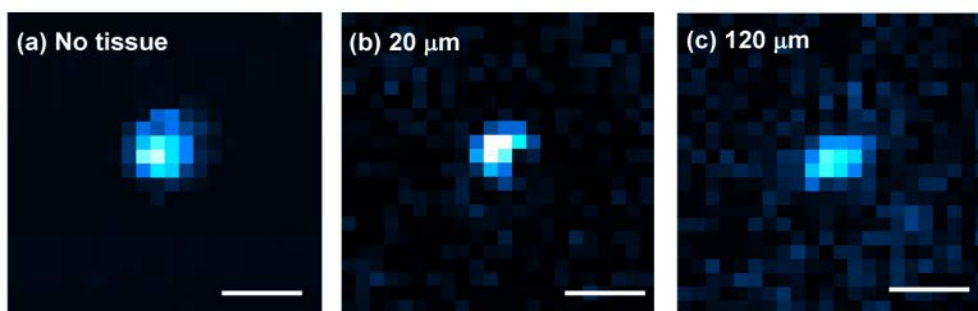


Figure 10: SHG confocal section images (x-y plane) of 300 nm SHG probes with (a) no tissue, (b) 20 μm (c) 120 μm of *in vitro* tissue¹⁸⁴. Scale bar of 2 μm .

Further, demonstration of *in vivo* imaging possibilities of SHG-active nanoparticles was done recently by Pantazis et al.¹⁵⁹. BaTiO₃ nanocrystals were injected into one-cell stage zebrafish embryos without indication of toxicity. SHG from BaTiO₃ nanoprobe is easily detected and differentiated from the background signal inherent to this complex media. Moreover, this work also demonstrates the excellent photostability of such probes, allowing long-term biological observations.

Finally, imaging with SHG-active nanoparticles has also been addressed in a recent work, where KNbO₃ nanoprobe was used to monitor the evolution of embryonic stem cells¹⁵⁷. Background free high second harmonic signal emitted by KNbO₃ particles allows a real-time capture of the microscopic contractions of embryonic stem cells derived cardiomyocytes.

7. Quantum Dots nanoparticles

Quantum dots (QDs) are semiconductor nanocrystals whose three dimensions are confined in a space of a few nanometers, and accordingly their electronic band structure is changed depending on their particle size^{185–188}. Due to their interesting optical properties, QDs nanocrystals have been intensively studied and used in various biomedical domains as detection probes or as labels for biomolecules¹⁸⁸. Their photostability and well-defined spectral properties make them remarkably and incontestably adapted for *in vitro* biomedical imaging^{189–191}.

7.1 Preparation

QDs may consist of pure materials such as silicon (Si) or a mixture of compounds of type II-VI (e.g. CdSe, CdS, CdTe, ZnSe, ZnO, ZnS) or III-V (e.g. GaN, GaP, InAs and GaAs)¹⁸⁸. However, the most popular quantum dots are mainly composed of Cadmium/Selenium (CdSe)

sizing between 2 to 10 nm, and their fluorescence color varies from blue to red depending of the particle size (Figure 11)¹⁹².

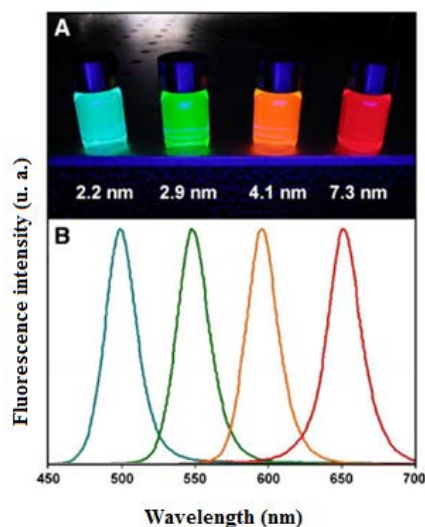


Figure 11: Schematic illustration of fluorescent color of CdSe QDs as a function of nanoparticles size, (a) fluorescence image obtained with ultraviolet illumination, (b) Fluorescence spectra of the same samples¹⁹².

Generally, QDs have core-shell structure; the core contains a large number of atoms (~1000), and $\frac{1}{3}$ to $\frac{1}{2}$ of atoms are mainly located on the surface^{188,193}. The core can be coated with an outer layer (shell) for passivation; the most often is zinc sulfide (ZnS) which protects the core from chemical degradation¹⁹⁴. In order to achieve the colloidal stability of these nanocrystals, surface modification is necessary in order to make them dispersible in polar or non-polar media. Various preparation methods have been reported and summarized below.

7.2. Synthesis in aqueous medium at room temperature

This basic method depends on simple salts precipitation in aqueous medium and mainly in presence of stabilizing agents in order to obtain well-defined nanocrystals. The presence of stabilizing agents^{195,196} aims to control the nanocrystal size via direct or inverse microemulsion process¹⁹⁷ and to control the growing process of the nanoparticles during formation starting from the nucleation step. Sooklal et al¹⁹⁵ have reported the preparation of CdS by mixing Cd^{2+} and S^{2-} salts in methanol solution in the presence of a star dendrimer as a stabilizing agent. The size of the nanocrystals and the optical properties depend on pH and chemical nature of the preparation medium. It has been found that fluorescent QDs in blue-green color are obtained when the precipitation was conducted in neutral or acidic solution, while yellow fluorescent QDs are obtained in basic solution or in water. Hydrophilic QDs can also be obtained via co-precipitation process in a reverse microemulsion-like process.

Lukanov et al.¹⁹⁸ prepared QDs (CdS core/ZnS shell) nanocrystals in the presence of bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) as a stabilizer. Interestingly, they pointed out that the size of the QDs increases with increasing water content in the micelles. Nanocrystals obtained using such process, are hydrophilic and exhibit relatively broad size distribution with a standard deviation above 15%.

7.3 Synthesis at High-temperature in nonaqueous medium

This method allows controlling the nucleation step in successive manner, followed by growth of the nanocrystals. The precursors used are either organometallic or inorganic. The key point of this method is the use of highly reactive metal precursors, which decompose rapidly after their injection in a solvent at high temperature. Chan et al.¹⁹⁹ have reported a synthetic route based on the pyrolysis of organometallic reagents by injecting them into a coordinating solvent at high temperature. As shown in Figure 12 a solution of dimethyl cadmium (Me_2Cd) (precursor) and trioctylphosphine selenide (Se (TOP)) in trioctylphosphine (TOP) was injected rapidly into a solution of trioctylphosphine oxide (TOPO) (coordinating solvent) at 300°C . This rapid injection is closely followed by a drop in the incubation temperature to 180°C . The obtained mixture is then heated and the nanocrystals growing step takes place at a temperature in between 230 and 260°C .

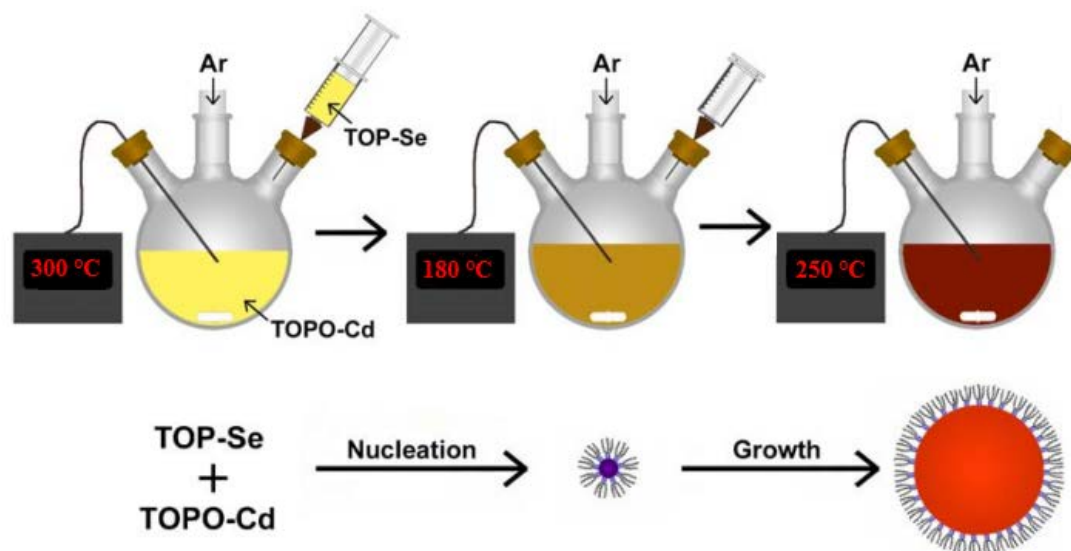


Figure 12: Schematic illustration of CdSe-TOPO synthesis via organometallic leading to nanocrystals stabilized by TOPO ligands²⁰⁰.

The rapid injection of organometallic reagents, as above discussed, is necessary to have a rapid and homogeneous nucleation period followed by a growing step controlled mainly by TOPO. The primary nanocrystals are formed instantaneously and at the same time, growth

homogeneously and similarly. Moreover, it is possible to increase the final size of the nanocrystals by successive injections of the precursor in the reaction medium²⁰¹.

If the synthesis of QDs is now increasing under control, it remains a sensitive area. The control of synthesis conditions of QDs is of a paramount importance in producing QDs bearing different optical properties²⁰². There are several hydrophobic ligands molecules which can act as surfactants for stabilizing the surface of QDs particles to prevent their aggregation. They include thiols, amines, phosphine compounds and fatty acids e.g. oleic acid, as shown in Figure 13.

In this context, researchers have investigated the effect of coordinating agents and temperature on the reproducibility of QDs preparation and properties. Other works have been oriented to develop microfluidic systems for better control of operating conditions^{203,204}. All these drawbacks are a brake on industrial development on a large scale, explaining their cost remains high at present.

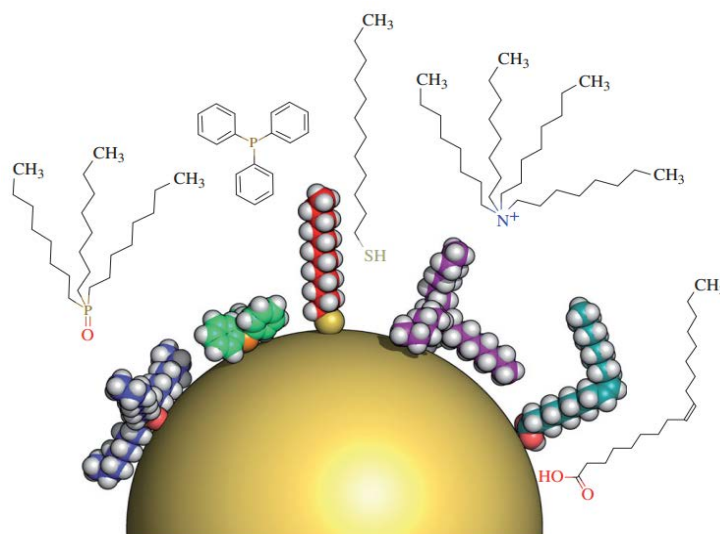


Figure 13: Schematic molecule structures of surfactants from left to right, stabilizing QDs particles: trioctylphosphine oxide (TOPO), triphenylphosphine (TPP), dodecanethiol (DDT), tetraoctylammonium bromide (TOAB) and oleic acid (OA). The spatial conformation of the molecules is only shown schematically as derived from their chemical structure and space-filling models²⁰⁵.

7.4 Biomedical applications of QDs

Organic fluorophores (fluorescent molecules) have been extensively used as labels for biomolecules in order to enhance the sensitivity of biomedical diagnosis. Fluorescein and rhodamine are the most commonly used fluorescent molecules and they were principally used to label antibodies and oligonucleotides²⁰⁶. Due to the bleaching effect of such molecules,

latex particles containing fluorescent molecules have been explored, but unfortunately, the bleaching problem was not completely solved.

In the last decade, the development of the inorganic semiconductor quantum dots (QDs), which exhibits non-fluorescent bleaching has totally changed the sensitivity of *in vitro* biomedical diagnosis. Quantum dots have a broader excitation spectra and a narrow more sharply defined emission peak, as compared to the organic fluorescent molecules²⁰⁷. Due to these properties, a single light source can be used to excite multicolour quantum dots simultaneously without signal overlap. Regardless the excitation wavelength, the emission is mainly related to the nanocrystal size. Accordingly, such nanoparticles have been used as alternatives for classical fluorescent molecules (fluorescein, rhodamine, etc) after chemical surface modification to label mainly antibodies. This new labeling technology enhanced the limits of fluorescence detection and imaging in terms of target detection and capture images in real time. Moreover, their unique spectral properties make them remarkably adapted tools to multiple labeling experiments (bar code) in complex biological media²⁰⁸.

8. Conclusions

Individual inorganic nanoparticles are promising candidates for *in vitro* and *in vivo* biomedical applications. This can be attributed to their interesting features, which emanating from their nanosize, including physical properties such as, optical, superparamagnetic, electronic, and catalytic solid support, in addition to some specific biological activity (e.g. bactericidal activity of Ag, and gold in the specific affinity toward proteins). Nowadays, the specific optical or magnetic features of the inorganic nanoparticles are exploited and integrated in Microsystems and devices providing fast analysis with high sensitivity for low volume analyte.

While the benefits of inorganic nanoparticles for *in vitro* applications are recognized, their use for *in vivo* area is still very restricted. This may be attributed to the extensively toxicity studies which have to be done before use *in vivo* therapy or diagnostic or theranostic. Furthermore, in order to be conveniently used for *in vitro* or *in vivo* bio-related applications, the surface of the inorganic nanoparticles must be modified not only to increase its biocompatibility (low toxicity) but also to enhance their colloidal stability preventing their *in vivo* aggregation, chemical degradation or accumulation. This can be achieved by optimization of the synthesis process in order to prepare structured nanoparticles with well-defined properties in order to answer the drastic criteria of bionanotechnology.

Acknowledgements

The authors would like to thank all supports and funding provided from the local MACODEV cluster of the Rhone-Alpes region council, the 2007-2013 French-Swiss INTERREG IV program (project NAOMI) and from the European Community's 7th Framework Programme under grant agreement no NMP4-LA-2010-246479 (NAMDIATREAM).

References

1. Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K. & Rege, K. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Journal of Controlled Release* **155**, 344–357 (2011).
2. Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L. & O'Connor, C. J. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chemical Reviews* **104**, 3893–3946 (2004).
3. Manz, A., Graber, N. & Widmer, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1**, 244–248 (1990).
4. Teja, A. S. & Koh, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* **55**, 22–45 (2009).
5. Azhar Uddin, M., Tsuda, H., Wu, S. & Sasaoka, E. Catalytic decomposition of biomass tars with iron oxide catalysts. *Fuel* **87**, 451–459 (2008).
6. dos Santos Coelho, F. *et al.* Potential application of highly reactive Fe(0)/Fe₃O₄ composites for the reduction of Cr(VI) environmental contaminants. *Chemosphere* **71**, 90–96 (2008).
7. Tartaj, P., Morales, M. a del P., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzalez-Carretero, T. & Serna, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* **36**, R182–R197 (2003).
8. Sun, Y.-P. *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Synthesis, Properties, and Applications*. (Marcel Dekker Inc: 2002).
9. Xu, C. & Teja, A. S. Supercritical water synthesis and deposition of iron oxide (α -Fe₂O₃) nanoparticles in activated carbon. *The Journal of Supercritical Fluids* **39**, 135–141 (2006).
10. Jurgons, R. *et al.* Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Physics: Condensed Matter* **18**, S2893–S2902 (2006).
11. Qiang, Y. *et al.* Iron/iron oxide core-shell nanoclusters for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research* **8**, 489–496 (2006).
12. Xu, Z. P., Zeng, Q. H., Lu, G. Q. & Yu, A. B. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science* **61**, 1027–1040 (2006).
13. Hyeon, T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles. *Chemical Communications* 927–934 (2003).doi:10.1039/b207789b
14. Cabrera, L., Gutierrez, S., Menendez, N., Morales, M. P. & Herrasti, P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta* **53**, 3436–3441 (2008).
15. Li, C. *et al.* Catalytic combustion of formaldehyde on gold/iron-oxide catalysts. *Catalysis Communications* **9**, 355–361 (2008).
16. Lübke, A. S., Bergemann, C., Brock, J. & McClure, D. G. Physiological aspects in magnetic drug-targeting. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **194**, 149–155 (1999).
17. Zheng, Y., Cheng, Y., Bao, F. & Wang, Y. Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. *Materials Research Bulletin* **41**, 525–529 (2006).
18. Ai, H. *et al.* Magnetite-Loaded Polymeric Micelles as Ultrasensitive Magnetic-Resonance Probes. *Advanced Materials* **17**, 1949–1952 (2005).
19. Arelaro, A. D. *et al.* Interparticle interactions and surface contribution to the effective anisotropy in biocompatible iron oxide nanoparticles used for contrast agents. *Journal of Applied Physics* **97**, 10J316–10J316–3 (2005).
20. Gonzales, M. & Krishnan, K. M. Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **293**, 265–270 (2005).

21. Lee, H., Shao, H., Huang, Y. & Kwak, B. Synthesis of MRI contrast agent by coating superparamagnetic iron oxide with chitosan. *Magnetics, IEEE Transactions on* **41**, 4102 – 4104 (2005).
22. Sadeghiani, N. *et al.* Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **289**, 466–468 (2005).
23. Oh, J. K. & Park, J. M. Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application. *Progress in Polymer Science* **36**, 168–189 (2011).
24. Rahman, M. & Elaissari, A. Organic–Inorganic Hybrid Magnetic Latex. *Hybrid Latex Particles* **233**, 237–281 (2011).
25. Elaissari, A. & Fessi, H. Reactive and Highly Submicron Magnetic Latexes for Bionanotechnology Applications. *Macromolecular Symposia* **288**, 115–120 (2010).
26. Altıntaş, E. B., Tüzmen, N., Candan, N. & Denizli, A. Use of magnetic poly(glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. *Journal of Chromatography B* **853**, 105–113 (2007).
27. Španová, A. *et al.* Immunomagnetic separation and detection of Salmonella cells using newly designed carriers. *Journal of Chromatography A* **1009**, 215–221 (2003).
28. Megens, M. & Prins, M. Magnetic biochips: a new option for sensitive diagnostics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **293**, 702–708 (2005).
29. Horák, D., Rittich, B. & Španová, A. Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **311**, 249–254 (2007).
30. Gupta, A. & Curtis, A. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **15**, 493–496 (2004).
31. Yu, H., Raymonda, J. W., McMahon, T. M. & Campagnari, A. A. Detection of biological threat agents by immunomagnetic microsphere-based solid phase fluorogenic- and electro-chemiluminescence. *Biosensors and Bioelectronics* **14**, 829–840 (2000).
32. Uhlen, M. Magnetic separation of DNA. , *Published online: 31 August 1989; / doi:10.1038/340733a0* **340**, 733–734 (1989).
33. Fisher, P. J., Springett, M. J., Dietz, A. B., Bulur, P. A. & Vuk-Pavlović, S. Immunomagnetic separation reagents as markers in electron microscopy. *Journal of Immunological Methods* **262**, 95–101 (2002).
34. Halavaara, J., Tervahartiala, P., Isoniemi, H. & Höckerstedt, K. Efficacy of sequential use of superparamagnetic iron oxide and gadolinium in liver MR imaging. *Acta Radiologica* **43**, 180–185 (2002).
35. Hergt, R., Hiergeist, R. & Hilger, I. Magnetic Nanoparticles for Thermoablation. **3**, 723–742 (2002).
36. Braconnot, S., Eissa, M. & Elaissari, A. Morphology control of magnetic latex particles prepared from oil in water ferrofluid emulsion. *Colloid & Polymer Science* 1–11doi:10.1007/s00396-012-2700-4
37. Pierson, H. O. *Handbook of Chemical Vapor Deposition: Principles, Technology and Applications*. (William Andrew: 1999).
38. Dumitrache, F. *et al.* Iron–iron oxide core–shell nanoparticles synthesized by laser pyrolysis followed by superficial oxidation. *Applied Surface Science* **247**, 25–31 (2005).
39. Chang, H. S. W., Chiou, C.-C., Chen, Y.-W. & Sheen, S. R. Synthesis, Characterization, and Magnetic Properties of Fe₃O₄Thin Films Prepared via a Sol–Gel Method. *Journal of Solid State Chemistry* **128**, 87–92 (1997).

40. Orel, B., Maček, M., Švegl, F. & Kalcher, K. Electrochromism of iron oxide films prepared via the sol-gel route by the dip-coating technique. *Thin Solid Films* **246**, 131–142 (1994).
41. Sedlar, M. The preparation and magnetic properties of sodium-modified iron oxide thin films by a sol-gel method. *Ceramics International* **20**, 73–78 (1994).
42. HWANG, K.-S., JEON, Y.-S., JEON, K.-O. & KIM, B.-H. Transparent (1-x)TiO₂-xFe₂O₃ (x = 0, 5, 10, 15 and 20 mol%) thin films prepared by sol-gel process. *Optica Applicata* **35**, 191–199 (2005).
43. Hongri Liu, Z. L. Ferroelectric properties of BiFeO₃ films grown by sol-gel process. *Thin Solid Films* 105–109doi:10.1016/j.tsf.2005.11.041
44. Aa, I. Synthesis and characterization of Y₂O₃/Fe₂O₃/TiO₂ nanoparticles by sol-gel method. *Appl. Catal. B: Environ.* **58**, 115–121 (2005).
45. Lakeman, C. D. E. & Payne, D. A. Sol-gel processing of electrical and magnetic ceramics. *Materials Chemistry and Physics* **38**, 305–324 (1994).
46. An, S. Y., Shim, I.-B. & Kim, C. S. Synthesis and magnetic properties of LiFe₅O₈ powders by a sol-gel process. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **290-291**, 1551–1554 (2005).
47. Willey, R. j., Oliver, S. a., Oliveri, G. & Busca, G. Chemistry and structure of mixed magnesium ferric oxide aerogels. *Journal of Materials Research* **8**, 1418–1427 (1993).
48. Yamaguchi, K., Fujii, T., Kuranouchi, S., Yamanobe, Y. & Ueno, A. Magnetic properties of iron-boron-oxide and iron-phosphor-oxide glasses prepared by sol-gel method. *Magnetics, IEEE Transactions on* **25**, 3321–3323 (1989).
49. Liu, M. *et al.* XRD and Mössbauer spectroscopy investigation of Fe₂O₃-Al₂O₃ nanocomposite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **294**, 294–297 (2005).
50. Lam, U. T., Mammucari, R., Suzuki, K. & Foster, N. R. Processing of Iron Oxide Nanoparticles by Supercritical Fluids. *Ind. Eng. Chem. Res.* **47**, 599–614 (2008).
51. Xu, C. Continuous and batch hydrothermal synthesis of metaloxide nanoparticles and metaloxide-activated carbon nanocomposites. (2006).
52. Darab, J. & Matson, D. Continuous hydrothermal processing of nano-crystalline particulates for chemical-mechanical planarization. *Journal of Electronic Materials* **27**, 1068–1072 (1998).
53. Matson, D. W., Linehan, J. C. & Bean, R. M. Ultrafine iron oxide powders generated using a flow-through hydrothermal process. *Materials letters* **14**, 222–226
54. Matson, D. W., Linehan, J. C., Darab, J. G. & Buehler, M. F. Nanophase iron-based liquefaction catalysts: synthesis, characterization, and model compound reactivity. *Energy Fuels* **8**, 10–18 (1994).
55. Adschiri, T., Kanazawa, K. & Arai, K. Rapid and Continuous Hydrothermal Synthesis of Boehmite Particles in Subcritical and Supercritical Water. *Journal of the American Ceramic Society* **75**, 2615–2618 (1992).
56. Adschiri, T., Kanazawa, K. & Arai, K. Rapid and Continuous Hydrothermal Crystallization of Metal Oxide Particles in Supercritical Water. *Journal of the American Ceramic Society* **75**, 1019–1022 (1992).
57. Cote, L. J., Teja, A. S., Wilkinson, A. P. & Zhang, Z. J. Continuous hydrothermal synthesis and crystallization of magnetic oxide nanoparticles. *Journal of materials research* **17**, 2410–2416
58. Cote, L. J., Teja, A. S., Wilkinson, A. P. & Zhang, Z. J. Continuous hydrothermal synthesis of CoFe₂O₄ nanoparticles. *Fluid Phase Equilibria* **210**, 307–317 (2003).
59. Adschiri, T. & Arai, K. *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Synthesis, Properties, and Applications.* 311–325 (2002).

60. Hao, Y. & Teja, A. S. Continuous hydrothermal crystallization of α -Fe₂O₃ and Co₃O₄ nanoparticles. *Journal of Materials Research* **18**, 415–422 (2011).
61. Xu, C. & Teja, A. S. Continuous hydrothermal synthesis of iron oxide and PVA-protected iron oxide nanoparticles. *The Journal of Supercritical Fluids* **44**, 85–91 (2008).
62. Lester, E. *et al.* Reaction engineering: The supercritical water hydrothermal synthesis of nano-particles. *The Journal of Supercritical Fluids* **37**, 209–214 (2006).
63. Cornell, R. M. & Schwertmann, U. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. (Wiley-VCH: 2003).
64. Gnanaprakash, G. *et al.* Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics* **103**, 168–175 (2007).
65. Lu, A.-H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* **46**, 1222–1244 (2007).
66. Tavakoli, A., Sohrabi, M. & Kargari, A. A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds. *Chemical Papers* **61**, 151–170 (2007).
67. 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. *Advances in Colloid and Interface Science* **55**, 241–269 (1995).
68. Chhabra, V., Ayyub, P., Chattopadhyay, S. & Maitra, A. N. Preparation of acicular γ -Fe₂O₃ particles from a microemulsion-mediated reaction. *Materials letters* **26**, 21–26 (2006).
69. Nassar, N. & Husein, M. Preparation of iron oxide nanoparticles from FeCl₃ solid powder using microemulsions. *physica status solidi (a)* **203**, 1324–1328 (2006).
70. Vidal-Vidal, J., Rivas, J. & López-Quintela, M. A. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **288**, 44–51 (2006).
71. Deng, Y., Wang, L., Yang, W., Fu, S. & Elaïssari, A. Preparation of magnetic polymeric particles via inverse microemulsion polymerization process. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **257**, 69–78 (2003).
72. Tartaj, P. & Serna, C. J. Microemulsion-Assisted Synthesis of Tunable Superparamagnetic Composites. *Chem. Mater.* **14**, 4396–4402 (2002).
73. Santra, S. *et al.* Synthesis and Characterization of Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Microemulsion: The Effect of Nonionic Surfactants. *Langmuir* **17**, 2900–2906 (2001).
74. Zhang, M., Cushing, B. L. & O'Connor, C. J. Synthesis and characterization of monodisperse ultra-thin silica-coated magnetic nanoparticles. *Nanotechnology* **19**, 085601 (2008).
75. Ganguli, A. K. & Ahmad, T. Nanorods of iron oxalate synthesized using reverse micelles: facile route for alpha-Fe₂O₃ and Fe₃O₄ nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* **7**, 2029–2035 (2007).
76. Esquivel, J., Facundo, I., Treviño, M. & López, R. A novel method to prepare magnetic nanoparticles: precipitation in bicontinuous microemulsions. *Journal of Materials Science* **42**, 9015–9020 (2007).
77. Rosenswing, R. E., Nestor, J. W. & Timmins, R. S. Ferrohydrodynamic liquid fluids for direct conversion of heat energy. *Material Association Direct Energy Conversion* **5**, 104–118 (1965).
78. Papell, S. S. Low viscosity magnetic fluid obtained by the colloidal suspension of magnetic particles Patent. (1965).at <<http://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=19700030808>>

79. Ravaud, R. & Lemarquand, G. DESIGN OF IRONLESS LOUDSPEAKERS WITH FERROFLUID SEALS: ANALYTICAL STUDY BASED ON THE COULOMBIAN MODEL. *Progress In Electromagnetics Research B* **14**, 285–309 (2009).
80. Park, G. S. & Seo, K. New design of the magnetic fluid linear pump to reduce the discontinuities of the pumping forces. *IEEE Transactions on Magnetics* **40**, 916 – 919 (2004).
81. Laurent, S., Dutz, S., Häfeli, U. O. & Mahmoudi, M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci* **166**, 8–23 (2011).
82. Elaissari, A., Chatterjee, J., Hamoudeh, M. & Fessi, H. Advances in the Preparation and Biomedical Applications of Magnetic Colloids. *Structure and Functional Properties of Colloidal Systems* **20093872**, 315–337 (2009).
83. Andò, B., Baglio, S. & Beninato, A. Magnetic Fluids for Bio-medical Application. *Advances in Biomedical Sensing, Measurements, Instrumentation and Systems* **55**, 16–28 (2010).
84. Safarik, I., Safaríková, M. & Forsythe, S. j. The application of magnetic separations in applied microbiology. *Journal of Applied Microbiology* **78**, 575–585 (1995).
85. Joo, J. *et al.* A facile and sensitive detection of pathogenic bacteria using magnetic nanoparticles and optical nanocrystal probes. *Analytst* **137**, 3609–3612 (2012).
86. Schotter, J. *et al.* Comparison of a prototype magnetoresistive biosensor to standard fluorescent DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics* **19**, 1149–1156 (2004).
87. Zou, H., Wu, S. & Shen, J. Polymer/Silica Nanocomposites: Preparation, Characterization, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **108**, 3893–3957 (2008).
88. Wang, C. *et al.* Two-Dimensional Ordered Arrays of Silica Nanoparticles. *Chem. Mater.* **12**, 3662–3666 (2012).
89. Tolnai, G. *et al.* Preparation and Characterization of Surface-Modified Silica-Nanoparticles. *Langmuir* **17**, 2683–2687 (2012).
90. Fuertes, A. B., Valle-Vigón, P. & Sevilla, M. Synthesis of colloidal silica nanoparticles of a tunable mesopore size and their application to the adsorption of biomolecules. *Journal of Colloid and Interface Science* **349**, 173–180 (2010).
91. Knopp, D., Tang, D. & Niessner, R. Review: Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Analytica Chimica Acta* **647**, 14–30 (2009).
92. Santra, S., Dutta, D. & Moudgil, B. M. Functional Dye-Doped Silica Nanoparticles for Bioimaging, Diagnostics and Therapeutics. *Food and Bioproducts Processing* **83**, 136–140 (2005).
93. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* **26**, 62–69 (1968).
94. Cihlár, J. Hydrolysis and polycondensation of ethyl silicates. 1. Effect of pH and catalyst on the hydrolysis and polycondensation of tetraethoxysilane (TEOS). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **70**, 239–251 (1993).
95. Jada, A., Lang, J., Candau, S.-J. & Zana, R. Structure and dynamics of water-in-oil microemulsions. *Colloids and Surfaces* **38**, 251–261 (1989).
96. Arriagada, F. J. & Osseo-Asare, K. Synthesis of Nanosize Silica in a Nonionic Water-in-Oil Microemulsion: Effects of the Water/Surfactant Molar Ratio and Ammonia Concentration. *Journal of Colloid and Interface Science* **211**, 210–220 (1999).
97. Abarkan, I., Doussineau, T. & Smāihi, M. Tailored macro/microstructural properties of colloidal silica nanoparticles via microemulsion preparation. *Polyhedron* **25**, 1763–1770 (2006).

98. Asaro, F., Benedetti, A., Savko, N. & Pellizer, G. Inverse Nonionic Microemulsion Studied by Means of ¹H, ¹³C, and PGSTE NMR during Silica Nanoparticle Synthesis. *Langmuir* **25**, 3224–3231 (2012).
99. Venditti, F. *et al.* Preparation of Nanosize Silica in Reverse Micelles: Ethanol Produced during TEOS Hydrolysis Affects the Microemulsion Structure. *Langmuir* **23**, 10063–10068 (2007).
100. Wang, W., Fu, X., Tang, J. & Jiang, L. Preparation of submicron spherical particles of silica by the water-in-oil microemulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **81**, 177–180 (1993).
101. Wang, L., Zhao, W. & Tan, W. Bioconjugated silica nanoparticles: Development and applications. *Nano Research* **1**, 99–115 (2008).
102. Wang, L. & Tan, W. Multicolor FRET Silica Nanoparticles by Single Wavelength Excitation. *Nano Letters* **6**, 84–88 (2006).
103. Veerananarayanan, S. *et al.* FITC Labeled Silica Nanoparticles as Efficient Cell Tags: Uptake and Photostability Study in Endothelial Cells. *Journal of Fluorescence* **22**, 537–548 (2011).
104. Gary-Bobo, M. *et al.* Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the in vitro treatment of retinoblastoma: Drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **432**, 99–104 (2012).
105. Li, H. *et al.* In situ route to novel fluorescent mesoporous silica nanoparticles with 8-hydroxyquinolate zinc complexes and their biomedical applications. *Microporous and Mesoporous Materials* **151**, 293–302 (2012).
106. Kruglenko, I. *et al.* Sensor for detection of water presence in gaseous mixtures based on gold nanoparticles stabilized by sodium citrate. *Sensors and Actuators B: Chemical* doi:10.1016/j.snb.2011.02.044
107. Zhong, X. *et al.* Glucose biosensor based on self-assembled gold nanoparticles and double-layer 2d-network (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilane polymer onto gold substrate. *Sensors and Actuators B: Chemical* **104**, 191–198 (2005).
108. Pissuwan, D., Niidome, T. & Cortie, M. B. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release* **149**, 65–71 (2011).
109. Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K. & Rotello, V. M. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1307–1315 (2008).
110. Patra, C. R., Bhattacharya, R., Mukhopadhyay, D. & Mukherjee, P. Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 346–361 (2010).
111. Luo, L., Zhang, Z. & Hou, L. Development of a gold nanoparticles based chemiluminescence imaging assay and its application. *Analytica Chimica Acta* **584**, 106–111 (2007).
112. Walker, C. H., St. John, J. V. & Wisian-Neilson, P. Synthesis and Size Control of Gold Nanoparticles Stabilized by Poly(methylphenylphosphazene). *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3846–3847 (2001).
113. Ojea-Jiménez, I., Romero, F. M., Bastús, N. G. & Puentes, V. Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. *J. Phys. Chem. C* **114**, 1800–1804 (2010).
114. Wang, W. *et al.* One-step synthesis of biocompatible gold nanoparticles using gallic acid in the presence of poly-(N-vinyl-2-pyrrolidone). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **301**, 73–79 (2007).
115. Cui, H., Wang, W., Duan, C.-F., Dong, Y.-P. & Guo, J.-Z. Synthesis, Characterization, and Electrochemiluminescence of Luminol-Reduced Gold Nanoparticles and Their

- Application in a Hydrogen Peroxide Sensor. *Chemistry – A European Journal* **13**, 6975–6984 (2007).
116. Seol, S. K., Kim, D., Jung, S. & Hwu, Y. Microwave synthesis of gold nanoparticles: Effect of applied microwave power and solution pH. *Materials Chemistry and Physics* **131**, 331–335 (2011).
117. Zhu, H. *et al.* Facile one-pot synthesis of gold nanoparticles stabilized with bifunctional amino/siloxy ligands. *Journal of Colloid and Interface Science* **287**, 360–365 (2005).
118. AswathyAromal, S. & Philip, D. Green synthesis of Gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its Size-dependent Catalytic activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* doi:10.1016/j.saa.2012.05.083
119. Aromal, S. A., Vidhu, V. K. & Philip, D. Green synthesis of well-dispersed gold nanoparticles using *Macrotyloma uniflorum*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **85**, 99–104 (2012).
120. Song, J. Y., Jang, H.-K. & Kim, B. S. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochemistry* **44**, 1133–1138 (2009).
121. MubarakAli, D., Thajuddin, N., Jeganathan, K. & Gunasekaran, M. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **85**, 360–365 (2011).
122. Dragnea, B., Chen, C., Kwak, E.-S., Stein, B. & Kao, C. C. Gold Nanoparticles as Spectroscopic Enhancers for in Vitro Studies on Single Viruses. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6374–6375 (2003).
123. Yong, K.-T., Swihart, M. T., Ding, H. & Prasad, P. N. Preparation of Gold Nanoparticles and their Applications in Anisotropic Nanoparticle Synthesis and Bioimaging. *Plasmonics* **4**, 79–93 (2009).
124. Lee, S. H., Wabaidur, S. M., Alothman, Z. A. & Alam, S. M. Gold nanoparticles-based fluorescence enhancement of the terbium–levofloxacin system and its application in pharmaceutical preparations. *Luminescence* **26**, 768–773 (2011).
125. Sun, T. & Seff, K. Silver Clusters and Chemistry in Zeolites. *Chem. Rev.* **94**, 857–870 (1994).
126. Evanoff Jr., D. D. & Chumanov, G. Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. *ChemPhysChem* **6**, 1221–1231 (2005).
127. Xu, H., Xu, J., Zhu, Z., Liu, H. & Liu, S. In-Situ Formation of Silver Nanoparticles with Tunable Spatial Distribution at the Poly(N-isopropylacrylamide) Corona of Unimolecular Micelles. *Macromolecules* **39**, 8451–8455 (2012).
128. Gupta, S. *et al.* Immobilization of Silver Nanoparticles on Responsive Polymer Brushes. *Macromolecules* **41**, 2874–2879 (2012).
129. Sanchez-Cortes, S., Berenguel, R. M., Madejón, A. & Pérez-Méndez, M. Adsorption of Polyethyleneimine on Silver Nanoparticles and Its Interaction with a Plasmid DNA: A Surface-Enhanced Raman Scattering Study. *Biomacromolecules* **3**, 655–660 (2012).
130. Leopold, N. & Lendl, B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *J. Phys. Chem. B* **107**, 5723–5727 (2003).
131. Johans, C., Clohessy, J., Fantini, S., Kontturi, K. & Cunnane, V. J. Electrosynthesis of polyphenylpyrrole coated silver particles at a liquid–liquid interface. *Electrochemistry Communications* **4**, 227–230 (2002).

132. Zhang, L. *et al.* Ambient Light Reduction Strategy to Synthesize Silver Nanoparticles and Silver-Coated TiO₂ with Enhanced Photocatalytic and Bactericidal Activities. *Langmuir* **19**, 10372–10380 (2003).
133. Hornebecq, V., Antonietti, M., Cardinal, T. & Treguer-Delapierre, M. Stable Silver Nanoparticles Immobilized in Mesoporous Silica. *Chem. Mater.* **15**, 1993–1999 (2003).
134. Naik, R. R., Stringer, S. J., Agarwal, G., Jones, S. E. & Stone, M. O. Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. *Nature Materials* **1**, 169–172 (2002).
135. Shirtcliffe, N., Nickel, U. & Schneider, S. Reproducible Preparation of Silver Sols with Small Particle Size Using Borohydride Reduction: For Use as Nuclei for Preparation of Larger Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **211**, 122–129 (1999).
136. Abou El-Nour, K. M. M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A. & Ammar, R. A. A. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* **3**, 135–140 (2010).
137. Sharma, V. K., Yngard, R. A. & Lin, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* **145**, 83–96 (2009).
138. Raveendran, P., Fu, J. & Wallen, S. L. Completely ‘Green’ Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13940–13941 (2003).
139. Stamplecoskie, K. G., Scaiano, J. C., Tiwari, V. S. & Anis, H. Optimal Size of Silver Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **115**, 1403–1409 (2011).
140. Shkilnyy, A. *et al.* Poly(ethylene glycol)-stabilized silver nanoparticles for bioanalytical applications of SERS spectroscopy. *Analyst* **134**, 1868–1872 (2009).
141. Shiraishi, Y. & Toshima, N. Colloidal silver catalysts for oxidation of ethylene. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **141**, 187–192 (1999).
142. Taglietti, A. *et al.* Antibacterial Activity of Glutathione-Coated Silver Nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Langmuir* **28**, 8140–8148 (2012).
143. Morones, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346–2353 (2005).
144. Hwang, E. T. *et al.* Analysis of the Toxic Mode of Action of Silver Nanoparticles Using Stress-Specific Bioluminescent Bacteria. *Small* **4**, 746–750 (2008).
145. Lara, H., Ayala-Núñez, N., Ixtapan Turrent, L. & Rodríguez Padilla, C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**, 615–621 (2010).
146. Dal Lago, V., França de Oliveira, L., de Almeida Gonçalves, K., Kobarg, J. & Borba Cardoso, M. Size-selective silver nanoparticles: future of biomedical devices with enhanced bactericidal properties. *Journal of Materials Chemistry* **21**, 12267 (2011).
147. K, S., S, G., T, R. & T, B. Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Journal of Nanobiotechnology* **9**, 43 (2011).
148. Huang, Z., Ren, J. & Qu, X. A reversible DNA–silver nanoclusters-based molecular fluorescence switch and its use for logic gate operation. *Molecular BioSystems* **8**, 921 (2012).
149. Brasselet, S. & Zyss, J. Nonlinear polarimetry of molecular crystals down to the nanoscale. *Comptes Rendus Physique* **8**, 165–179 (2007).
150. Le Dantec, R. *et al.* Ensemble and Individual Characterization of the Nonlinear Optical Properties of ZnO and BaTiO₃ Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* **115**, 15140–15146 (2011).
151. Brasselet, S. Second Harmonic Generation microscopy in molecular crystalline nano-objects. *Nonlinear Optics, Quantum optics* **40**, 83–94 (2010).

152. Bonacina, L. *et al.* Polar Fe(IO₃)₃ nanocrystals as local probes for nonlinear microscopy. *Applied Physics B* **87**, 399–403 (2007).
153. Le Xuan, L. *et al.* Photostable Second-Harmonic Generation from a Single KTiOPO₄ Nanocrystal for Nonlinear Microscopy. *Small* **4**, 1332–1336 (2008).
154. Le Xuan, L. *et al.* Balanced homodyne detection of second-harmonic generation from isolated subwavelength emitters. *Applied Physics Letters* **89**, 121118–121118–3 (2006).
155. Staedler, D. *et al.* Harmonic nanocrystals for biolabeling: a survey of optical properties and biocompatibility. *ACS Nano* **6**, 2542–2549 (2012).
156. Extermann, J. *et al.* Nanodoublers as deep imaging markers for multi-photon microscopy. *Opt. Express* **17**, 15342–15349 (2009).
157. Magouroux, T. *et al.* High-Speed Tracking of Murine Cardiac Stem Cells by Harmonic Nanodoublers. *Small* (2012).
158. Zyss, S. B. and J. Nano-Crystals for Quadratic Nonlinear Imaging : Characterization and Applications. (2010).at <<http://intechopen.com/books/nanocrystals/nano-crystals-for-quadratic-nonlinear-imaging-characterization-and-applications>>
159. Pantazis, P., Maloney, J., Wu, D. & Fraser, S. E. Second harmonic generating (SHG) nanoprobe for in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14535–14540 (2010).
160. Dempsey, W. P., Fraser, S. E. & Pantazis, P. SHG nanoprobe: Advancing harmonic imaging in biology. *BioEssays* **34**, 351–360 (2012).
161. Nirmal, M. *et al.* Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. , *Published online: 31 October 1996; | doi:10.1038/383802a0* **383**, 802–804 (1996).
162. Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., Mauro, J. M. & Simon, S. M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nature Biotechnology* **21**, 47–51 (2002).
163. Basché, T. Fluorescence intensity fluctuations of single atoms, molecules and nanoparticles. *Journal of Luminescence* **76–77**, 263–269 (1998).
164. Xing, Y. *et al.* Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nature Protocols* **2**, 1152–1165 (2007).
165. Rodriguez, E. V., Araújo, C. B. de, Brito-Silva, A. M., Ivanenko, V. I. & Lipovskii, A. A. Hyper-Rayleigh scattering from BaTiO₃ and PbTiO₃ nanocrystals. *Chemical Physics Letters* **467**, 335–338 (2009).
166. Jacobsohn, M. & Banin, U. Size Dependence of Second Harmonic Generation in CdSe Nanocrystal Quantum Dots. *J. Phys. Chem. B* **104**, 1–5 (1999).
167. Santos, B. S., Pereira, G. A. L., Petrov, D. V. & de Mello Donegá, C. First hyperpolarizability of CdS nanoparticles studied by hyper-Rayleigh scattering. *Optics Communications* **178**, 187–192 (2000).
168. Petrov, D. V., Santos, B. S., Pereira, G. A. L. & de Mello Donegá, C. Size and Band-Gap Dependences of the First Hyperpolarizability of Cd_xZn_{1-x}S Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **106**, 5325–5334 (2002).
169. Zhang, Y. *et al.* Size dependence of second-order optical nonlinearity of CdS nanoparticles studied by hyper-Rayleigh scattering. *Journal of Colloid and Interface Science* **266**, 377–381 (2003).
170. Zielinski, M., Oron, D., Chauvat, D. & Zyss, J. Second-Harmonic Generation from a Single Core/Shell Quantum Dot. *Small* **5**, 2835–2840 (2009).
171. Winter, S., Zielinski, M., Chauvat, D., Zyss, J. & Oron, D. The Second Order Nonlinear Susceptibility of Quantum Confined Semiconductors—A Single Dot Study. *J. Phys. Chem. C* **115**, 4558–4563 (2011).
172. Kirchner, C. *et al.* Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles. *Nano Lett.* **5**, 331–338 (2004).

173. Derfus, A. M., Chan, W. C. W. & Bhatia, S. N. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett.* **4**, 11–18 (2003).
174. Nakayama, Y. *et al.* Tunable nanowire nonlinear optical probe. *Nature* **447**, 1098–1101 (2007).
175. Aufray, M. *et al.* New Synthesis of Nanosized Niobium Oxides and Lithium Niobate Particles and Their Characterization by XPS Analysis. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **9**, 4780–4785 (2009).
176. Hsieh, C. L., Grange, R., Pu, Y. & Psaltis, D. Bioconjugation of barium titanate nanocrystals with immunoglobulin G antibody for second harmonic radiation imaging probes. *Biomaterials* **31**, 2272–2277 (2010).
177. Hsieh, C.-L., Grange, R., Pu, Y. & Psaltis, D. Three-dimensional harmonic holographic microcopy using nanoparticles as probes for cell imaging. *Optics Express* **17**, 2880 (2009).
178. Kachynski, A. V., Kuzmin, A. N., Nyk, M., Roy, I. & Prasad, P. N. Zinc Oxide Nanocrystals for Nonresonant Nonlinear Optical Microscopy in Biology and Medicine. *The Journal of Physical Chemistry C* **112**, 10721–10724 (2008).
179. Xia, T. *et al.* Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano* **2**, 2121–2134 (2008).
180. Mohanty, D. *et al.* Synthesis and piezoelectric response of cubic and spherical LiNbO₃ nanocrystals. *RSC Advances* **2**, 1913 (2012).
181. Baruah, S. & Dutta, J. Hydrothermal growth of ZnO nanostructures. *Science and Technology of Advanced Materials* **10**, 013001 (2009).
182. Galez, C., Mugnier, Y., Bouillot, J., Lambert, Y. & Le Dantec, R. Synthesis and characterisation of Fe(IO₃)₃ nanosized powder. *Journal of Alloys and Compounds* **416**, 261–264 (2006).
183. Mugnier, Y. *et al.* In Situ Crystallization and Growth Dynamics of Acentric Iron Iodate Nanocrystals in w/o Microemulsions Probed by Hyper-Rayleigh Scattering Measurements. *J. Phys. Chem. C* **115**, 23–30 (2011).
184. Grange, R., Lanvin, T., Hsieh, C.-L., Pu, Y. & Psaltis, D. Imaging with second-harmonic radiation probes in living tissue. *Biomed. Opt. Express* **2**, 2532–2539 (2011).
185. Alivisatos, A. P. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science* **271**, 933–937 (1996).
186. Mastronardi, M. L. *et al.* Size-Dependent Absolute Quantum Yields for Size-Separated Colloidally-Stable Silicon Nanocrystals. *Nano Lett.* **12**, 337–342 (2012).
187. Burda, C., Chen, X., Narayanan, R. & El-Sayed, M. A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Rev.* **105**, 1025–1102 (2005).
188. Murphy, C. J. Peer Reviewed: Optical Sensing with Quantum Dots. *Anal. Chem.* **74**, 520 A–526 A (2002).
189. Alivisatos, P. Au cœur des cellules. *Pour la science* **290**, 112–118 (2001).
190. Chen, G. & Yao, S. Lighting up cancer cells with ‘dots’. *The Lancet* **364**, 2001–2003 (2004).
191. Gao, X., Cui, Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. K. & Nie, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **22**, 969–976 (2004).
192. Chuto, G. & Chaumet-Riffaud, P. Les nanoparticules. *Médecine Nucléaire* **34**, 370–376 (2010).
193. CHANDEZON, F. & REISS, P. Nanocristaux semi-conducteurs fluorescents. *Technique de l'ingénieur NM2030*, 2004

194. Dabbousi, B. O. *et al.* (CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. *J. Phys. Chem. B* **101**, 9463–9475 (1997).
195. Sooklal, K., Hanus, L. H., Ploehn, H. J. & Murphy, C. J. A Blue-Emitting CdS/Dendrimer Nanocomposite. *Advanced Materials* **10**, 1083–1087 (1998).
196. Huang, J., Sooklal, K., Murphy, C. J. & Ploehn, H. J. Polyamine–Quantum Dot Nanocomposites: Linear versus Starburst Stabilizer Architectures. *Chem. Mater.* **11**, 3595–3601 (1999).
197. Petit, C. & Pileni, M. P. Synthesis of cadmium sulfide in situ in reverse micelles and in hydrocarbon gels. *J. Phys. Chem.* **92**, 2282–2286 (1988).
198. Alexandre R. Loukanov, C. D. D. Photoluminescence depending on the ZnS shell thickness of CdS/ZnS core-shell semiconductor nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 9–14doi:10.1016/j.colsurfa.2004.06.016
199. Chan, W. C. W. & Nie, S. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science* **281**, 2016–2018 (1998).
200. Bailey, R. E., Smith, A. M. & Nie, S. Quantum dots in biology and medicine. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **25**, 1–12 (2004).
201. Peng, X. Mechanisms for the Shape-Control and Shape-Evolution of Colloidal Semiconductor Nanocrystals. *Advanced Materials* **15**, 459–463 (2003).
202. Li, L. S., Pradhan, N., Wang, Y. & Peng, X. High Quality ZnSe and ZnS Nanocrystals Formed by Activating Zinc Carboxylate Precursors. *Nano Lett.* **4**, 2261–2264 (2004).
203. Chan, E. M., Mathies, R. A. & Alivisatos, A. P. Size-Controlled Growth of CdSe Nanocrystals in Microfluidic Reactors. *Nano Lett.* **3**, 199–201 (2003).
204. Yen, B. K. H., Günther, A., Schmidt, M. A., Jensen, K. F. & Bawendi, M. G. A Microfabricated Gas–Liquid Segmented Flow Reactor for High-Temperature Synthesis: The Case of CdSe Quantum Dots. *Angewandte Chemie International Edition* **44**, 5447–5451 (2005).
205. Sperling, R. A. & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A* **368**, 1333–1383 (2010).
206. Alivisatos, P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature Biotechnology* **22**, 47–52 (2003).
207. Alivisatos, A. P., Gu, W. & Larabell, C. Quantum Dots as Cellular Probes. *Annual Review of Biomedical Engineering* **7**, 55–76 (2005).
208. Parak, W. J., Pellegrino, T. & Plank, C. Labelling of cells with quantum dots. *Nanotechnology* **16**, R9–R25 (2005).

II.2. Revue n°2: “*Encapsulation of inorganic nanoparticles for in vitro and in vivo biomedical applications*”

L'utilisation pour des applications biomédicales de nanoparticules est souvent restreinte à cause de leur toxicité vis à vis des systèmes biologiques ou/et de leur instabilité dans des milieux aqueux. Afin de contourner ces limitations, l'encapsulation des nanoparticules inorganiques dans une matrice polymérique biocompatible et/ou biodégradable est une solution incontournable. L'encapsulation est définie comme un processus dans lequel des nanoparticules inorganiques ou des gouttelettes colloïdales contenant des nanoobjets sont enveloppées (et par conséquent protégées) par un revêtement généralement organique, ou incorporées dans une matrice homogène ou hétérogène.

Dans cette revue, nous décrivons les différentes méthodes d'encapsulation des nanoparticules inorganiques et les avantages des nanoparticules hybrides élaborées. L'incorporation des nanoparticules inorganiques dans la matrice polymérique permet la combinaison des propriétés du polymère encapsulant et celles des nanoparticules inorganiques. La capsule formée autour du cœur inorganique joue plusieurs rôles :

- Protection contre les phénomènes de dégradation lors du transfert dans un milieu aqueux ;
- Diminution du phénomène d'agrégation des nanoparticules inorganiques en augmentant leur stabilité colloïdale par des interactions répulsives stériques ou électrostatiques (polymères ou tensioactifs) ;
- Facilité de modification et de fonctionnalisation de la surface *via* des réactions chimiques (*e.g.* couplage covalent) ou physique (*e.g.* adsorption électrostatique).
- Réduction de la cytotoxicité généralement attribuée aux matériaux inorganiques.

De nombreuses méthodes reportées et discutées dans la littérature décrivent l'encapsulation de nanoparticules inorganiques par enrobage avec des macromolécules organiques ou dans une matrice polymérique. Cet enrobage peut résulter d'une simple adsorption, d'un greffage chimique ou de la complexation de chaînes polymériques à la surface de la charge inorganique.

Le procédé le plus simple et le plus utilisé est l'encapsulation de nanoparticules inorganiques par immobilisation de chaînes polymériques. Cette méthode consiste à immobiliser des chaînes polymériques à la surface des nanoparticules par adsorption physique. Le polymère

immobilisé à l'interface forme une couche mince dont les propriétés (polarité, fonctionnalité...) dépendent de la nature chimique et de la microstructure du polymère utilisé. Il est également possible d'augmenter l'épaisseur de la couche interfaciale en immobilisation des couches successives. Le procédé le plus utilisé dans ce sens est l'adsorption séquentielle alternée de polyélectrolyte de charges opposées. Il est également possible d'encapsuler les nanoparticules inorganiques *via* l'adsorption de tensioactifs sous forme de mono- ou bicouche. Il est à noter que ce procédé nécessite plusieurs étapes ce qui limite son extension à grande échelle.

L'encapsulation par polymérisation en milieu dispersé est réalisée en présence de nanoparticules inorganiques. Une grande majorité de ces procédés de polymérisation ont pu être mis en œuvre avec succès. Il résulte de ces études une grande variété de produits qui se différencient par leurs caractéristiques granulométriques, morphologiques, ainsi que par leur teneur en charge en matériaux inorganique.

Parmi ces procédés de polymérisation en milieu dispersé, nous pouvons citer : la microsuspension, l'émulsion, la dispersion, la polyaddition, la microémulsion et la miniémulsion.

La polymérisation en miniémulsion est le procédé le plus étudié à ce jour, car elle est très simple à réaliser en partant d'une émulsion constituée de petites gouttelettes de monomère(s) contenant les nanoparticules inorganiques modifiées et d'une phase aqueuse continue. Ces gouttelettes sont de taille submicronique pour constituer les sites de nucléation et de croissance des particules de polymère. La taille finale des particules hybrides est de même ordre que les émulsions initiales. Ce procédé est plus basé sur la formulation que sur la chimie elle-même. Le problème majeur réside dans l'incompatibilité entre le polymère formé et les nanoparticules inorganiques ce qui conduit dans la majorité des cas à une démixtion de phases et par conséquent à des morphologies non homogènes.

La microémulsion est un cas particulier de la miniémulsion, car la seule différence est l'utilisation d'une grande quantité de tensioactif (largement supérieure à la CMC) et sans utilisation d'énergie pour la fragmentation des gouttes. Ce procédé permet d'encapsuler des nanoparticules inorganiques hydrophiles ou hydrophobes. Dans le cas d'encapsulation de nanoparticules hydrophobes, une modification de surface est indispensable afin de favoriser la compatibilité entre les deux matériaux. Ce procédé est généralement utilisé pour réaliser en une étape les nanoparticules inorganiques et leurs encapsulations par une couche polymériques.

Pour une application *in vivo*, l'utilisation de monomère est bannie suite aux résidus de fin de polymérisation. Ainsi, le procédé d'encapsulation de molécules actives dans une matrice polymérique *via* la double émulsion et évaporation de solvant a été adapté à l'encapsulation de nanoparticules inorganiques. Cette technique est basée sur l'élaboration d'une première émulsion eau dans huile et par la suite une émulsion eau dans huile dans eau. Ce procédé basé uniquement sur la formulation commence à être utilisé pour l'élaboration de particules pour applications thérapeutiques.

D'autres procédés en plusieurs étapes combinant la chimie et la physico-chimie sont également reportés dans la littérature. Parmi ces procédés nous pouvons citer par exemple l'encapsulation sur semence polymérique. Ceci consiste dans un premier temps à adsorber des nanoparticules sur une semence colloïdale et à encapsuler par la suite *via* la polymérisation radicalaire. Ce procédé complexe ne conduit pas à une encapsulation efficace suite à un relargage des nanoparticules lors de l'étape d'encapsulation.

L'utilisation de supports particuliers a permis de révolutionner le diagnostic biomédical et en particulier les bionanotechnologies. En effet, elles permettent de simplifier les étapes impliquées dans le diagnostic biomédical. Les particules magnétiques par exemple sont largement utilisées dans la séparation, la purification et la concentration des biomolécules. Elles sont également utilisées en imagerie biomédicale.

Les particules colloïdes présentent un intérêt incontestable et leur utilisation a permis de révolutionner le diagnostic biomédical et en particulier les bionanotechnologies. La propriété de chaque type de particules est exploitée comme simple support augmentant la surface de capture, réduisant ainsi les cinétiques d'interactions, pour accroître la sensibilité et la spécificité et baisser les coûts par analyse. A titre d'illustration, deux grandes classes de particules sont utilisées : les colloïdes magnétisables et particules à propriétés photophysiques.

Les particules magnétiques et en particulier les latex magnétiques correspondant aux nanoparticules d'oxyde de fer encapsulées dans des particules polymériques sont utilisés dans des automates d'analyses et de préparation d'échantillons où la rapidité, la purification et l'enrichissement sont des atouts commerciaux très recherchés. Les systèmes colloïdaux à propriété photophysique sont largement utilisés en imagerie biomédicale qui consiste à mettre en évidence la zone maline sur les fragments de tissus pour le dépistage de tumeurs cancéreuses. Ce type de particules est également utilisé dans le tri et le comptage de cellules infectées

Encapsulation of inorganic nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* biomedical applications

R.Ladj^{1,2}, A. Bitar¹, M. Eissa¹, H. Fessi¹, Y. Mugnier², R. Le Dantec², A. Elaissari^{1*}

¹) University of Lyon, F- 69622, Lyon, France; University of Lyon-1, Villeurbanne, CNRS, UMR 5007, LAGEP-CPE-308G, 43 bd. du 11 Nov.1918, F-69622, Villeurbanne, France.

²) SYMME, University of Savoie, BP 80439, 74944, Annecy Le Vieux Cedex, France.

Abstract

Hybrid colloidal particles are largely used in various applications and are principally of high attractive attention in life science. Recently, they are used as carriers for biomolecules, and exploited for use in Microsystems, microfluidics and in lab-on-chip based bionanotechnology. Various kinds of hybrid particles can be listed starting from classical inorganic nanoparticles such as silica, gold, silver, iron oxide and those exhibiting intrinsic properties such as semiconducting nanoparticles (e.g. quantum dots). As a general tendency, to be conveniently used in biomedical applications, the encapsulation of the inorganic nanoparticles in polymer matrix is incontestably needed. Consequently, various chemistry based encapsulation processes have been developed and found to show promising results compared to the encapsulation using preformed polymers.

1. Introduction

In the last decade, significant scientific and technological interest has focused on polymer-inorganic nanocomposites (PINCs). The use of inorganic nanoparticles into the polymer matrix can provide high-performance novel materials that find interesting applications in many industrial and even in biomedical domains as solid-phase supports in numerous biomedical applications^{[1][2]}. This led to the development of many processes for preparation of inorganic nanoparticles and their encapsulation in order to obtain well defined structure, functionalized, and reactive or stimuli-responsive colloidal particles^{[3]-[5]}. Generally, there are the so-called structured hybrid particles which consist of a heterogeneous distribution of inorganic nanoparticles in polymers matrix of different natures^[6]. For practical reasons, these hybrids are often consisted of hydrophilic inorganic nanoparticles and hydrophobic polymer matrix. Although the general methods for synthesizing hybrid colloidal dispersions are now well known, the control of their morphology and colloidal properties remains somewhat uncertain. This can be attributed to the incompatibility between the inorganic material and the

polymer nature, especially in the presence of polymerization process using water insoluble monomers^[7].

The use of modern analysis methods permits improved knowledge about the internal and superficial morphology of these hybrid particles and provides better understanding of their colloidal behavior. Furthermore, using surface tension of both materials (organic and inorganic) and well appropriate theory has proved an indispensable tool to predict the final morphology of the hybrid particles^[8]. In order to enhance the physical properties of inorganic nanoparticles, the encapsulation of a given number of such nanoparticles was found to be the key point. To target such objective, various encapsulation processes have been developed using various approaches; chemical, physical chemistry or self-assembly^[1].

The chemical approach is based on encapsulation of native or chemically modified inorganic nanoparticles via emulsion polymerization in dispersion media. In this direction, various polymerizations in dispersion media have been used such as emulsion, mini-emulsion and microemulsion^{[9]-[11]}. It's interesting to notice that the most used process is related to mini-emulsion^{[12][13]}. On the other hand, the physical chemistry approach is based on specific interaction between inorganic nanoparticles and the preformed polymer. In this field, two approaches have been developed: (i) encapsulation via sequential adsorption of oppositely charged polyelectrolytes on charged inorganic nanoparticles. However, this process leads mainly to the encapsulation of individual inorganic nanoparticles and when the encapsulation of few nanoparticles in one polymer microsphere is targeted, the aggregation phenomenon was incontestably inevitable; (ii) self-assembly method has been developed and it is principally used to encapsulate nanoparticles on a given seed particles. Such multi-step process is performed via sequential adsorption of inorganic nanoparticles and oppositely charged polyelectrolyte on seed colloidal particles. After, such process has been extended to the elaboration of hollow particles^[14].

This review aims to give the readers a background about the basic approaches used for encapsulating inorganic nanoparticles by polymer particles such as latexes. Special attention will be dedicated to the description of the most used approaches. In addition, the advantages and the inconvenient of each process will be discussed. This review will be ended by reporting some fine applications of these hybrid particles in biomedical applications.

2. Inorganic nanoparticles

Nowadays, various kinds of nanoparticles, and particularly the inorganic ones, have been developed and used in numerous applications^[15]. The main advantages of inorganic nanoparticles is attributed to their intrinsic properties, which emanating from their nano-size, including optical properties like fluorescence and magnetic light sensitivity, superparamagnetic properties as well as some biological activities, which can be exploited in various kinds of applications and especially in the bionanotechnology^[16]. These inorganic nanoparticles are generally prepared *via* co-precipitation or polycondensation processes. The most known and used inorganic nanoparticles are reported in Table 1, in which the properties and some remarks are also listed below.

Table 1 Imaging and therapeutic modalities using nanomaterials

Inorganic nanoparticles	Properties	Disadvantages	Application biomedical	References
Iron oxide	Magnetic	Opsonization and fast clearance by phagocytes	Targeting, MRI and delivery	^{[17][18]}
Gold	Fluorescent	Limited penetration depth for imaging and photothermal	Diagnostic, tumor targeting and PTT	^{[19][20]}
QDs	Photoluminescent	Toxicity Limited penetration depth for imaging	Imaging, therapy and sensing	^{[21][22]}

3. Encapsulation of inorganic nanoparticles

Conventional inorganic nanoparticles have high surface polarity; therefore they display extremely low stability in organic medium. The low dispersion stability of inorganic nanoparticles was endeavored to overcome by treating the surface with organic compounds. Encapsulation of inorganic nanoparticles in a polymer matrix under colloidal aspect is of a high importance in various application domains such as cosmetics, paints, additives, etc^[23]. The polymer based encapsulation techniques have been largely reported and various approaches have been used to encapsulate various inorganic nanoparticles like silica, titanium, alumina, calcium carbonate, carbon black, magnetic iron oxides, metal nanoparticles, and quantum dots (e.g. CdS)^{[12][24][30][30]-[33]}. Generally, the encapsulation of inorganic nanoparticles in polymer matrix leads to phase's demixion due to the incompatibility between

organic and inorganic materials^[34]. As a general tendency, the encapsulation of hydrophilic inorganic nanoparticles leads to hemispherical or anisotropic morphologies. In order to overcome this non homogeneous morphology, the surface modification of inorganic nanoparticles has been investigated in order to enhance the compatibility between the two materials^[35]. The surface modification of hydrophilic inorganic nanoparticles has been performed via two main processes; (i) by surfactant adsorption, as reported in the case of iron oxide nanoparticles coated with oleic acid leading to nanoparticles well dispersed in alkane solvents^[36], or by electrostatic self-assembly of preformed polymers^[37], and (ii) via chemical modification which generally based on chemical grafting of spacer arms or molecules, as reported in the case of quantum dots (QDs) as below schematically illustrated.

3.1. Physical encapsulation (polymer adsorption, Layer-by-Layer ...etc.)

This physical chemistry method consists in sequential adsorption on a given charged seed (charged inorganic nanoparticles) and oppositely charged polyelectrolytes, as below illustrated in Figure 1. This adsorption can be governed by attractive electrostatic interaction, via thiol groups, or by specific interactions (e.g. ion pairing, complexation, dipole-dipole...etc)^[38].

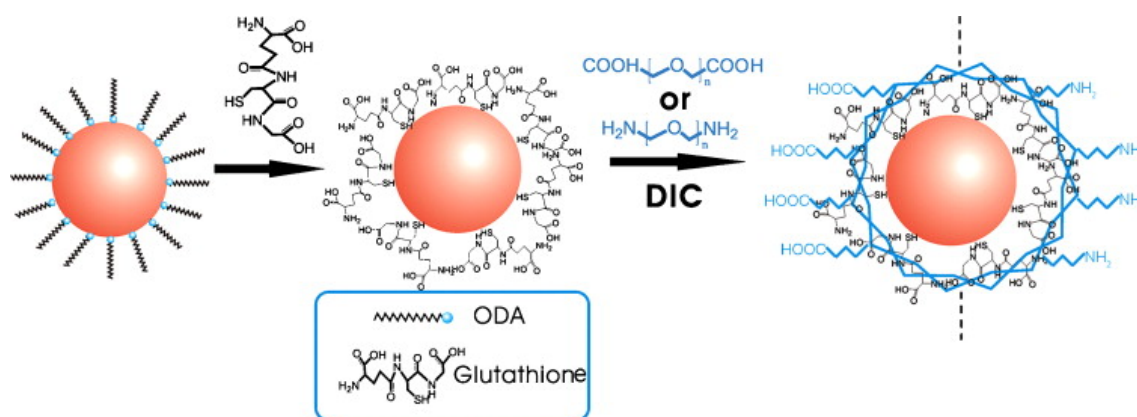


Figure 1: Schematic illustration of the surface modification of Quantum dots nanoparticles^[39].

The main target of such process is to physically entrap the inorganic nanoparticles within the polyelectrolyte's layers forming the shell of the final particles. In order to enhance the amount of encapsulated inorganic nanoparticles in the polymer shell, these particles are incorporated in more than one layer. For illustrating such original approach, quantum dots (QDs) nanoparticles have encapsulated by Chen et al^[37] in polysaccharide nanoparticles via electrostatic interactions. At first, the QDs are chemically modified in order to obtain

hydrophilic surface containing carboxylic groups. Then, the negatively charged QD's particles are electrostatically immobilized on cationic poly-lysine matrix. In order to avoid the release of the adsorbed QDs, (1-ethyl-3-(3)-dimethylaminopropylcarbodiimide (EDC)) or N, N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) is used to crosslink the polymer shell matrix.

In another work, Elaissari et al^[40] have encapsulated oil in water magnetic emulsion for biomedical application using LBL approach via sequential polyelectrolyte adsorption technique. The obtained colloidal particles have high stability and functionality which exploited in specific capture of targeted nucleic acid with high sensitivity^[41].

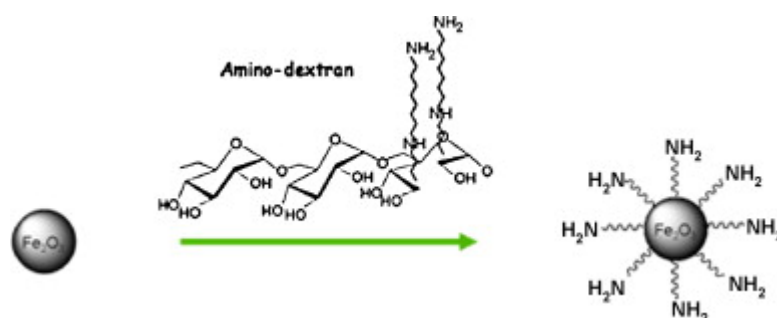


Figure 2: Schematic illustration for encapsulation of inorganic nanoparticles via electrostatic Layer-by-Layer process.

3.2. Encapsulation via polymerization

3.2.1. Emulsion polymerization

Emulsion polymerization has been used and explored to encapsulate various kinds of inorganic nanoparticles^{[5][42]}. Such process has been firstly explored and reported by Daniel et al. for iron oxide encapsulation in polystyrene particles in order to obtain magnetic latex particles for biomedical applications.^[43] Unfortunately, the obtained particles have low encapsulation efficiency, non-homogeneous encapsulation in addition to the presence of bare inorganic nanoparticles (without encapsulation) and also polymer particles free from any inorganic nanoparticles. Accordingly, this polymerization process has been rapidly discarded from the encapsulation of inorganic nanoparticles. As the process of emulsion polymerization is limited because of diffusion processes, the generation of complex structures is often difficult or even impossible. It's interesting to notice that, such batch emulsion polymerization has been principally used to incorporate co-monomers, macro-monomers and surfmers in the formed polymer particles.

3.2.2. Miniemulsion polymerization

In such process, the medium is strongly sheared to obtain identical submicron monomer droplets which are transformed to stable colloidal particles, as shown in Figure (3). The stability of the monomer(s) droplets is achieved by a conventional surfactant in presence of either a co-surfactant (long chain alcohol), or a hydrophobic agent (long chain alkane)^[7]. The initiator used may be either water soluble or organic-soluble. The large surface area developed by these small droplets (submicron in nature) enhances their ability to capture the growing radicals generated by the used initiator. Consequently, each droplet is transformed into a nanoreactor in which the polymerization takes place. In the final step, each droplet is transformed to solid particles^[44]. However, this requires overcoming the presence of micelles so that the droplets are effectively the only particle nucleation sites. Interestingly, one of the major advantages of the miniemulsion is the direct nucleation of monomer droplets and the ability to control the number of final particles by controlling the initial droplets size^[45]. Unlike the conventional emulsion, no diffusion of monomer through the continuous phase is necessary in miniemulsion, which gives to such process a unique opportunity to incorporate inorganic nanoparticles, as largely reported in the literature^{[46][47]}. Various inorganic nanoparticles have been encapsulated in polymer particles through radical miniemulsion polymerization, including: titanium oxide (TiO₂), calcium carbonate (CaCO₃), black coal, ZnO, Quantum Dots (i.e. CdSe/CdS) and iron oxide (Fe₃O₄)^{[48]-[52]}. For instance, the encapsulation of iron oxide nanoparticles by polystyrene particles, using miniemulsion polymerization technique, has been largely reported in order to obtain magnetic latexes. Furthermore, it's interesting to mention the possible use of inverse miniemulsion polymerization for encapsulating hydrophilic inorganic nanoparticles in hydrophilic polymer matrix. This process has been recently investigated by Medeiros et al. by investigating the encapsulation of iron oxide nanoparticles in poly(N-vinyl caprolactam) microgel^[53].

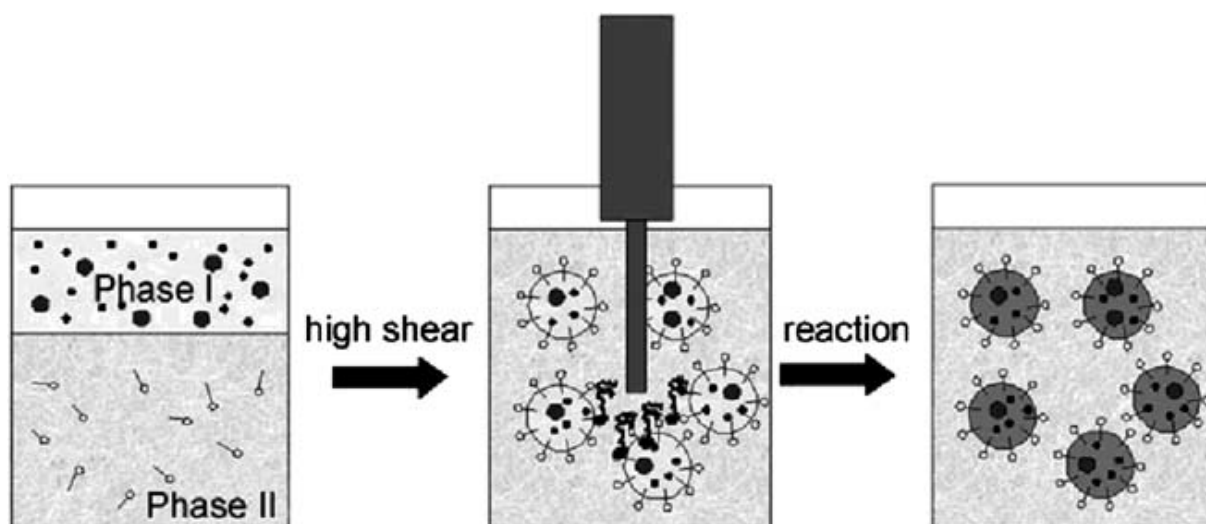


Figure 3: A schematic of the process of miniemulsion polymerization. Reprinted with permission from^[54]. Copyright 2009 Wiley-VCH.

Surprisingly, the encapsulation of inorganic nanoparticles via miniemulsion polymerization is not yet developed in the industrial scale, and this is due partly to difficulties related to the emulsification of large volume using ultrasound process. Nonetheless, it offers a wide range of applications. One of the major advantages of the miniemulsion polymerization process is the direct control of the number of the final particles by controlling the number of initial droplets and consequently the final particles size^[45].

3.2.3. Microemulsion polymerization

Amongst the surfactant-based approaches, microemulsion polymerization is one of the most used techniques for the preparation of structured functional nanoparticles of controlled size and shape^[55]. Oppositely to the direct and inverse emulsions, microemulsions are thermodynamically stable colloidal and generally optically transparent since the particles size is ranging from 10 to 60 nm. The microemulsion recipe requires high surfactant concentration (i.e. largely above the CMC) and in some cases the addition of a co-surfactant (short chain alcohol) is of paramount importance. We can distinguish direct (o/w) and inverse (w/o) microemulsions, depending on the continuous dominant phase. Microemulsion method has several advantages over other polymerization methods (Figure 4) in disperse media, namely, the possibility of preparing a wide variety of colloidal particles with different properties^[10].

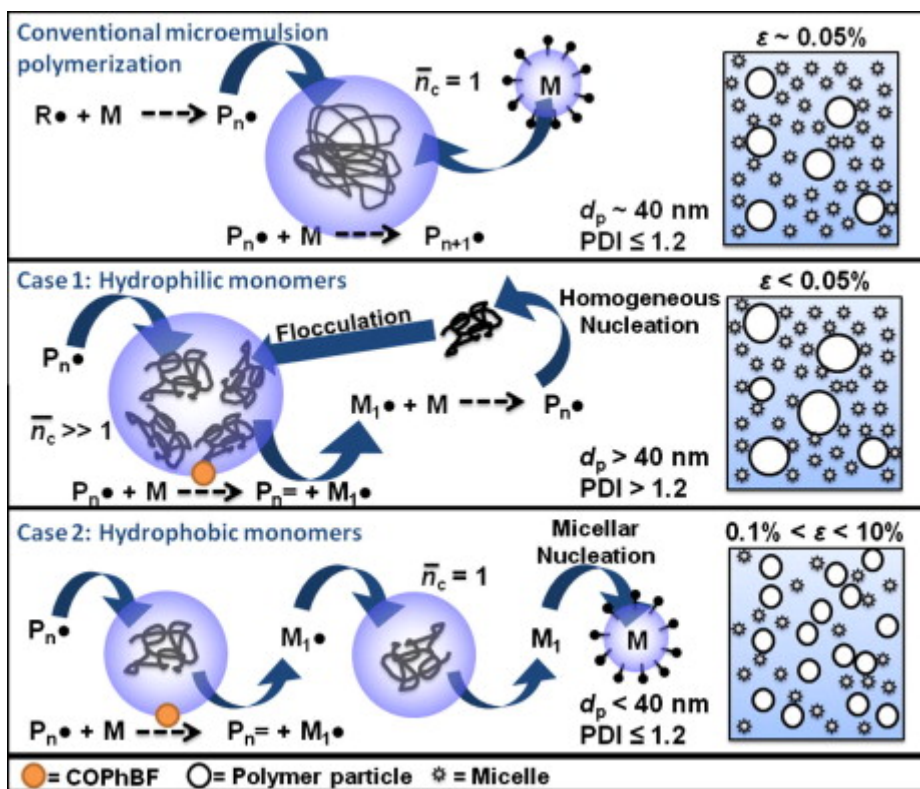


Figure 4: Schematic illustration for inverse micro-emulsion polymerization.

The conventional method is based on the water in oil (w/o) microemulsions, and it was used for the preparation of metal nanoparticles and other minerals since the early 1980s. The droplets of w/o microemulsions are designed as tiny compartments or "nanoreactors". The principal methodology for the synthesis of nanoparticles via w/o microemulsions involves mixing of two microemulsions, one containing the metal precursor and other contains precipitant. The mixing of both reactants and the coalescence of droplets leads to precipitation reaction, and consequently to nanoparticles confined within the microemulsion droplet, as represented in Figure 4.

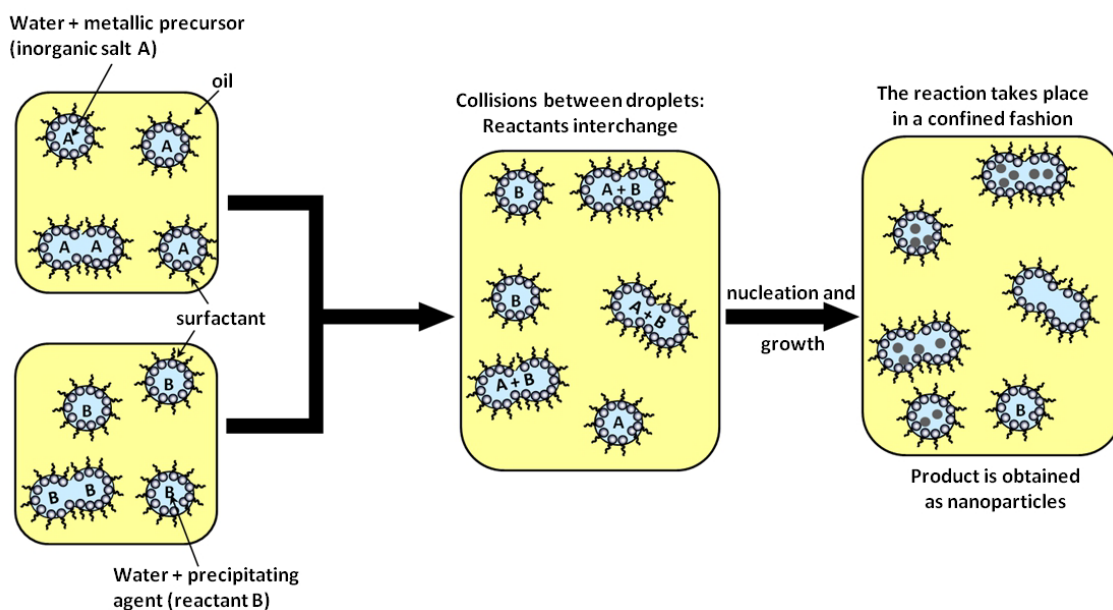


Figure 5: Scheme of the w/o microemulsion reaction method for the synthesis of inorganic nanoparticles.

During the last decade, the synthesis of multifunctional silica nanoparticles bearing well defined core-shell to more complex morphologies has been reported using microemulsion polymerization technique^[56]. Furthermore, many interesting results have been published on the use of w/o microemulsions for the preparation of a variety of nanomaterials, such as metallic nanoparticles, metal oxides, quantum dots, and even the most complex ceramics materials^{[57]–[60]}.

Despite the superior performance and properties of nanoparticles obtained in w/o microemulsions, this method has not found good acceptance in the industrial scale due to the use of large quantities of oil (solvent) and also surfactant which represent the main chemical composition of these systems. Furthermore, most studies used a relatively low concentration of metal precursors, leading to low yields of nanoparticles. These drawbacks affect negatively from the economic and ecologic point of view. Accordingly, various studies have been done to solve this shortcoming. For instance, nanosized bismuth crystals have been encapsulated by poly(methyl methacrylate) (PMMA) using inverse microemulsion technique^[61]. In another report, the PMMA-coated nanoparticles were protected from oxidation and showed high crystallinity and purity of single phase when compared with bismuth nanoparticles synthesized from microemulsion without polymer^[61]. Moreover, Peng Liu has successfully prepared core-shell ZnO “nanoparticles@polystyrene” using facile soapless microemulsion

polymerization of styrene with oleic acid modified zinc oxide nanoparticles as seed. This method was convenient for encapsulation of certain nanoparticles^[62].

With all this progress, emulsion polymerization and the various technologies derived from them, seem well adapted to tackle new challenges such as developing stimuable particles or hybrid particles intimately combining the organic and inorganic matter and to meet the multiple needs associated with the development of nanoscience and nanotechnology.

3.3. Adsorption on a seed followed by polymerization

This stepwise process is based on two consecutive approaches, physical adsorption approach followed by chemical encapsulation. In this direction, Sauzedde et al.^{[63][64]} developed a new method for the synthesis of hybrid particles based on the work first described by Furusawa et al^[65]. This method consists in first adsorption of inorganic nanoparticles (i.e. iron oxide nanoparticles) on seed polystyrene core-thermally sensitive cationic poly(N-isopropylacrylamide) (poly(NIPAM)) shell, via electrostatic interactions. After few washes to remove free inorganic nanoparticles, the seed radical polymerization was carried out using NIPAM monomer, itaconic acid as a functional monomer and N,N'-methylenebisacrylamide (MBA) as a crosslinking agent. The final hybrid particles were monodisperse and exhibited up to 25% wt/wt. inorganic nanoparticles as estimated by TGA. The observed low encapsulated amount is principally related to desorption of the inorganic nanoparticles during polymerization process. It is interesting to note that the incorporated inorganic nanoparticles were continuously released during the storage (Figure 6).

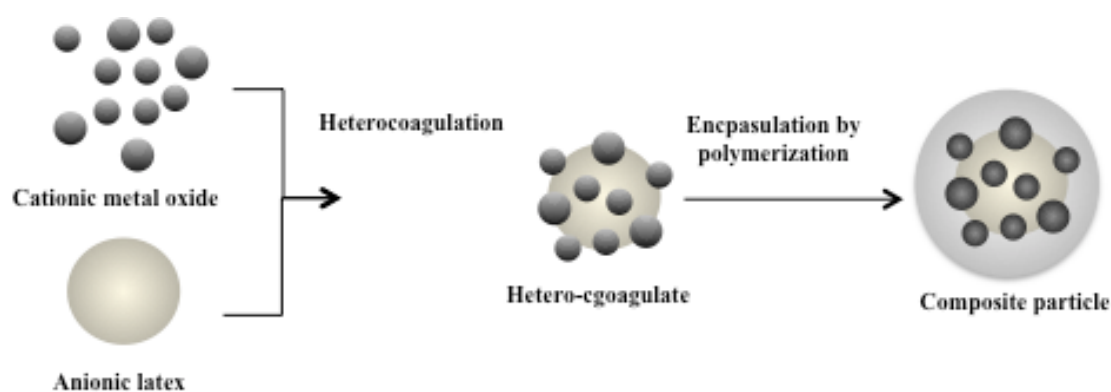


Figure 6: Schematic illustration for encapsulation of inorganic nanoparticles via stepwise adsorption and chemical encapsulation via seed polymerization.

3.4. Double emulsion like process

This interesting process based on oil in water in oil (o/w/o) emulsification like was firstly developed for encapsulating hydrophilic and hydrophobic active molecules^{[66][67]}. At first, water in oil (w/o) emulsion was prepared and then transferred into water phase in order to get w/o/w emulsion. To obtain stable and rigid polymer particles, solvent evaporation was then performed^[68]. In this process, the oil phase is a solvent-miscible with water, such as dichloromethane (DCM), acetone and ethanol; while the polymer was solved in the organic solvent. For encapsulation of hydrophilic inorganic nanoparticles, these should be dispersed firstly in the water phase. Whereas, the encapsulation of hydrophobic inorganic nanoparticles requires complete dispersion in the solvent phase containing polymer. The particles size of these hybrid colloidal dispersions is controlled mainly by the high shearing velocity, which leads to submicron hybrid particles^[69]. This approach has been recently investigated by Ahmed et al by investigating all parameters affecting the colloidal properties of the final particles^[70]. This o/w/o has been explored by encapsulating iron oxide nanoparticles for *in vivo* imaging, and nowadays, it's the unique template to obtain hybrid particles for theranostic applications (for both *in vivo* diagnosis and drug release)^[15], as illustrated in the Figure 7.

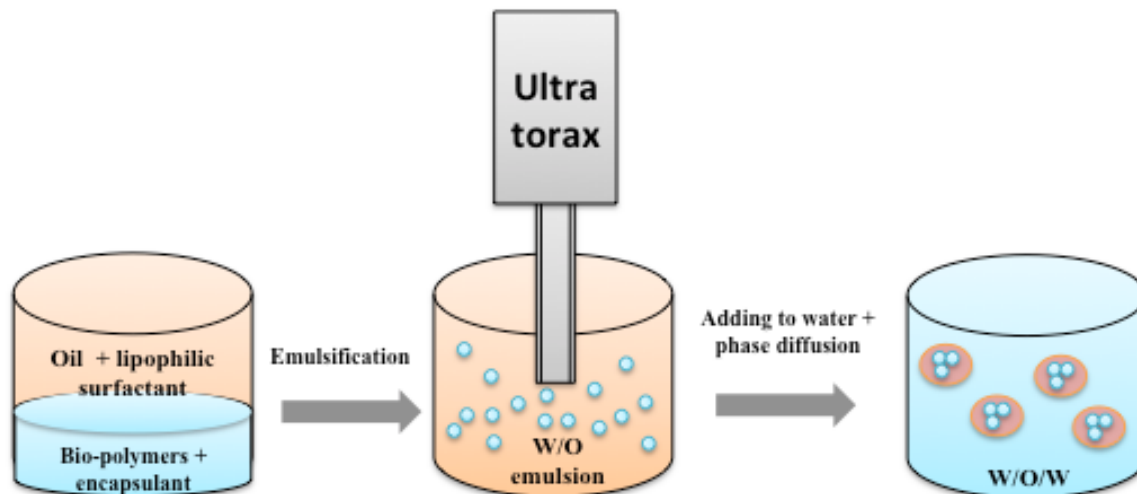


Figure 7: Schematic illustration for encapsulation of inorganic nanoparticles and active molecules for theranostic application via w/o/w emulsion like process.

4. Biomedical applications

Nowadays, functional hybrid colloidal particles (inorganic/latexes) have found extensive use in various biomedical applications including *in vitro* diagnostic, bioseparation and *in vivo* bionanotechnological applications^{[41][71]–[73]}. The most popularly used inorganic nanoparticles

are iron oxide, ZnO, gold, silver, and quantum dots. Their importance stems from their unique and interesting features, including nano or submicronic size, optical, magnetic, electronic, and/or catalytic properties. For instance, the coupling of biomolecules to magnetic field stimuli responsive carriers (e.g. superparamagnetic iron oxide colloidal particles) can be exploited to achieve rapid, simple, and specific separation of biomolecules under the effect of an external magnetic field, and consequently it saves time and efforts as compared to the conventional filtration and centrifugation processes, which are laborious and time consuming [4][74]. Generally, *in vitro* diagnostic field, inorganic colloidal nanoparticles have been used as carriers for biomolecules (proteins, antibodies, antigen, etc.), in separation and purification of biomolecules, as probes for DNA/RNA hybridization and identification, and for protein and nucleic acid detection. Furthermore, they found interesting applications *In vivo* diagnostic as in magnetic resonance imaging (MRI) as contrasting agents, and in therapeutic applications as in targeted drug delivery and hyperthermia^{[75]–[77]}.

4.1. *In vitro* applications of encapsulated inorganic nanoparticles

Non-biodegradable hybrid latexes have received an increasing interest as solid-phase supports in numerous applications, especially for the *in vitro* biomedical diagnostic domain^[78]. This interest is due to the versatility of many heterophase polymerization processes (emulsion, dispersion, precipitation) for making and tailoring well-defined vectors presenting various particle sizes and surface reactive groups^[79]. Moreover, these processes can be based on the use of preformed polymers. The main objective of the coming parts is to illustrate the use of some hybrid particles in biomedical applications.

Biomedical diagnosis are based on the identification and quantification of metabolites(uree, cholesterol,...)^[80], biological molecules (nucleic acids, proteins, ...)^{[71][81]} or pathogens (viruses, bacteria)^{[82][83]} present in biological samples. The extraction of the target biomolecules is mainly based on the use of various solid supports and the most used is the magnetic latex particles whose are describes above. The main problem of biomedical diagnosis is related to the detection step and consequently to the sensitivity. The challenge in any diagnostic is to be able to detect and to identify one targeted molecule of a given analyte (*i.e.* one bacteria or one virus particle)^{[82][84]}. To target such objective, various fluorescent particles were elaborated as above discussed and evaluated *in vitro* biomedical diagnostic.

In recent years, increasing interest has been focused on the preparation of magnetic latex particles for diagnostic applications. The pioneer work in this field was performed by reporting the preparation of various magnetic colloids based on the surface modification of

iron oxide nanoparticles (particle size less than 60 nm)^[85]. Then, various additional magnetic particles and latexes were elaborated as evidenced from the numerous reported papers^{[53][86]–[92]}. All elaborated magnetic colloids are principally used as solid supports for covalent immobilization of biomolecules involved in specific capture of a given target (such as ELISA and ELOSA tests)^{[93][94]}.

Nowadays, the main objective in biomedical diagnosis is the elaboration of new magnetic colloids and methodologies in order to enhance analysis sensitivity and specificity^[95]. The problem encountered in this field, and particularly in the area of nucleic acid probes, is the level of sensitivity. One possibility to partially solve this problem is to increase the concentration of the target (RNA and/or DNA) in the considered medium before specific detection and amplification of the target probe. Then utilization of appropriate magnetic latex particles for extraction and concentration of nucleic acids would be of extreme interest as illustrated in the Figure 8^[94].

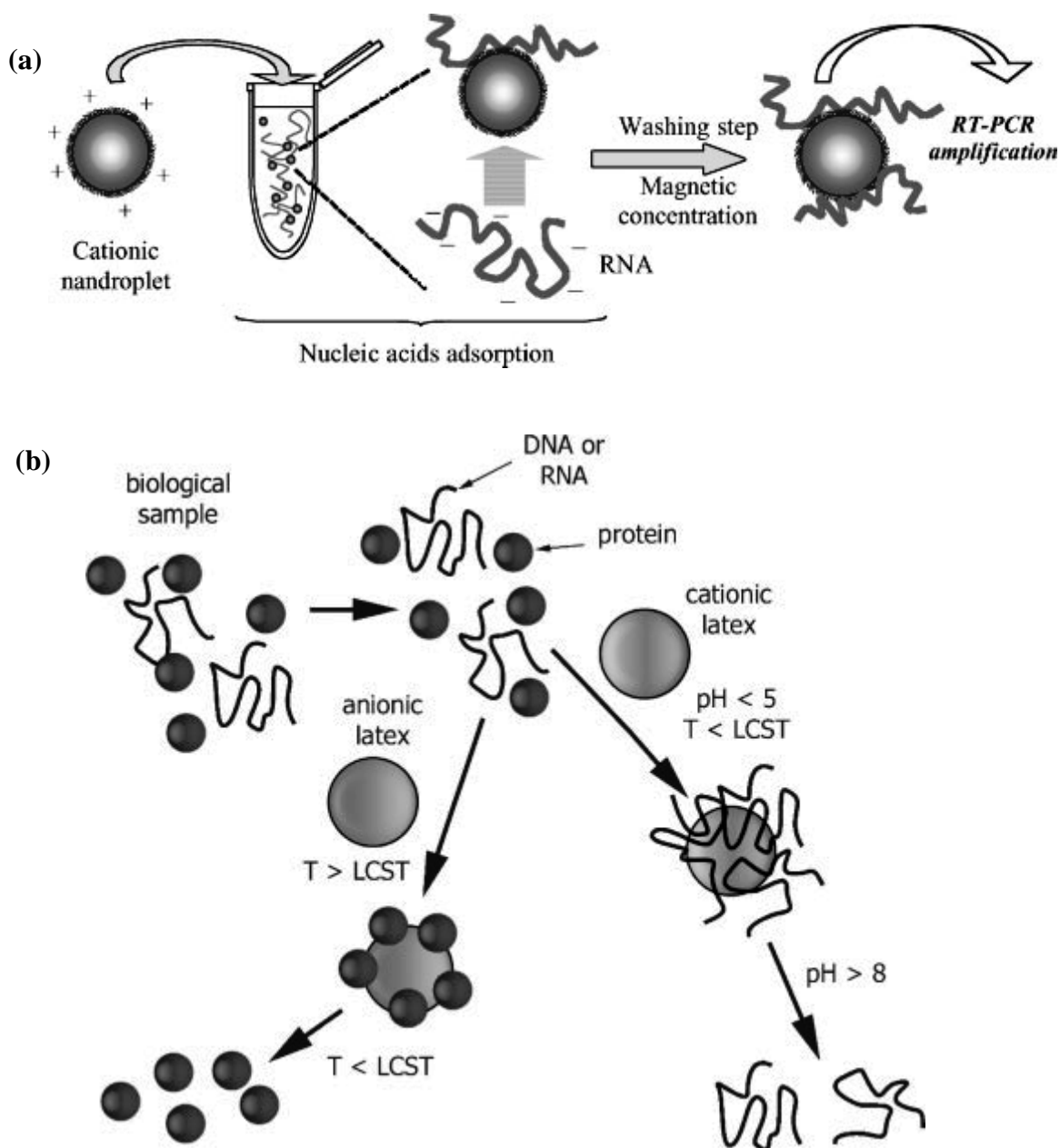


Figure 8: Schematic illustration: (a) Non-specific capture, purification, and concentration of nucleic acid molecules. (b) Proteins and nucleic acids extraction, purification, and concentration using thermally sensitive microgel particles.

Nowadays, magnetic latex particles are used for samples preparation area which consists in the extraction of targeted analyte from complex samples (i.e. blood, food, tissue, water air etc...). Then, well designed magnetic latex particles are of great interest in molecular biology which consists in nucleic acids extraction, purification, and concentration before any detection for PCR or RT-PCR amplification. In such field, the extracted biomolecules are used in lab-on-chip, microfluidic and microsystems in order to enhance the sensitivity, the specificity and

the rapidity of biomedical diagnosis^[96]. To reduce the involving steps, the magnetic particles are mainly used as carrier for transport mission^[97]. Another interesting application of colloidal magnetic nanoparticles is their use as labels in magnetoresistive detectors, as reported by Schotter et al.^[98]. This technology has been used in biomedical field for detection by exploring the possibility of using giant modified magnetoresistive (GMR). For instance, streptavidin containing magnetic nanoparticles were used to detect biotin containing single stranded DNA fragment after hybridization with the capture probe which first immobilized on GMR surface. By using such approach, DNA was detected even at concentration lower than 16 pg/ μ l.

4.2. *In vivo* Applications of encapsulated inorganic nanoparticles

Amongst the inorganic nanoparticles used for *in vivo* applications are iron oxide nanoparticles. This can be attributed to their superparamagnetic properties, biocompatibility and low toxicity in the human body, simple and low cost preparation^[87]. The individual magnetic nanoparticles have large constant magnetic moment and behave like a giant paramagnetic atom with a fast response to applied magnetic field with negligible remanence (residual magnetism). Such particles are mainly used for *in vivo* diagnostic applications as contrasting agent in magnetic resonance imaging (MRI), drug carriers, and also for hyperthermia applications^{[95][99]-[111]}. In this special field, the used polymer matrix should be biodegradable. The hyperthermia therapy of magnetic polymer particles involves a local increase in the temperature (up to 45°C) of the tumor cell when an external magnetic field is applied on these magnetic polymer particles. Such a temperature increase can be lethal for the temperature sensitive cells^[112]. For biomolecules immobilization, nanoparticles of monodisperse magnetic spheres with epoxy reactive functional groups were prepared, based on St-EGDMA-GMA copolymer, using spraying suspension polymerization technique. These particles have been sufficiently used for protein (BSA) immobilization assay^[113].

Maghemite (γ -Fe₂O₃) nanoparticles encapsulated with poly(NIPAM) were prepared by solution radical polymerization^[114]. The *in vitro* cellular uptake results indicate that these particles exhibit higher efficiency in labeling rat and human bone marrow mesenchymal stem cells than pristine maghemite nanoparticles and even dextrane-modified nanoparticles^[115].

Specific targeting is an interesting approach toward increasing the local accumulation of the encapsulated nanoparticles in the diseased tissue (5,200). Using this approach, specific biomolecules (folic acid, peptides, proteins, and antibodies) were conjugated with these magnetic particles to be targeted to specific cells.

Polymer particles containing quantum dots are also used for *in vivo* applications and almost of experiments have been performed on animals only, due probably to the possible toxicity of such materials^[116].

Recently, a new class of inorganic nanoparticles used for optical imaging markers have been investigated^{[117]–[125]}. These inorganic nanoparticles having a noncentrosymmetric structure emit light through the second-harmonic generation (SHG) mechanism rather than the widely used fluorescence.

SHG-nanoprobes offer unique advantages for biomedical application, essentially, for single molecule and deep-tissue imaging (i.e. in the millimeter range). Grange et al.^[126] have demonstrated that second harmonics probes are efficient bio-markers for tissue imaging. They injected BaTiO₃ nanoparticles under the skin of the tail of mouse then visualized monitoring of nanoparticles by confocal microscope (Figure 9). They have demonstrated that the obtained signal is the second harmonic issued by nanoparticles of BaTiO₃. Pantazis et al.^[127] have injected the BaTiO₃ nanoparticles into one-cell stage zebrafish embryos, demonstrating that using BaTiO₃ nanoparticles *in vivo* bioimaging have an excellent photo-stability for long term without photobleaching and blinking, flexibility to choose the excitation wavelength, coherent signals for imaging, 3D scanning less, excellent biocompatibility and ultra-fast response time. Recently, Pu et al.^[128], he demonstrated that enhancement of the SHG signal with core-shell SHG-nanoprobes provides high brightness for optimal contrast

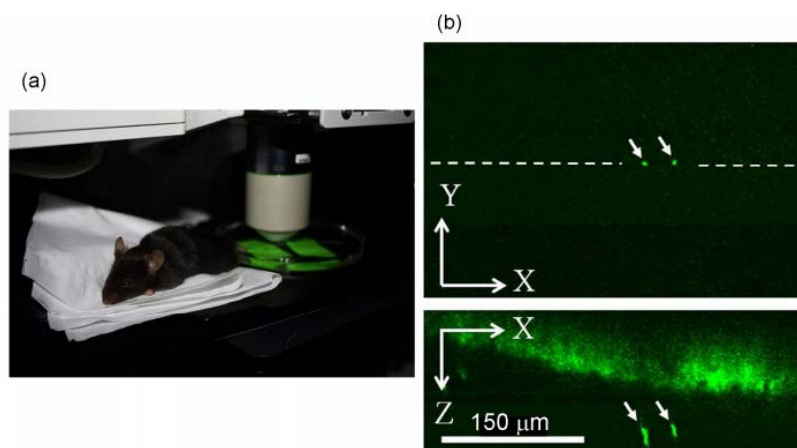


Figure 9: In vivo sample for SHG imaging. (a) Sample diagram (b) Scanning confocal imaging of SHG-nanoprobes embedded 100 μm below a mouse tail tissue. (The pixel sizes are x and $y = 379$ nm, $z = 881$ nm). The arrows show the same SHG-nanoprobes on both views^[126].

5. Conclusion

The examination of state of the art in the field of encapsulation of inorganic nanoparticles in polymer matrix under colloidal dispersion forms, allowed us to describe and better understand the advances in the encapsulation of preformed inorganic nanoparticles leading to the elaboration of hybrid latex particles. In the cases of polymerization based processes, surface modification of inorganic particles is the key point to target homogeneous encapsulation, well-defined core-shell morphology and good encapsulation efficiency. In addition, the encapsulation via polymerization in dispersed media lead to large batches.

The major problem related to such process is the incompatibility of inorganic nanoparticles (hydrophilic) with the organic polymer material. The alternative to solve this problem is to modify the surface of these nanoparticles in order to make them initially dispersible in an organic phase and then compatible with the formed organic polymer matrix. After surface modification, the miniemulsion seems to be one of the most appropriate methods for their incorporation effectively in submicron polymer particles.

Whereas, the encapsulation using physical chemistry approach leads incontestably to the concomitant formation of clusters and targeted stable hybrid particles.

Regarding the application of hybrid particles in biomedical area such as therapy, *in vivo* diagnosis and *in vitro* medical diagnosis, various works and approaches have reported in the literature as can be evidenced by the numerous reported works. Indeed, hybrid particles are commonly used as solid phase supports of biomolecules in *in vitro* diagnosis. In this field, hybrid particles bearing immobilized biomolecules are used in immunoassay, specific nucleic acids capture, cell sorting and nowadays in numerous biotechnological applications.

The encapsulation of inorganic nanoparticles leading to hybrid particles for *in vivo* diagnosis are mainly dedicated to *in vivo* diagnosis such as magnetic resonance imaging, hyperthermia, and now expanded to be efficiently used in theranostic applications which are combination of *in vivo* diagnosis and therapy.

Acknowledgements

This research has been partially conducted under the European FP7 Research Project *NAMDIATREAM* (NMP4-LA-2010-246479,<http://www.namdiatream.eu>) and INTERREG IV France-Switzerland *NAOMI*. We thank MACODEV for financial support of Rachid Ladj PhD thesis.

References

- [1] S. Li, M.M. Lin, M.S. Toprak, D.K. Kim, M. Muhammed, *Nano Reviews* **2010**, *1*.
- [2] D. Nguyen, H.S. Zondanos, J.M. Farrugia, A.K. Serelis, H. Chris, B.S. Hawsett, *Langmuir* **2008**, *24*, 2140–2150.
- [3] C.F. Lee, M.L. Lin, Y.C. Wang, W.Y. Chiu, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2012**.
- [4] M.M. Rahman, A. Elaissari, in *Hybrid Latex Particles* (Eds: A.M. Herk, K. Landfester), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2010**, 237–281.
- [5] S. Braconnot, M.M. Eissa, A. Elaissari, *Colloid & Polymer Science* **2012**, 1–11.
- [6] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J.M. Kenny, *Polymer Degradation and Stability* **2010**, *95*, 2126–2146.
- [7] K. Landfester, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 4488–4507.
- [8] M. Mičušík, A. Bonnefond, Y. Reyes, A. Bogner, L. Chazeau, C. Plummer, M. Paulis, J.R. Leiza, *Macromolecular Reaction Engineering* **2010**, *4*, 432–444.
- [9] K. Landfester, C.K. Weiss, in *Modern Techniques for Nano- and Microreactors/-reactions* (Ed: F. Caruso), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2010**, 1–49.
- [10] Y. Deng, L. Wang, W. Yang, S. Fu, A. Elaissari, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2003**, *257*, 69–78.
- [11] X. Ding, J. Zhao, Y. Liu, H. Zhang, Z. Wang, *Materials Letters* **2004**, *58*, 3126–3130.
- [12] B. Erdem, E.D. Sudol, V.L. Dimonie, M.S. El-Aasser, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2000**, *38*, 4431–4440.
- [13] B. Erdem, E.D. Sudol, V.L. Dimonie, M.S. El-Aasser, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2000**, *38*, 4441–4450.
- [14] F. Caruso, R.A. Caruso, H. Möhwald, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3309–3314.
- [15] N. Ahmed, H. Fessi, A. Elaissari, *Drug Discovery Today* **2012**.
- [16] C.C. Berry, *Nanobiotechnology: Inorganic Nanoparticles Vs Organic Nanoparticles* **2012**, *4*, 159.
- [17] K.H. Bae, K. Lee, C. Kim, T.G. Park, *Biomaterials* **2011**, *32*, 176–184.
- [18] J. Xie, J. Huang, X. Li, S. Sun, X. Chen, *Current Medicinal Chemistry* **2009**, *16*, 1278–1294.
- [19] X. Huang, M.A. El-Sayed, *Journal of Advanced Research* **2010**, *1*, 13–28.
- [20] P. Rai, S. Mallidi, X. Zheng, R. Rahmanzadeh, Y. Mir, S. Elrington, A. Khurshid, T. Hasan, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62*, 1094–1124.
- [21] W. Wu, M. Aiello, T. Zhou, A. Berliner, P. Banerjee, S. Zhou, *Biomaterials* **2010**, *31*, 3023–3031.
- [22] A.M. Smith, H. Duan, A.M. Mohs, S. Nie, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1226–1240.
- [23] W. Peng, S. Qu, G. Cong, Z. Wang, *Crystal Growth & Design* **2006**, *6*, 1518–1522.
- [24] D.G. Yu, J.H. An, J.Y. Bae, Y.E. Lee, S.D. Ahn, S.Y. Kang, K.S. Suh, *Journal of Applied Polymer Science* **2004**, *92*, 2970–2975.
- [25] I. Sondi, T.H. Fedynyshyn, R. Sinta, E. Matijevic, *Langmuir* **2000**, *16*, 9031–9034.
- [26] P. Liu, L. Zhang, Z. Su, *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, *100*, 3433–3438.
- [27] Z. Zeng, J. Yu, Z.X. Guo, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2005**, *206*, 1558–1567.
- [28] S.D. Seul, S.R. Lee, Y.H. Kim, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, *42*, 4063–4073.
- [29] S. Jian-ming, B. Yong-zhong, H. Zhi-ming, W. Zhi-xue, *Journal of Zhejiang University-Science A* **2004**, *5*, 709–713.

- [30] H.Y. Li, H.Z. Chen, W.J. Xu, F. Yuan, J.R. Wang, M. Wang, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2005**, 254, 173–178.
- [31] S.J. Lee, J.R. Jeong, S.C. Shin, J.C. Kim, Y.H. Chang, Y.M. Chang, J.D. Kim, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2004**, 272, 2432–2433.
- [32] J. Chatterjee, M. Bettge, Y. Haik, C. Jen Chen, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, 293, 303–309.
- [33] T. Hirai, T. Saito, I. Komasa, *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, 9711–9714.
- [34] T. Saegusa, in *Macromolecular Symposia*, **1995**, 719–729.
- [35] R.Y. Hong, J.H. Li, L.L. Chen, D.Q. Liu, H.Z. Li, Y. Zheng, J. Ding, *Powder Technology* **2009**, 189, 426–432.
- [36] F. Montagne, O. Mondain-Monval, C. Pichot, H. Mozzanega, A. Elaïssari, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2002**, 250, 302–312.
- [37] Y. Chen, T. Ji, Z. Rosenzweig, *Nano Lett.* **2003**, 3, 581–584.
- [38] R.A. Sperling, W.J. Parak, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2010**, 368, 1333–1383.
- [39] P. Zhang, H. Han, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2012**, 402, 72–79.
- [40] F. Montagne, O. Mondain-Monval, C. Pichot, A. Elaïssari, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2006**, 44, 2642–2656.
- [41] R. Veyret, T. Delair, A. Elaïssari, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, 293, 171–176.
- [42] H. Xia, C. Zhang, Q. Wang, *Journal of Applied Polymer Science* **2001**, 80, 1130–1139.
- [43] J.-C. Daniel, J.-L. Schuppiser, M. Tricot, deceased, *Magnetic Polymer Latex and Preparation Process*, **1982**, U.S. Patent 4358388.
- [44] K. Landfester, N. Bechthold, S. Förster, M. Antonietti, *Macromolecular Rapid Communications* **1999**, 20, 81–84.
- [45] J.L. Reimers, F.J. Schork, *Journal of Applied Polymer Science* **1996**, 60, 251–262.
- [46] O. Behrend, K. Ax, H. Schubert, *Ultrasonics Sonochemistry* **2000**, 7, 77–85.
- [47] M. Antonietti, K. Landfester, *Progress in Polymer Science* **2002**, 27, 689–757.
- [48] G.H. Al-Ghamdi, E.D. Sudol, V.L. Dimonie, M.S. El-Aasser, *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 101, 3479–3486.
- [49] E. Kobitskaya, D. Ekinci, A. Manzke, A. Plettl, U. Wiedwald, P. Ziemann, J. Biskupek, U. Kaiser, U. Ziener, K. Landfester, *Macromolecules* **2010**, 43, 3294–3305.
- [50] J. Dou, Q. Zhang, L. Jian, J. Gu, *Colloid & Polymer Science* **2010**, 288, 1751–1756.
- [51] A.C.C. Esteves, A. Barros-Timmons, T. Monteiro, T. Trindade, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2005**, 5, 766–771.
- [52] F. Tiarks, K. Landfester, M. Antonietti, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2001**, 202, 51–60.
- [53] S.F. Medeiros, A.M. Santos, H. Fessi, A. Elaïssari, *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **2012**, 1, 99–112.
- [54] D. Tuncel, H.V. Demir, *Nanoscale* **2010**, 2, 484.
- [55] J.K. Oh, J.M. Park, *Progress in Polymer Science* **2011**, 36, 168–189.
- [56] A. Guerrero-Martínez, J. Pérez-Juste, L.M. Liz-Marzán, *Advanced Materials* **2010**, 22, 1182–1195.
- [57] D.H.M. Buchold, C. Feldmann, *Advanced Functional Materials* **2008**, 18, 1002–1011.
- [58] I. Capek, *Advances in Colloid and Interface Science* **2004**, 110, 49–74.
- [59] L.F. Xi, Y.M. Lam, *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 316, 771–778.

- [60] S.-S. Hong, M.S. Lee, H.-S. Hwang, K.-T. Lim, S.S. Park, C.-S. Ju, G.-D. Lee, *Solar Energy Materials and Solar Cells* **2003**, *80*, 273–282.
- [61] J. Fang, K.L. Stokes, J. Wiemann, W. Zhou, *Materials Letters* **2000**, *42*, 113–120.
- [62] P. Liu, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *291*, 155–161.
- [63] F. Sauzedde, F. Ganachaud, A. Elaïssari, C. Pichot, *Journal of Applied Polymer Science* **1997**, *65*, 2331–2342.
- [64] F. Sauzedde, A. Elaïssari, C. Pichot, *Colloid & Polymer Science* **1999**, *277*, 846–855.
- [65] K. Furusawa, K. Nagashima, C. Anzai, *Colloid & Polymer Science* **1994**, *272*, 1104–1110.
- [66] N. Garti, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1997**, *123*, 233–246.
- [67] D. Georgieva, V. Schmitt, F. Leal-Calderon, D. Langevin, others, *Langmuir* **2009**, *25*, 5565–5573.
- [68] R. Alex, R. Bodmeier, *Journal of Microencapsulation* **1990**, *7*, 347–355.
- [69] S. Cohen, T. Yoshioka, M. Lucarelli, L.H. Hwang, R. Langer, *Pharmaceutical Research* **1991**, *8*, 713–720.
- [70] N. Ahmed, M. Michelin-Jamois, H. Fessi, A. Elaïssari, *Soft Matter* **2012**, *8*, 2554–2564.
- [71] A. Elaïssari, M. Rodrigue, F. Meunier, C. Herve, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2001**, *225*, 127–133.
- [72] M.C. Gutierrez, M.L. Ferrer, P. Tartaj, F. Monte, *Hybrid Nanocomposites for Nanotechnology* **2009**, 707–768.
- [73] S. Roux, O. Tillement, C. Billotey, J.L. Coll, G. Duc, C. Marquette, P. Perriat, *International Journal of Nanotechnology* **2010**, *7*, 781–801.
- [74] A. Elaïssari, H. Fessi, in *Macromolecular Symposia*, **2010**, 115–120.
- [75] A. Kondo, H. Kamura, K. Higashitani, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1994**, *41*, 99–105.
- [76] X. Huang, X. Meng, F. Tang, L. Li, D. Chen, H. Liu, Y. Zhang, J. Ren, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 445101.
- [77] E. Oh, M.Y. Hong, D. Lee, S.H. Nam, H.C. Yoon, H.S. Kim, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 3270–3271.
- [78] P. Fromherz, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 276–284.
- [79] J.P. Rao, K.E. Geckeler, *Progress in Polymer Science* **2011**, *36*, 887–913.
- [80] A.R. Fernie, R.N. Trethewey, A.J. Krotzky, L. Willmitzer, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2004**, *5*, 763–769.
- [81] Z. Gu, A. Biswas, K.-I. Joo, B. Hu, P. Wang, Y. Tang, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6467–6469.
- [82] R. Veyret, A. Elaïssari, P. Marianneau, A.A. SALL, T. Delair, *Analytical Biochemistry* **2005**, *346*, 59–68.
- [83] Z. Huang, X. Zheng, D. Yan, G. Yin, X. Liao, Y. Kang, Y. Yao, D. Huang, B. Hao, *Langmuir* **2008**, *24*, 4140–4144.
- [84] V.P. Zharov, J.-W. Kim, D.T. Curiel, M. Everts, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2005**, *1*, 326–345.
- [85] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63*, 24–46.
- [86] Z. Ma, H. Liu, *China Particuology* **2007**, *5*, 1–10.
- [87] M.M. Rahman, A. Elaïssari, *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **2012**, *1*, 3–15.

- [88] R. Hao, R. Xing, Z. Xu, Y. Hou, S. Gao, S. Sun, *Advanced Materials* **2010**, *22*, 2729–2742.
- [89] S. Braconnot, C. Hoang, H. Fessi, A. Elaissari, *Materials Science and Engineering: C* **2009**, *29*, 624–630.
- [90] H. Mouaziz, R. Veyret, A. Theretz, F. Ginot, A. Elaissari, *J Biomed Nanotechnol* **2009**, *5*, 172–181.
- [91] R. Veyret, T. Delair, C. Pichot, A. Elaissari, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *295*, 155–163.
- [92] J. Douch, M. Hamdani, H. Fessi, A. Elaissari, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2009**, *340*, 208–211.
- [93] R. Veyret, A. Elaissari, T. Delair, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2006**, *53*, 78–86.
- [94] A. Elaissari, in *Macromolecular Symposia*, **2005**, 47–55.
- [95] E.B. Altıntaş, N. Tüzmen, N. Candan, A. Denizli, *Journal of Chromatography B* **2007**, *853*, 105–113.
- [96] M.M. Rahman, A. Elaissari, *Separation and Purification Technology* **2011**, *81*, 286–294.
- [97] A. Kumar, P.K. Jena, S. Behera, R.F. Lockey, S. Mohapatra, S. Mohapatra, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, *6*, 64–69.
- [98] J. Schotter, P. Kamp, A. Becker, A. Pühler, G. Reiss, H. Brückl, *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, *19*, 1149–1156.
- [99] Z. Roveimiab, A.R. Mahdavian, E. Biazar, K.S. Heidari, *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **2012**, *1*, 82–88.
- [100] A. Španová, B. Rittich, D. Horák, J. Lenfeld, J. Prod'homme, J. Švecíková, S. Štruncová, *Journal of Chromatography A* **2003**, *1009*, 215–221.
- [101] M. Megens, M. Prins, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *293*, 702–708.
- [102] D. Horák, B. Rittich, A. Španová, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, *311*, 249–254.
- [103] A.K. Gupta, A.S.G. Curtis, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2004**, *15*, 493–496.
- [104] H. Yu, J.W. Raymond, T.M. McMahon, A.A. Campagnari, *Biosensors and Bioelectronics* **2000**, *14*, 829–840.
- [105] M. Uhlen, *Nature* **1989**, *340*, 733.
- [106] P.J. Fisher, M.J. Springett, A.B. Dietz, P.A. Bulur, S. Vuk-Pavlović, *Journal of Immunological Methods* **2002**, *262*, 95–101.
- [107] J. Halavaara, P. Tervahartiala, H. Isoniemi, K. Höckerstedt, *Acta Radiologica* **2002**, *43*, 180–185.
- [108] R. Hergt, R. Hiergeist, I. Hilger, W.A. Kaiser, *Recent Research Development in Materials Science* **2002**, *3*, 723–742.
- [109] B. Koppolu, Z. Bhavsar, A.S. Wadajkar, S. Nattama, M. Rahimi, F. Nwariaku, K.T. Nguyen, *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2012**, *8*, 983–990.
- [110] E. Erdal, D. Kavaz, M. Sam, M. Demirbilek, M.E. Demirbilek, N. Sağlam, E.B. Denkbas, *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2012**, *8*, 800–808.
- [111] C. Ma, C. Li, N. He, F. Wang, N. Ma, L. Zhang, Z. Lu, Z. Ali, Z. Xi, X. Li, others, *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2012**, *8*, 1000–1005.
- [112] S. Laurent, S. Dutz, U.O. Häfeli, M. Mahmoudi, *Advances in Colloid and Interface Science* **2011**, *166*, 8–23.
- [113] C. Yang, Y. Guan, J. Xing, G. Jia, H. Liu, *Reactive and Functional Polymers* **2006**, *66*, 267–273.

- [114] T. Hoare, J. Santamaria, G.F. Goya, S. Irusta, D. Lin, S. Lau, R. Padera, R. Langer, D.S. Kohane, *Nano Letters* **2009**, *9*, 3651–3657.
- [115] M.O. Avilés, A.D. Ebner, J.A. Ritter, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, *321*, 1586–1590.
- [116] X. Gao, L. Yang, J.A. Petros, F.F. Marshall, J.W. Simons, S. Nie, others, *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, *16*, 63–72.
- [117] K. AV, K. AN, N. M, R. I, P. PN, *The Journal of Physical Chemistry. C, Nanomaterials and Interfaces* **n.d.**, *112*, 10721.
- [118] R. Ladj, M. El Kass, Y. Mugnier, R. Le Dantec, H. Fessi, C. Galez, A. Elaissari, *Crystal Growth & Design* **2012**, 121011154137006.
- [119] C. Galez, Y. Mugnier, J. Bouillot, Y. Lambert, R. Le Dantec, *Journal of Alloys and Compounds* **2006**, *416*, 261–264.
- [120] R. Le Dantec, Y. Mugnier, G. Djanta, L. Bonacina, J. Extermann, L. Badie, C. Joulaud, M. Gerrmann, D. Rytz, J.P. Wolf, C. Galez, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 15140–15146.
- [121] W.J. Alford, A.V. Smith, *J. Opt. Soc. Am. B* **2001**, *18*, 524–533.
- [122] E.V. Rodriguez, C.B. de Araújo, A.M. Brito-Silva, V.I. Ivanenko, A.A. Lipovskii, *Chemical Physics Letters* **2009**, *467*, 335–338.
- [123] L. Le Xuan, C. Zhou, A. Slablab, D. Chauvat, C. Tard, S. Perruchas, T. Gacoin, P. Villeval, J.-F. Roch, *Small* **2008**, *4*, 1332–1336.
- [124] S. Winter, M. Zielinski, D. Chauvat, J. Zyss, D. Oron, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 4558–4563.
- [125] S.B. and J. Zyss, **2010**.
- [126] R. Grange, T. Lanvin, C.-L. Hsieh, Y. Pu, D. Psaltis, *Biomed. Opt. Express* **2011**, *2*, 2532–2539.
- [127] P. Pantazis, J. Maloney, D. Wu, S.E. Fraser, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 14535–14540.
- [128] Y. Pu, R. Grange, C.-L. Hsieh, D. Psaltis, *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104*, 207402.

Références du chapitre I

- (1) Staedler, D.; Magouroux, T.; Hadji, R.; Joulaud, C.; Extermann, J.; Schwung, S.; Passemard, S.; Kasparian, C.; Clarke, G.; Germann, M.; Dantec, R. L.; Mugnier, Y.; Rytz, D.; Ciepiewski, D.; Galez, C.; Gerber-Lemaire, S.; Juillerat-Jeanneret, L.; Bonacina, L.; Wolf, J.-P. *ACS Nano* **2012**, *6*, 2542–2549.
- (2) Pantazis, P.; Maloney, J.; Wu, D.; Fraser, S. E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 14535–14540.
- (3) Demopoulos, G. P. *Hydrometallurgy* **2009**, *96*, 199–214.
- (4) Cushing, B. L.; Kolesnichenko, V. L.; O'Connor, C. J. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 3893–3946.
- (5) Garside, J. *Chemical Engineering Science* **1985**, *40*, 3–26.
- (6) Mullin, J. W. *Crystallization: Third Edition*; 3rd ed.; Butterworth-Heinemann, 1997.
- (7) LaMer, V. K.; Dinegar, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4847–4854.
- (8) Illés, E.; Tombácz, E. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *295*, 115–123.
- (9) Verma, S.; Lan, Y.; Gokhale, R.; Burgess, D. J. *International journal of pharmaceutics* **2009**, *377*, 185–198.
- (10) Chaubal, M. V.; Popescu, C. *Pharmaceutical research* **2008**, *25*, 2302–2308.
- (11) Hiemenz, P. C.; Rajagopalan, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry, revised and expanded*; CRC, 1997; Vol. 14.
- (12) Boistelle, R. *Crosnier J. Funck Brentano JL, Bach JF, Grunfeld JP Ed Flammarion Médecine Sciences (1985) 159 202.*
- (13) Shulman, J. H.; Stoeckenius, W.; Prince, L. M. *J. Phys. Chem* **1959**, *63*, 1677–1680.
- (14) Ekwall, P.; Mandell, L.; Solyom, P. *Journal of Colloid and Interface Science* **1971**, *35*, 266–272.
- (15) Pileni, M. P. *Accounts of chemical research* **2008**, *41*, 1799–1809.
- (16) Lodhi, M. A.; Ye, G. N.; Weeden, N. F.; Reisch, B. I. *Plant Molecular Biology Reporter* **1994**, *12*, 6–13.
- (17) Chen, F.; Xu, G. Q.; Hor, T. S. *Materials Letters* **2003**, *57*, 3282–3286.
- (18) Sagalowicz, L.; Leser, M. E. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2010**, *15*, 61–72.
- (19) Israelachvili, J. N.; Marcelja, S.; Horn, R. G. *Quarterly reviews of biophysics* **1980**, *13*, 121–200.
- (20) Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes 2d Ed*; J. Wiley., 1980.
- (21) Winsor, P. A. *Solvent properties of amphiphilic compounds*; Butterworths Scientific Publications, 1954.
- (22) Pileni, M. P. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6961–6973.
- (23) Fletcher, P. D. I.; Robinson, B. H.; Tabony, J. J. *Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1986**, *82*, 2311–2321.
- (24) Rauscher, F.; Veit, P.; Sundmacher, K. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2005**, *254*, 183–191.
- (25) Vauthey, S.; Milo, C.; Frossard, P.; Garti, N.; Leser, M. E.; Watzke, H. J. *Journal of agricultural and food chemistry* **2000**, *48*, 4808–4816.
- (26) Atik, S. S.; Thomas, J. K. *Chemical Physics Letters* **1981**, *79*, 351–354.
- (27) Hellweg, T. *Current opinion in colloid & interface science* **2002**, *7*, 50–56.
- (28) Pileni, M. P. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 9019–9038.
- (29) Lopez-Quintela, M.; Tojo, C.; Blanco, M.; Garcia Rio, L.; Leis, J. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, *9*, 264–278.
- (30) Lemyre, J. L.; Ritcey, A. M. *Chemistry of materials* **2005**, *17*, 3040–3043.
- (31) Nanni, A.; Dei, L. *Langmuir* **2003**, *19*, 933–938.

- (32) Kitchens, C. L.; McLeod, M. C.; Roberts, C. B. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 11331–11338.
- (33) Lisiecki, I. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, *250*, 499–507.
- (34) Lisiecki, I.; Pileni, M. P. *Langmuir* **2003**, *19*, 9486–9489.
- (35) Eastoe, J.; Cox, A. R. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1995**, *101*, 63–76.
- (36) Li, M.; Mann, S. *Langmuir* **2000**, *16*, 7088–7094.
- (37) Li, M.; Schnablegger, H.; Mann, S. *Nature* **1999**, *402*, 393–395.
- (38) Cölfen, H.; Mann, S. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 2350–2365.
- (39) Mann, S. *Nat Mater* **2009**, *8*, 781–792.
- (40) Niemann, B.; Veit, P.; Sundmacher, K. *Langmuir* **2008**, *24*, 4320–4328.
- (41) Filankembo, A.; Pileni, M. P. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 5865–5868.
- (42) Saiwan, C.; Krathong, S.; Anukulprasert, T.; O’rear, I. I. *Journal of chemical engineering of Japan* **2004**, *37*, 279–285.
- (43) Pileni, M. P.; others *Nature Materials* **2003**, *2*, 145–150.
- (44) Uskoković, V.; Drofenik, M. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2005**, *266*, 168–174.
- (45) Cason, J. P.; Miller, M. E.; Thompson, J. B.; Roberts, C. B. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2297–2302.
- (46) Bagwe, R. P.; Khilar, K. C. *Langmuir* **1997**, *13*, 6432–6438.
- (47) Towey, T. F.; Khan-Lodhi, A.; Robinson, B. H. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1990**, *86*, 3757–3762.
- (48) Fletcher, P. D. I.; Howe, A. M.; Robinson, B. H. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1987**, *83*, 985–1006.
- (49) Ahmad, T.; Chopra, R.; Ramanujachary, K. V.; Lofland, S. E.; Ganguli, A. K. *Solid state sciences* **2005**, *7*, 891–895.
- (50) Muñoz-Espí, R.; Weiss, C. K.; Landfester, K. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2012**, *17*, 212–224.
- (51) Chou, Y. J.; El-Aasser, M. S.; Vanderhoff, J. W. *Journal of Dispersion Science and Technology* **1980**, *1*, 129–150.
- (52) Landfester, K. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2006**, *36*, 231–279.
- (53) Antonietti, M.; Landfester, K. *Progress in Polymer Science* **2002**, *27*, 689–757.
- (54) Dolcet, P.; Casarin, M.; Maccato, C.; Bovo, L.; Ischia, G.; Gialanella, S.; Mancin, F.; Tondello, E.; Gross, S. *J. Mater. Chem.* **2011**, *22*, 1620–1626.
- (55) Landfester, K.; Tiarks, F.; Hentze, H. P.; Antonietti, M. *Macromolecular chemistry and physics* **2000**, *201*, 1–5.
- (56) Asua, J. M. *Progress in Polymer Science* **2002**, *27*, 1283–1346.
- (57) Abismail, B.; Canselier, J. P.; Wilhelm, A. M.; Delmas, H.; Gourdon, C. *Ultrasonics Sonochemistry* **1999**, *6*, 75–83.
- (58) Brösel, S.; Schubert, H. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **1999**, *38*, 533–540.
- (59) Bondy, C.; Söllner, K. *Transactions of the Faraday Society* **1935**, *31*, 835–843.
- (60) Lauterborn, W.; Ohl, C. D. *Ultrasonics sonochemistry* **1997**, *4*, 65–75.
- (61) Landfester, K. *Macromolecular Symposia* **2000**, *150*, 171–178.
- (62) Landfester, K.; Bechthold, N.; Tiarks, F.; Antonietti, M. *Macromolecules* **1999**, *32*, 5222–5228.
- (63) Anderson, C. D.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S. *Macromolecules* **2002**, *35*, 574–576.
- (64) Chern, C. S.; Chen, T. J.; Liou, Y. C. *Polymer* **1998**, *39*, 3767–3777.

- (65) Medeiros, S. F.; Santos, A. M.; Fessi, H.; Elaissari, A. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **2012**, *1*, 99–112.
- (66) Betancourt-Galindo, R.; Saldívar, R.; Rodríguez-Fernández, O. S.; Ramos-de Valle, L. F. *Polymer Bulletin* **2004**, *51*, 395–402.
- (67) Graillat, C.; Guyot, A. *Macromolecules* **2003**, *36*, 6371–6377.

Chapitre II :
Synthèse de nanocristaux
d'iodate de fer

Introduction

Comme nous l'avons décrit au chapitre I, il existe différentes approches pour la synthèse de nanoparticules inorganiques. Nous avons porté notre attention sur la synthèse de nanocristaux d'iodate de fer par les procédés de microémulsion inverse et de miniémulsion inverse. Ces méthodes sont très largement utilisées pour préparer des nano-objets de taille et de morphologie contrôlées, tels que les nanoparticules métalliques, semiconductrices, les oxydes et les nanocomposites. Dans le cas des oxydes et des matériaux ioniques, la littérature est aussi riche en exemples de microstructures complexes obtenues par auto-assemblage ou auto-organisation en présence de tensioactifs, ou de polymères.

La synthèse d'iodate de fer par microémulsion inverse avait déjà été explorée au laboratoire SYMME¹. Malgré une étude approfondie portant sur les différents paramètres expérimentaux, à savoir les tensioactifs (anioniques comme l'AOT et non-ioniques comme le triton X-100), la nature du solvant, la concentration des réactifs et la température, il n'a pas été possible d'obtenir un réel contrôle des dimensions et de la morphologie des nanocristaux. Il était donc nécessaire de développer de nouveaux procédés de synthèse, permettant d'une part de dépasser les limitations observées et d'autre part de respecter les spécificités propres aux applications visées.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à un procédé de microémulsion inverse modifié par ajout de polymères, offrant ainsi un degré de liberté supplémentaire à l'étude. Plus précisément, l'additif organique permet de modifier les interactions à l'interface nanoparticule-couche de tensioactifs et de changer la cinétique de formation des nanocristaux au cours des étapes de nucléation et de croissance. Dans un premier temps, une étude préliminaire a porté sur l'utilisation d'un polymère comme additif : le polyéthylène glycol (PEG) a été retenu en raison de sa biocompatibilité. L'étude systématique réalisée avec le PEG est présentée sous la forme d'un article de recherche récemment publié dans le journal « *Crystal Growth & Design* ».

La seconde partie du chapitre concerne la synthèse de nanocristaux d'iodate de fer par miniémulsion inverse.

I. Synthèse contrôlée par ajout de polymère en microémulsions inverses

I.1. Introduction

Afin de préparer des nanoparticules inorganiques de taille et de morphologie contrôlées, le système de microémulsion peut être modifié par incorporation d'additifs comme par exemple des polymères. Pour des conditions opératoires spécifiques, la présence de ces additifs n'affecte pas l'équilibre thermodynamique de la microémulsion (pas de séparation de phase) mais peut fortement influencer les propriétés physico-chimiques (taille, morphologie, cristallinité, etc...) des particules résultantes. Un polymère de faible masse moléculaire (dont le diamètre est inférieur à celui des micelles) est facilement dissous dans la phase aqueuse d'une microémulsion inverse. En revanche, un polymère de longue chaîne a tendance à former des agrégats dans la phase continue. Ainsi, il a été établi que le polymère ajouté peut influencer la taille des micelles²⁻⁴, les interactions micelles-micelles⁵⁻⁷, ainsi que la stabilité⁸ et la flexibilité de l'interface^{8,9} par la formation de complexes polymères-tensioactifs.

En termes de synthèse, Lisiecki et *al*¹⁰ ont montré que la taille des nanoparticules de cuivre est modifiée dans une microémulsion à base d'AOT après ajout de chlorure de cetyltriméthylammonium (CTAC). La taille des nanoparticules de cuivre est inversement proportionnelle à la quantité de CTAC. Par ailleurs, Koetz et *al.*, ont également publié plusieurs études sur la synthèse de nanoparticules inorganiques ; de CdS¹¹, BaSO₄¹² et Fe₃O₄¹³ à partir de systèmes micellaires modifiés par incorporation de polymères chargés. Les intérêts de cette approche sont (i) une augmentation de la stabilité de la couche de tensioactifs liée à l'interface des particules inorganiques, (ii) une modification de la croissance des particules liée à l'interaction entre le polymère et la particule et (iii) une stabilisation stérique de la particule limitant l'agglomération.

Les copolymères sont également prometteurs pour élaborer des nanoparticules inorganiques structurées avec dans certains cas un contrôle de la taille, de la morphologie mais aussi de la structure cristalline^{14,15}.

I.2. Etude préliminaire : « effet de la nature de polymère »

Au début de ces études, une première série d'études a été réalisée afin d'examiner la faisabilité de la méthodologie, de sélectionner le polymère le plus prometteur pour des études systématiques.

I.2.a. Protocol expérimental

Produits : Les réactifs proviennent de chez Sigma Aldrich et ont été utilisés sans purification particulière. Les solvants organiques (acétate d'éthyle, octane) ont tous un degré de pureté supérieure à 99%. Le tableau II.1 dans l'annexe 1 rassemble les données caractéristiques des molécules utilisées tout au long des travaux expérimentaux.

Méthode de synthèse : le procédé de microémulsion inverse nécessite la préparation de trois phases : une phase organique et deux phases aqueuses. La phase organique a été préparée par solubilisation de l'AOT dans l'octane ($[AOT] = 0,5M$). Les deux phases aqueuses contiennent respectivement de l'acide iodique ($[HIO_3] = 0,05M$) et du nitrate de fer ($[Fe(NO_3)_3] = 0,2M$) dans une solution contenant aussi des polymères hydrophiles à une concentration de 5g/L.

Deux microémulsions ont été préparées par mélange des deux phases aqueuse et organique sous agitation magnétique, avec un rapport molaire $w=5,8$ ($[eau] / [tensioactif]$). Ces systèmes thermodynamiquement favorables donnent spontanément une dispersion d'apparence translucide.

Les deux microémulsions initiales sont ensuite mélangées dans un réacteur de 100 ml et laissées pendant 2 heures sous agitation mécanique (560 rpm) à une température de 80°C. Les produits sont alors récupérés par précipitation après ajout d'éthanol dans le milieu réactionnel. Les nanoparticules d'iodate de fer sont ensuite collectées par ultracentrifugation à 10000 rpm et lavées deux fois à l'éthanol.

Caractérisations: la taille des particules a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS) et l'observation morphologique de ces objets a été réalisée par microscopie électronique à transmission et microscopie électronique à balayage. Les propriétés optiques non linéaires ont été étudiées par diffusion Hyper Rayleigh (Hyper Rayleigh Scattering, HRS) en mesurant pour des suspensions de nanocristaux, l'intensité lumineuse diffusée à la fréquence de second harmonique.

I.2.b. Analyse de la morphologie des particules obtenues

La préparation de microémulsions, c'est-à-dire de nanogouttelettes d'eau stable dans une phase organique, est indispensable et hormis la transparence des microémulsions initiales et du mélange réactionnel après mélange, cette stabilité a aussi été vérifiée par des mesures de taille. Pour chaque polymère utilisé, la taille des micelles obtenues est de 12 ± 2 nm.

Concernant la morphologie, les images MET de la Figure II.2 montrent des résultats représentatifs en fonction de la nature des polymères utilisés. A titre d'illustration, l'image A1 (Figure II.1) montre un exemple de synthèse réalisée sans ajout de polymère (*note : cette image ne correspond malheureusement pas exactement aux conditions expérimentales présentées ici mais nous l'estimons représentative*): Sur cette image, des agrégats de particules quasi-sphériques (de dimension 50-100 nm) sont observés. Une interprétation plus détaillée sera proposée dans la partie suivante.

D'autre part, en présence de polymère, on remarque des variations significatives de la morphologie des particules. Le résultat le plus intéressant a été obtenu pour le poly(éthylène glycol) (PEG) avec des tailles de particules inférieures à 100 nm, une morphologie sphérique et une distribution de taille étroite (Figure II.2 (D)). Avec la polyvinylpyrrolidone (PVP) et le poly(acide acrylique) (PAA) (Figure II.2 (C) et (F) respectivement), on obtient des nanoparticules bien définies mais celles-ci ne sont pas majoritaires. Avec le Triton X-100(Figure II.2 (A)), les particules sont agglomérées, proche de ce qui est observé sans polymère. Les nanoparticules obtenues avec le poly(acrylamide) (Pam) présentent une taille de l'ordre de 1 μ m, plus importante que pour les autres préparations(Figure II.2 (B)). Enfin, on observe avec Poly(méthyle vinyle éther-*alt*-maléique anhydride)(AMVE) des objets très polydisperses en taille(Figure II.2 (E)). Ce polymère n'a pas été retenu pour la suite des travaux bien que l'obtention de particules de petite taille soit intéressante.

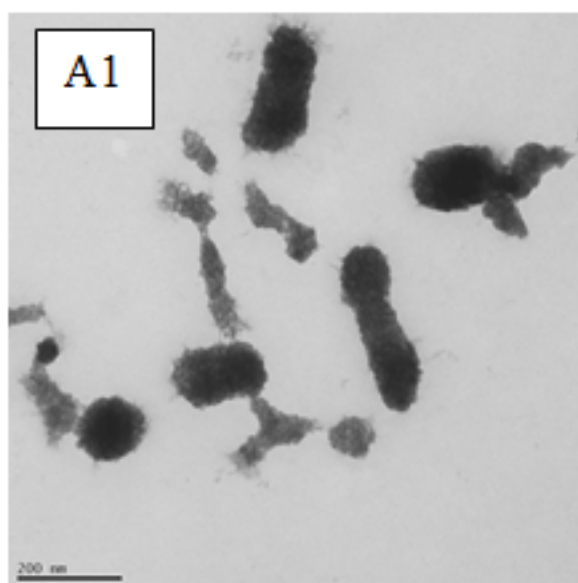


Figure II.18 : Images MET de nanoparticules d'iodate de fer synthétisées par microémulsions inverses sans ajout de polymère.

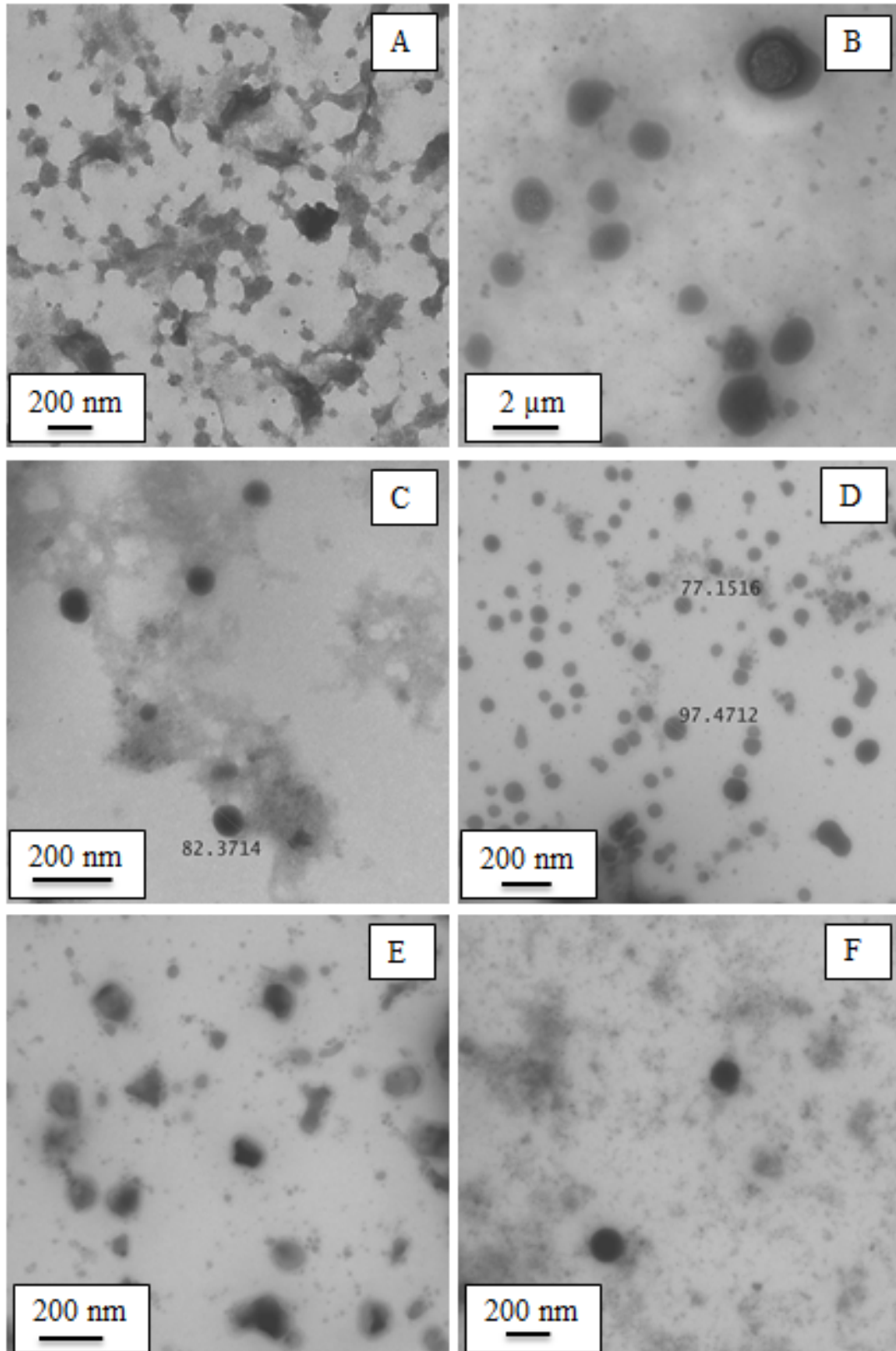


Figure II.19 : Images MET de nanoparticules d'iodate de fer synthétisées par microémulsions inverses avec ajout de polymères à 5 g/L dans la phase aqueuse. (A) Triton x-100, (B) PAm, (C) PVP, (D) PEG, (E) AMVE, (F) PAA.

Par ailleurs, les analyses HRS correspondantes montrent que les nanoparticules ne présentent aucun signal de génération de second harmonique. Cette observation témoigne certainement de l'absence de cristallisation, or la préparation de particules amorphes est rédhibitoire pour les applications visées. Cependant, on peut noter que ces synthèses ont été réalisées dans des conditions particulières avec des concentrations égales en ions IO_3^- et Fe^{3+} . Des proportions stœchiométriques ou un excès en ions IO_3^- seront d'ailleurs utilisés par la suite afin de diminuer les interactions organiques-inorganiques comme illustré pour BaCrO_4 .¹⁶

Cependant, cette étude préliminaire a permis de réaliser les premiers essais sur l'influence d'additifs et nous observons une modification assez nette de la morphologie des objets obtenus. L'utilisation du PEG semble d'autre part offrir les résultats les plus intéressants avec des particules de taille convenable. Ce polymère est de plus bien connu pour sa biocompatibilité. Ces considérations positives nous ont amené à approfondir cette voie.

I.3. Synthèse par ajout de poly(éthylène glycol)

L'étude complète concernant la synthèse de nanoparticules d'iodate de fer par microémulsion inverse dont la composition initiale a fait l'objet d'étude systématique a été publié dans le *Journal Crystal Growth & Design*¹⁷. Pour certaines conditions, des nanocristaux sphériques de taille 10-20 nm et possédant des propriétés optiques non linéaires appropriées ont été obtenus. En ce qui concerne le tensioactif, l'AOT a été choisi car il permet de solvater une grande quantité d'eau et qu'il ne nécessite pas la présence d'un co-surfactant¹⁸ contrairement à des systèmes à base de CTAB¹⁹. De plus, les molécules de polyéthylène glycol de faible poids moléculaire (400g/mol) préalablement ajoutées aux solutions aqueuses de réactifs, permettent d'augmenter le domaine d'existence des microémulsions inverses préparées à partir d'AOT²⁰.

En termes de mécanismes de croissance et de cristallisation des nanocristaux de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$, nous avons montré que les changements de concentration en PEG et du rapport molaire w conduisent à des objets de taille et de morphologie très différente. Pour expliquer de telles variations, un mécanisme basé sur une nucléation homogène et sur la formation éventuelle de microstructures hybrides à partir d'un phénomène d'inter-digitation des tensioactifs a été proposé. Brièvement, pour un faible rapport w ($=5.8$) et sans ajout de PEG, des agrégats de particules amorphes sont produits en raison des fortes interactions entre les précurseurs amorphes et les têtes polaires de l'AOT. Dans ce cas, seul un temps de réaction très important permet d'obtenir des bâtonnets cristallisés de longueur micrométrique par un phénomène de

réorganisation des tensioactifs adsorbés^{1,21,22}. En revanche, le caractère inhibitoire de l'AOT pour la cristallisation disparaît pour une concentration de PEG supérieure à 5 g/L. Dans ce cas, l'obtention de nanocristaux quasi-sphériques de 10-20 nm peut s'expliquer par la présence du PEG qui :

- diminue les interactions entre les têtes polaires de l'AOT et la surface des nanoparticules primaires d'iodate de fer,
- accélère la cinétique de formation des particules, c'est-à-dire les étapes d'échange inter-micellaire et de nucléation de telle sorte que la cristallisation peut avoir lieu sans phénomène d'agrégation,
- protège probablement les nanocristaux d'une agrégation ultérieure par des interactions stériques.

Pour un rapport w supérieur à $w=12,2$, les têtes polaires de l'AOT sont davantage hydratées et la concentration en réactifs est plus élevée ce qui augmente fortement la cinétique de formation des particules primaires amorphes. En l'absence de l'AOT, le phénomène de cristallisation par agrégation conduit à des amas de nano-filaments en raison d'une forte adsorption de PEG sur les parois latérales des particules amorphes puis des nano-bâtonnets primaires. Ceci a été démontré par des mesures infrarouges et un affinement des paramètres de maille des nano-filaments. Ceux-ci continuent par la suite à s'auto-organiser pour former des structures sphériques micrométriques. De manière très surprenante, l'ajout de PEG, même à faible concentration, conduit à une augmentation progressive par des interactions stériques de la distance entre nano-filaments. Il en résulte des micro-cristaux quasi-sphériques ayant une forme caractéristique d'oursins. De plus, des images MEB réalisées à différents moments de la synthèse montrent que ces structures apparaissent après la formation primaire de micro-bouquets constitués de plusieurs nano-filaments. Ces micro-amas s'auto-assemblent ensuite de façon à diminuer l'énergie interfaciale avec l'octane et forment ainsi former ces structures originales à morphologie d'oursins. De tels assemblages micrométriques ne sont clairement pas adaptés à l'imagerie de second harmonique mais ils permettent de mettre en évidence le rôle coopératif de l'AOT et d'un additif comme le PEG pour une croissance contrôlée de micro- et nano-objets hybrides.

I.4. Conclusion sur la synthèse par microémulsion inverse modifiée

L'iodate de fer est un matériau ionique non-centrosymétrique obtenu par *co*-précipitation des ions Fe^{3+} et IO_3^- dont la morphologie est difficile à contrôler sans l'ajout d'additifs que ce soit en solution homogène²³ ou en microémulsion inverse. Ainsi, il a été démontré pour la première fois que l'ajout de polymère conduit à une diminution des interactions inorganiques-organiques à l'interface particule-couche de tensioactifs et permet l'obtention des cristaux de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ de taille et de morphologie bien maîtrisées. Autrement dit, dans un intervalle de compositions assez étroit et en présence de polyéthylène glycol 400, une microémulsion inverse à base d'AOT joue son rôle de réacteur pour la préparation de particules cristallisées nanométriques. De la même manière, un faible changement de composition des concentrations relatives d'eau, d'AOT et de PEG contribue à l'émergence de plusieurs microstructures hybrides. Les formes varient en fonction de temps de réaction et passe de bouquets de nano-filaments à des oursins quasi-sphériques composés de nanofilaments arrangés de manière plus ou moins régulière et ceci en fonction de la teneur en PEG.

Il est à noter aussi que l'augmentation de la teneur en eau (de $w=5,8$ à $w=12,2$) ne permet pas, d'obtenir des nanocristaux sphériques de taille supérieure à 50-100 nm via la microémulsion inverse. C'est pourquoi, nous avons cherché par la suite à obtenir des nanocristaux de taille supérieure en utilisant le procédé de miniémulsion inverse.

II. Synthèse des cristaux d'iodate de fer *via* la miniémulsion inverse

II.1. Introduction

Dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus sur la synthèse de nanoparticules d'iodate de fer *via* la miniémulsion inverse, en cohérence avec le sujet du chapitre II. Il est important de noter que ces travaux ainsi que ceux portant sur la synthèse et l'encapsulation simultanée de nanoparticules d'iodate de fer sont rassemblés dans une publication unique présentée dans le chapitre III.

Le procédé de miniémulsion inverse est une alternative avantageuse au procédé de microémulsion inverse. Cette méthode de préparation permet d'obtenir des suspensions de teneur importantes en particules (12 %wt pour la miniémulsion contre 5 %wt pour la microémulsion). Le procédé de miniémulsion inverse permet un mécanisme de nucléation homogène car chaque gouttelette subit un procédé de nucléation individuel²⁴. Les facteurs clés pour la synthèse de nanoparticules inorganiques par miniémulsion inverse sont les conditions d'émulsification, la présence de molécules hydrophiles (NaCl) et la présence d'agents stabilisants (span[®]80).

La technique de miniémulsion diffère de la microémulsion par le type et la taille des objets primaires générés. Les micelles obtenues par microémulsion inverse sont des systèmes flexibles de l'ordre d'une dizaine de nanomètre. Les nanogouttelettes générées dans une miniémulsion sont de l'ordre de 100 nm, aucun échange entre la phase organique et la phase aqueuse n'est possible. Ainsi, la taille des objets finaux est généralement celle des gouttelettes initiales.

Pour la synthèse de particules par *co*-précipitation en miniémulsion, le procédé consiste à préparer deux systèmes de miniémulsions contenant des réactifs complémentaires en phase interne dans une phase continue généralement similaire²⁵. La réaction de *co*-précipitation dans un milieu homogène est spontanée. Au contraire, le mélange de deux miniémulsions sans apport énergétique (*e.g.* ultrasons) ne conduit à aucune réaction, comme mentionné au Chapitre I. Lorsque le système subit l'étape d'homogénéisation par fragmentation *via* des forces de cisaillement forte, les processus de fission et de fusion des gouttelettes se produisent rapidement. Une réaction immédiate entre les réactifs est générée donnant la formation de nucléi qui vont croître pour aboutir à des particules inorganiques.²⁶ ont montré que des solutions concentrées de sels métalliques peuvent être émulsionnées en utilisant des copolymères en tant que agent stabilisante pour obtenir des nanoparticules homogènes d'oxydes de fer, d'oxydes de zirconium et de carbonate de calcium.²⁷ ont préparé des

nanoparticules inorganiques de complexe de phosphore de lanthanide *via* la miniémulsion inverse pour des compositions binaires et ternaires. Ces particules montrent une stabilité colloïdale intéressante. Récemment, ²⁸ ont synthétisé des nanoparticules d'oxyde de zinc par miniémulsion inverse en variant la nature du tensioactif. Les nanoparticules obtenues se présentent sous la forme de disque avec une distribution de taille homogène. A notre connaissance il n'existe pas d'étude décrivant la préparation de nanocristaux d'iodate de fer par le procédé de miniémulsion inverse dans la littérature.

II.2. Protocol expérimental

Nous exposons dans cette partie une étude systématique sur l'influence de la teneur en réactifs (nitrate de fer et acide iodique) et en molécule stabilisante (span@80) dans le milieu réactionnel. Dans un premier temps, l'effet de la teneur en réactif a été évalué avec une phase organique contenant 3%wt de span@80. Les caractéristiques des nanoparticules inorganiques (taille et morphologie) ont permis de sélectionner les concentrations intéressantes. A partir de ces résultats, l'effet de la teneur en span@80 a été évalué.

Le protocole expérimental consiste à mélanger deux phases non miscibles. De la même façon que pour la microémulsion inverse, deux systèmes dispersés sont créés puis mélangés, comme présenté dans la Figure II.3.

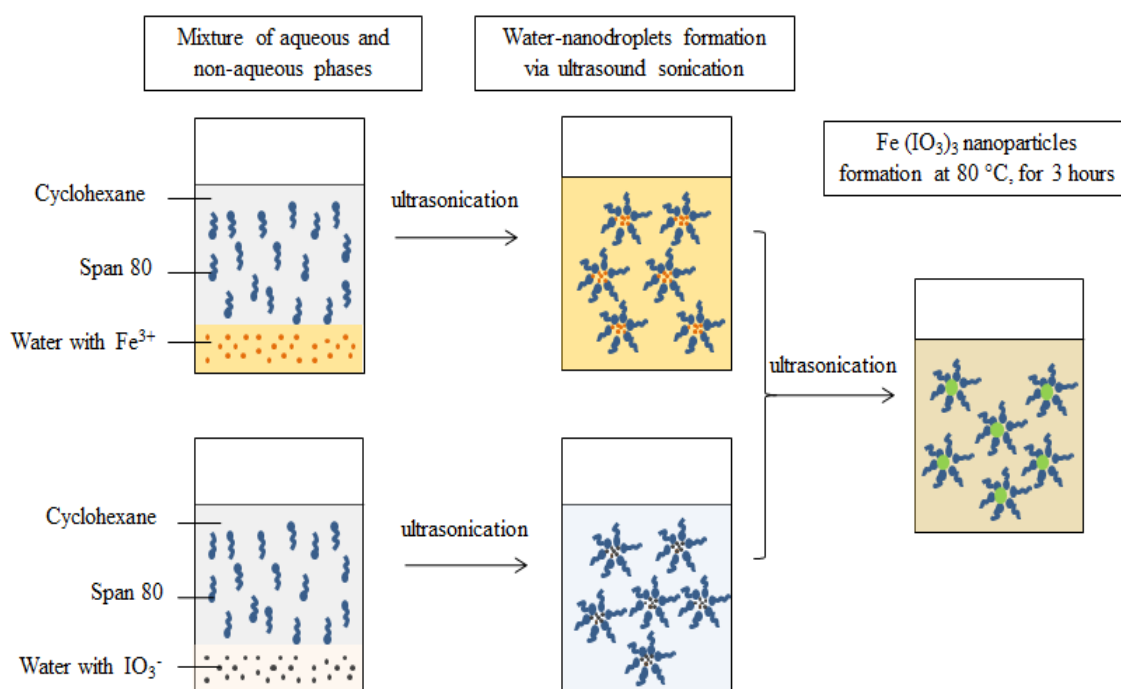


Figure II.20 : Procédé de synthèse d'iodate de fer par miniémulsion inverse.

La première étape d'émulsification par ultrasons est une étape clé pour le contrôle de la taille des gouttelettes, et par conséquent le contrôle de la taille des cristaux finaux. La seconde étape d'émulsification par ultrasons permet l'échange des milieux internes des gouttelettes et le processus de formation des cristaux est ensuite conduit à température contrôlée pour une durée définie.

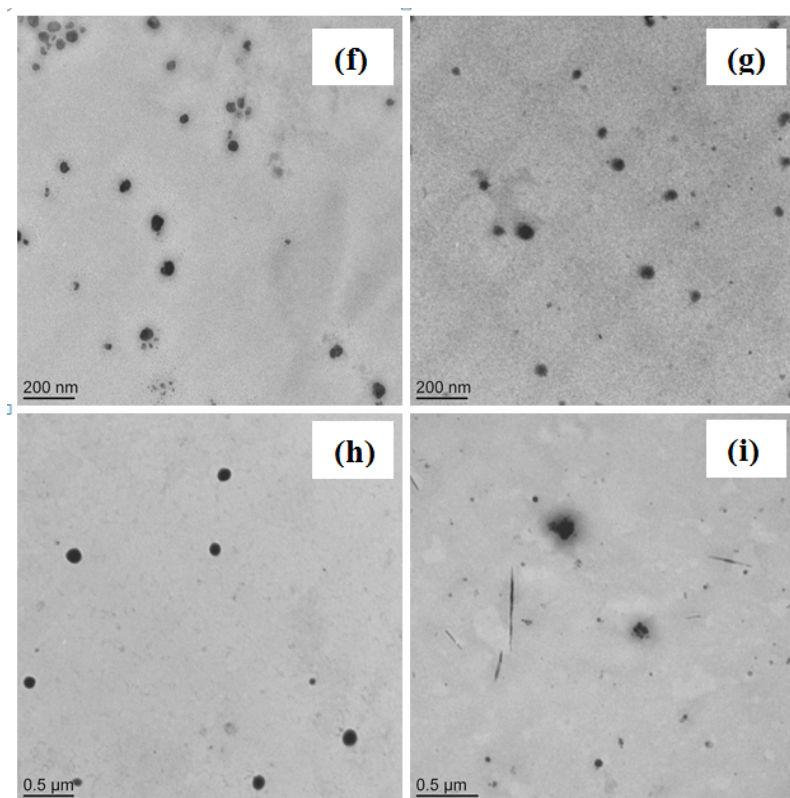
Plus précisément, l'agent stabilisant utilisé dans notre étude est un tensioactif non ionique de bas HLB, le monooléate de sorbitan (span[®]80, HLB = 4,3) qui a prouvé son intérêt dans des études similaires²⁹. Les deux nanoémulsions primaires ont été générés de la manière suivante : l'acide iodique et le nitrate de fer ont été séparément solubilisés dans de l'eau déionisée dans des conditions non stœchiométriques (1 mole de nitrate de fer pour 4 moles d'acide iodique). L'excès d'ions joue un rôle d'agent de pression osmotique en augmentant la stabilité des nanogouttelettes contre le mûrissement d'Ostwald. La phase organique a été préparée par dissolution du span[®]80 dans le cyclohexane. Les deux solutions aqueuses ont été mélangées à la phase organique individuellement (12 % de phase dispersée). Les deux miniémulsions inverses contenant chacune un réactif ont été obtenues par un cycle d'ultrasons à 90 % d'amplitude pendant cinq minutes. Enfin, la miniémulsion inverse secondaire a été obtenue par une seconde étape d'ultrasons dans les mêmes conditions opératoire, puis transférée dans un réacteur thermorégulé à 80°C et équipé d'une agitation mécanique. La réaction a été conduite pendant 3 heures. La dispersion finale a été traitée par centrifugation afin de récupérer les cristaux d'iodate de fer. Ils ont été redispersés dans une solution aqueuse contenant 1 wt. % de CTAB afin d'obtenir une suspension colloïdale permettant l'analyse physico-chimique des cristaux.

Les nanoparticules inorganiques obtenues ont été analysées en termes de taille et de morphologie, par DLS et par microscopie électronique à transmission respectivement. Les méthodes d'analyses sont détaillées dans la publication présentée dans le Chapitre III.

II.3. Résultats

Effet de la concentration des réactifs

Dans cette partie, la concentration de span[®]80 dans la phase organique est fixée à 3%wt. Les images obtenues par microscopie électronique à transmission (Figure II.4) montrent une variation de la morphologie avec la variation de la concentration en réactifs.



**Figure II.21: Effet de $[\text{Fe}^{3+}] / [\text{IO}_3^-]$ sur la formation des nanocristaux de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$.
Images MET: (f) 0,025 / 0,1 M, (g) 0,1 / 0,4 M, (h) 0,4 / 1 M, (i) 1 / 4 M.**

Pour des concentrations de $\text{Fe}^{3+} / \text{IO}_3^-$ de 0,025 M / 0,1 M, 0,1 M / 0,4 M et 4 M / 1 M (Figure II.4) les nanoparticules d'iodate de fer présentent une distribution de taille resserrée. Leur morphologie est sphérique avec une taille inférieure à 100 nm. Les tailles des nanogouttelettes mesurées en diffusion de la lumière (DLS) (environ 65nm) correspondent aux tailles finales des nanoparticules. Ceci peut s'expliquer par la stabilité des nanogouttelettes durant l'étape de chauffage.

En revanche, pour des concentrations supérieures à 1 M/4 M ($\text{Fe}^{3+}/\text{IO}_3^-$) (Figure II.4 (i)), deux morphologies des nanoparticules d'iodate de fer sont observées : des nanoparticules sphériques et des nanobâtonnets. Dans ce cas, la quantité de span[®] 80 n'est certainement pas suffisante pour stabiliser les nanogouttelettes contre le mûrissement d'Ostwald. Nous avons sélectionné une concentration molaire de 0,1 M $[\text{Fe}^{3+}]$ et 0,4 M $[\text{IO}_3^-]$ pour l'étude suivante, car ces quantités permettent d'obtenir des tailles de cristaux de l'ordre de 70nm présentant une distribution de taille resserrée. Ces caractéristiques sont souhaitables pour les applications biomédicales ciblées.

Effet du span[®]80

Dans cette partie, nous allons présenter les résultats relatifs à l'effet de la concentration en tensioactifs. Différentes synthèses ont été menées et les nanoparticules ont systématiquement été analysées par microscopie MET (Figure II.5).

Au fur et à mesure que la quantité du span[®]80 augmente, la morphologie des nanoparticules d'iodate de fer change. Pour de très faibles quantités de span[®]80 (0 wt.%, 0,5 wt.%), des cristaux sous forme de bâtonnets de tailles nanométriques se forment. Dans ce cas, les nanobâtonnets d'iodate de fer sont formés par un processus d'agrégation induisant la cristallisation, comme cela a déjà été observé en co-précipitation homogène²³ ou en microémulsions inverses¹. Lorsque la teneur en span[®]80 atteint 1,5%wt, on observe un mélange avec des objets en forme de sphères et de tiges. Enfin, des nanoparticules sphériques sont obtenues pour une quantité de span[®]80 de 3 %wt et de 5 %wt.

Pour ces dernières concentrations, on observe la formation de particules sphériques, comme souhaité. Les formes et dimensions des particules obtenues correspondent aux nanogouttelettes des miniémulsions, et cela confirme la stabilité de ces gouttelettes pendant l'étape finale de chauffage de 3 heures.

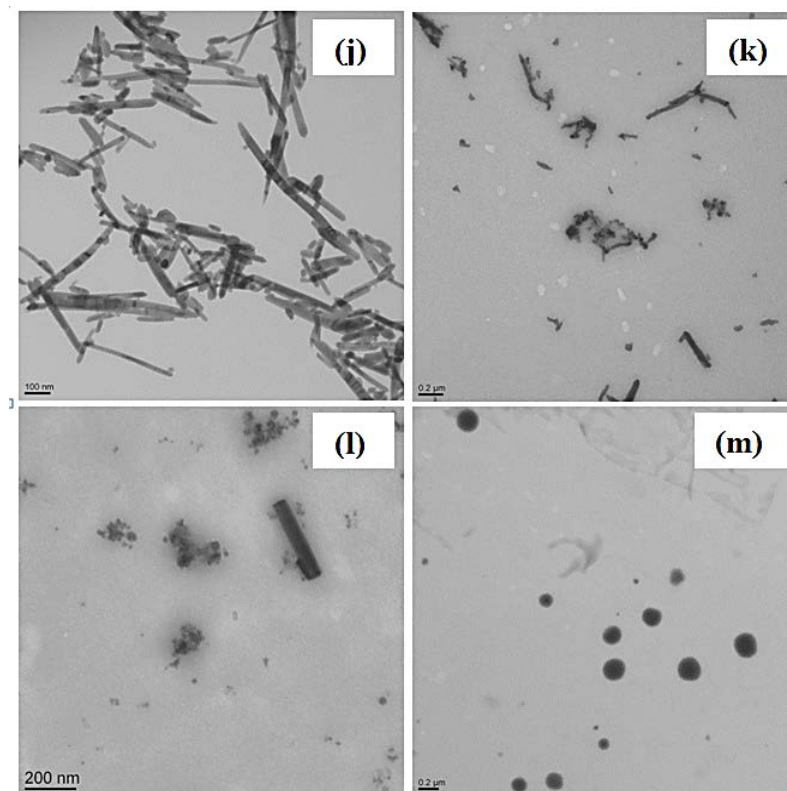


Figure II.22: Effet de la quantité de span[®]80 sur la morphologie et la taille des nanoparticules d'iodate de fer. Images MET: 0 wt.% (j), 0,5 wt.% (k), 1,5 wt.% (l), 5 wt.% (m).

Cristallinité de particules

Pour les applications visées, il est absolument nécessaire de vérifier la cristallinité des particules obtenues car cela est une condition nécessaire pour l'obtention de propriétés optiques non-linéaires. Les spectres de diffraction obtenus en faisant varier les concentrations des réactifs et du span[®]80 sont présentées dans la publication insérée au chapitre III. On peut observer, dans un premier temps, que la cristallinité augmente lorsque la concentration en réactif augmente : cela a déjà été constaté lors d'études précédentes avec les autres méthodes de synthèse d'iodate de fer. Il faut atteindre une concentration suffisante pour cristalliser les particules.

D'autre part et plus spécifique dans le cadre de cette étude, nous observons des pics de diffraction bien définis pour des concentrations en span[®]80 allant de 0 à 3wt.% mais une cristallisation partielle au-delà (5wt.%). L'excès du tensioactif semble limiter la formation de nanoparticules bien cristallisés, illustrant encore la complexité des interactions organique-inorganique dans ce type de synthèse.

II.4. Conclusion sur la synthèse par miniémulsion inverse

Nous avons démontré que la morphologie et la taille des particules d'iodate de fer des élaborées par miniémulsion inverse sont en relation direct avec la variation des concentrations et le pourcentage de tensioactif utilisé. Des nanoparticules en forme de tiges et de sphères ont été obtenues en faisant varier ces paramètres. Nous avons déterminé les conditions expérimentales optimales (concentration molaire en réactifs de 0,1 M [Fe³⁺] et 0,4 M [IO₃⁻] et concentration en span[®]80 de 3wt.%), qui permettent d'obtenir des particules sphériques, d'environ 70nm et bien cristallisées, respectant ainsi le cahier des charges initial. Dans ces conditions, la stabilité des nanogouttelettes de la miniémulsion inverse est primordiale et l'image de « nano-réacteurs » de croissance est bien adaptée.

**SHG Active Fe(IO₃)₃ Particles: From Spherical Nanocrystals to Urchin-Like
Microstructures through the Additive-Mediated Microemulsion Route**

Conclusions

L'étude décrite dans la première partie de ce chapitre a été réalisée suite aux premiers travaux portant sur la synthèse de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ en microémulsions inverses. Une forte adsorption de l'AOT sur la surface des nanoparticules avait été constatée et cette adsorption est supposée être à l'origine des problèmes de contrôle de morphologie rencontrés. Afin de minimiser ces interactions, nous avons modifié la surface de la microémulsion en ajoutant des polymères de nature différente. Nous avons plus particulièrement réalisé une étude approfondie en utilisant le PEG400. Nous avons montré que cet additif permettait de synthétiser des particules d'iodate de fer avec des variations significatives de morphologies. Nous avons enfin proposé un mécanisme général expliquant l'apparition de trois morphologies différentes (nanoparticules sphériques, microparticules en forme « d'oursin » et « de fleur »).

Nous avons par la suite présenté les travaux portant sur la miniémulsion. Cette technique s'est avérée être une méthode de synthèse alternative à la microémulsion. La cristallisation dans les gouttelettes de miniémulsion inverse a été expérimentée et le contrôle de la taille et de la morphologie réalisé avec succès. Nous avons obtenu deux morphologies différentes (sphère et tige) en faisant varier la teneur en réactifs et en tensioactifs.

Enfin, pour les deux méthodes de synthèse proposées, nous avons obtenu en prenant soin de faire varier systématiquement les paramètres expérimentaux, des nanoparticules cristallisées et sphériques aux dimensions inférieures à 100nm. Ces objets répondent aux objectifs initiaux de ces recherches, à savoir le développement de nanosondes pour l'imagerie de seconde harmonique.

Dans le but de protéger ces nanocristaux contre la dégradation et de les rendre biocompatibles, nous avons poursuivi ces travaux en développant l'encapsulation de ces derniers par une couche de polymère. La surface de nanoparticules colloïdales optiquement non linéaire ($\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ ou KNbO_3) a été modifiée ou fonctionnalisée par des techniques d'encapsulation dont nous discuterons dans le Chapitre III.

Références

- (1) Mugnier, Y.; Houf, L.; El-Kass, M.; Le Dantec, R.; Hadji, R.; Vincent, B.; Djanta, G.; Badie, L.; C, J.; J, E.; Rouxel, D.; Galez, C. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 23–30.
- (2) Suarez, M. J.; Levy, H.; Lang, J. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 9808–9816.
- (3) Lianos, P.; Modes, S.; Staikos, G.; Brown, W. *Langmuir* **1992**, *8*, 1054–1059.
- (4) Papoutsis, D.; Lianos, P.; Brown, W. *Langmuir* **1994**, *10*, 3402–3405.
- (5) González-Blanco, C.; Rodríguez, L. J.; Velázquez, M. M. *Langmuir* **1997**, *13*, 1938–1945.
- (6) Kabalnov, A.; Olsson, U.; Thuresson, K.; Wennerstroem, H. *Langmuir* **1994**, *10*, 4509–4513.
- (7) Suarez, M.-J.; Lang, J. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 4626–4631.
- (8) Meier, W. *Langmuir* **1996**, *12*, 1188–1192.
- (9) Lal, J.; Auvray, L. *Journal de Physique II* **1994**, *4*, 2119–2125.
- (10) Lisiecki, I.; Bjoerling, M.; Motte, L.; Ninham, B.; Pileni, M. P. *Langmuir* **1995**, *11*, 2385–2392.
- (11) Koetz, J.; Gawlitza, K.; Kosmella, S. *Colloid & Polymer Science* **2010**, *288*, 257–263.
- (12) Koetz, J.; Bahnemann, J.; Lucas, G.; Tiersch, B.; Kosmella, S. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, *250*, 423–430.
- (13) Baier, J.; Koetz, J.; Kosmella, S.; Tiersch, B.; Rehage, H. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 8612–8618.
- (14) Yu, S.-H.; Cölfen, H. *Journal of Materials Chemistry* **2004**, *14*, 2124.
- (15) Li, M.; Cölfen, H.; Mann, S. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2269–2276.
- (16) Li, M.; Schnablegger, H.; Mann, S. *Nature* **1999**, *402*, 393–395.
- (17) Ladj, R.; El Kass, M.; Mugnier, Y.; Le Dantec, R.; Fessi, H.; Galez, C.; Elaissari, A. *Crystal Growth & Design* **2012**, *12*, 121011154137006.
- (18) Oshitani, J.; Takashina, S.; Yoshida, M.; Gotoh, K. *Advanced Powder Technology* **2009**, *20*, 554–557.
- (19) Zhang, J.; Sun, L.; Qian, C.; Liao, C.; Yan, C. *Chinese Science Bulletin* **2001**, *46*, 1873–1877.
- (20) Bellocq, A. M. In *Trends in Colloid and Interface Science XI*; Rosenholm, J. B.; Lindman, B.; Stenius, P., Eds.; Steinkopff: Darmstadt; Vol. 105, pp. 290–293.
- (21) Cölfen, H.; Mann, S. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 2350–2365.
- (22) Mann, S. *Nat Mater* **2009**, *8*, 781–792.
- (23) Galez, C.; Mugnier, Y.; Bouillot, J.; Lambert, Y.; Le Dantec, R. *Journal of Alloys and Compounds* **2006**, *416*, 261–264.
- (24) Montenegro, R.; Antonietti, M.; Mastai, Y.; Landfester, K. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5088–5094.
- (25) Pai, R. K.; Pillai, S. *CrystEngComm* **2008**, *10*, 865–872.
- (26) Willert, M.; Rothe, R.; Landfester, K.; Antonietti, M. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 4681–4685.
- (27) Taden, A.; Antonietti, M.; Heilig, A.; Landfester, K. *Chemistry of materials* **2004**, *16*, 5081–5087.
- (28) Dolcetti, P.; Casarin, M.; Maccato, C.; Bovo, L.; Ischia, G.; Gialanella, S.; Mancin, F.; Tondello, E.; Gross, S. *J. Mater. Chem.* **2011**, *22*, 1620–1626.
- (29) Medeiros, S. F.; Santos, A. M.; Fessi, H.; Elaissari, A. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2010**, *48*, 3932–3941.

Chapitre III :
Encapsulation des
nanoparticules inorganiques

Introduction

L'utilisation de nanoparticules hybrides est souvent indispensable pour les applications biomédicales. En effet, les nanoparticules hybrides peuvent combiner les propriétés du cœur inorganique et celles de l'écorce, généralement composée d'un polymère biocompatible permettant de répondre aux exigences strictes du domaine. Cela permet, comme nous l'avons déjà souligné, d'améliorer la stabilité colloïdale des suspensions de particules, de les protéger contre la dégradation chimique et de fonctionnaliser leur surface en vue d'un ciblage spécifique. Dans ce chapitre, nous présentons les travaux d'encapsulation de nanoparticules d'iodate de fer réalisés par polymérisation en miniémulsion et de niobate de potassium par adsorption de polymère. Ces études seront présentées sous la forme de deux d'articles scientifiques en cours de préparation.

Dans une première partie, nous présentons l'encapsulation *in situ* des nanoparticules d'iodate de fer par polymérisation en miniémulsion inverse. L'iodate de fer présente d'excellentes propriétés optiques et une faible toxicité, ce qui en fait un matériau bien adapté aux applications visées. Cependant, ces nanoparticules présentent une faible stabilité chimique. En effet, l'étude⁴ réalisée par Moustafa El Kass a montré que le signal de génération de second harmonique des particules d'iodate de fer disparaissait au bout de quelques heures (ou quelques jours), lorsque ces particules étaient dispersées dans des solutions à pH 7. Cette disparition du signal aux pH physiologiques, liée à une dégradation des particules, est bien évidemment un inconvénient majeur que nous avons cherché à résoudre en développant cette méthode. La technique de miniémulsion permet la formation, en une étape, de nanocristaux enrobés d'une corse de poly(HEMA-MBA) biocompatible.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous présentons nos études dédiées à l'encapsulation des nanocristaux de niobate de potassium par un procédé d'adsorption de polymère (aminodextran). Le niobate de potassium (KNbO_3) est un matériau bien connu dans le domaine de l'optique non linéaire ; il présente de très bonnes propriétés de génération de second harmonique. Les nanoparticules de KNbO_3 nous ont été fournies par M. Daniel Rytz de la société FEE GmbH à Idar-Oberstein en Allemagne, société spécialisée dans la fabrication de cristaux pour les applications laser. L'intérêt de ces particules, en dehors de

⁴ M. El Kass, Nanocristaux optiquement non linéaires pour des applications en imagerie biologique : synthèse et caractérisations d'iodate de fer en microémulsions, thèse en science pour l'ingénieur, Université de Grenoble, 2011

leurs propriétés optiques, est leur excellente stabilité chimique et colloïdale. Les travaux engagés ont eu alors pour objectif d'encapsuler ces particules pour une fonctionnalisation spécifique. En effet, l'aminodextran est un polymère biocompatible comportant des fonctions amines primaires, pouvant être utilisées pour greffer des molécules ciblant des fonctions biologiques. Ainsi, des premiers essais menés en collaboration avec le laboratoire CARTEL de l'université de Savoie et le GAP-biophotonics de l'université de Genève ont été menés et seront présentés en fin de chapitre. D'autre part, les fonctions amines du polymère lui confèrent une charge positive pour un pH inférieur au pKa, ce qui permet son adsorption par interactions électrostatiques sur la surface chargée négativement des nanocristaux.

I. Encapsulation par polymérisation en miniémulsion inverse

I.1. Introduction

Nous avons décrit, au précédent chapitre, la méthode de synthèse de nanoparticules inorganiques en miniémulsion. Cependant, ce sont les procédés de polymérisation en miniémulsion qui sont le plus souvent décrits dans la littérature. En effet, la polymérisation dans les gouttelettes de miniémulsion permet d'encapsuler de nombreux matériaux inorganiques. Par exemple, la polymérisation radicalaire en miniémulsion a été utilisée pour élaborer des capsules à cœur inorganique¹ constitué de particules magnétiques. D'autre part, la polymérisation en miniémulsion a prouvé son intérêt dans la préparation de nanoparticules contenant des métaux en raison de son mécanisme de nucléation homogène dans les gouttelettes de manière individuelle².

Généralement, plusieurs entités ou réactifs peuvent être introduits simultanément dans la gouttelette donnant naissance à des particules très diverses.³ ont par exemple décrit la préparation de nanoparticules contenant des sels métalliques par polymérisation en miniémulsion inverse. Ils ont utilisé le poly(hydroxyéthyle méthacrylate) (HEMA) comme polymère biocompatible pour encapsuler différents sels métalliques.⁴ ont préparé des nanoparticules magnétiques incorporées dans une matrice polymérique de polystyrène. Ces nanoparticules hybrides obtenues sans tensioactifs présentent une distribution de taille étroite. Les particules contiennent des agrégats de particules magnétiques formant le cœur.

Une idée intéressante consiste à réaliser la synthèse et l'encapsulation des nanoparticules inorganiques de manière simultanée « *in situ* » par le procédé de polymérisation en miniémulsion.⁵ ont préparé des nanocomposites de polystyrène et de dioxyde de titane par cette technique. Des nanosphères hybrides ont été obtenues avec 80 % de dioxyde de titane à la surface de nanoparticules de polystyrène. Cependant, il existe à notre connaissance peu

d'études similaires, probablement dû à la difficulté de maîtriser tous les paramètres conduisant à des nanoparticules de taille et de morphologie contrôlées.

Nous avons souhaité, malgré ces difficultés potentielles, explorer cette voie originale en développant un protocole expérimental permettant la synthèse et l'encapsulation des nanocristaux d'iodate de fer de manière simultanée. Nous présentons dans la partie suivante un résumé des résultats expérimentaux qui sont plus largement développés dans l'article scientifique qui suit.

I.2. Synthèse des travaux

Des particules hybrides à base d'iodate de fer ont été obtenues par synthèse de cristaux d'iodate de fer suivi de leur encapsulation *in situ* par le procédé de polymérisation radicalaire en miniémulsion inverse. La polymérisation est obtenue en utilisant l'hydroxy éthyle méthacrylate (HEMA) comme monomère hydrosoluble et le N,N'-méthylène-bis-acrylamide (MBA) en tant qu'agent réticulant. L'azo-bis-isobutyronitrile (AIBN) est l'amorceur de polymérisation produisant des radicaux dans la phase continue (cyclohexane).

Brièvement, deux miniémulsions sont obtenues en mélangeant la phase aqueuse (6ml), contenant les réactifs (nitrate de fer ou acide iodique), le monomère hydrosolubles (HEMA) et l'agent réticulant (MBA), et la phase organique préparée par dissolution du span 80 (3% wt.) dans le cyclohexane (44g). Les deux miniémulsions sont mélangées, et l'ensemble subit une étape d'ultrasons qui va permettre d'échanger les cœurs aqueux et d'induire la réaction de coprécipitation. Le système est transféré dans un réacteur thermorégulé à 80°C, équipé d'une agitation mécanique, et la polymérisation est provoquée par l'ajout de l'amorceur AIBN. Au bout de 3h de réaction, les poudres sont récupérées par centrifugation.

Pour ces premiers essais, nous avons principalement fait varier la concentration en réactifs pour une quantité de HEMA / MBA fixe (0,015g / 0,0075g). Pour de faibles concentrations en réactifs ($[\text{Fe}^{3+}] : [\text{IO}_3^-] < 0,08 : 0,032\text{M}$), des structures cœur-écorces ($\approx 200\text{nm}$) sont observées sur les images de microscopie électronique en transmission, mais également des nanoparticules de plus petites tailles sans doute constituées de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ non encapsulées. Dans ces conditions, les spectres de diffraction des rayons X indiquent un très faible niveau de cristallisation des poudres. Pour une concentration en réactifs plus importante ($[\text{Fe}^{3+}] : [\text{IO}_3^-] = 0,16 : 0,64\text{M}$), nous observons des particules sphériques d'une dimension proche de 60nm, sans réellement observer de coque. Nous constatons dans ce cas une cristallinité supérieure et également un signal de génération de second harmonique, qui témoigne des propriétés

optiques non-linéaires des poudres. L'analyse par FTIR confirme la présence du poly(HEMA-MBA) et du iodate de fer sur tous les échantillons. Enfin, le pourcentage en matière organique par particule hybride a été déterminé par analyse thermogravimétrique (ATG).

En résumé, nous avons réalisé avec succès la synthèse et l'encapsulation *in situ* de nanoparticules hybrides d'iodate de fer par le procédé de polymérisation en miniémulsion inverse. Ces premiers essais qui exploitent une voie de synthèse originale, sont prometteurs et méritent d'être poursuivis, par une étude systématique de l'influence des différents paramètres.

***In situ* synthesis and encapsulation of iron iodate (Fe(IO₃)₃) nanocrystals via inverse miniemulsion polymerization**

R. Ladj^{1,2}, M. Eissa¹, J-P. Valour¹, Y. Mugnier², R. Le Dantec², H. Fessi¹, A. Elaissari^{1*}

¹*Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon-1, Villeurbanne; CNRS, UMR 5007, LAGEP- CPE; 43 bd 11 Novembre 1918, F-69622, Villeurbanne, France.*

²*Université de Savoie, Laboratoire SYMME, BP 80439, 74944 Annecy le Vieux Cedex, France.*

*Corresponding author: elaissari@lagep.univ-lyon1.fr

Abstract

Iron iodate Fe(IO₃)₃ nanocrystals have noncentrosymmetric structure and nonlinear optical properties which makes them suitable to be used as probes for multiphoton bioimaging. However, the successful use of these materials in this field is mainly related to the effective control of their synthesis and to the modification of their surfaces in order to enhance their biocompatibility, colloidal stability and non-toxicity. Accordingly, in this work, Fe(IO₃)₃ nanoparticles were prepared using inverse (water-in-oil) miniemulsion technique in order to obtain monodisperse nanocrystals with well-defined morphology. Moreover, Fe(IO₃)₃ nanoparticles were also prepared in situ in miniemulsion, followed by encapsulation with the biocompatible poly(2-hydroxyethyl methacrylate) in presence of methylenebisacrylamide (MBA) as crosslinker to form poly(HEMA-MBA)@Fe(IO₃)₃ hybrid composite. In both cases, the key parameters which affect the final properties of the prepared Fe(IO₃)₃ nanoparticles were investigated, including reactants content and surfactant concentration. In addition, physico-chemical properties of the prepared nanoparticles and nanohybrid were investigated, including particle size and size distribution, morphology, crystallinity, and chemical composition by using various techniques such as dynamic light scattering (DLS), TEM, FTIR, XRD and TGA analyses, respectively. The obtained results showed that Fe(IO₃)₃ and poly(HEMA-MBA)@Fe(IO₃)₃ hybrid colloidal nanoparticles possess various morphologies (nanorods and sphere-like), crystallinity, size and size distributions, which are mainly depend on the conditions and synthesis formulation constituents.

Key Words: co-precipitation, iron iodate, crystallization, miniemulsion, polymerization, morphology, Second Harmonic Generation, multiphoton bioimaging

1. Introduction

In the past decades, considerable attention has been paid to the use of inorganic nanoparticles in various technological fields, and particularly in bionanotechnology, which stems from their unique physical properties including size-dependent optical, magnetic, electronic, and catalytic properties^{1,2}. Among inorganic nanoparticles, those bearing intrinsic optical properties can be used as optical probes for *in vitro* bioimaging. In this field, second harmonic generation (SHG) nanocrystals have been recently proposed as a promising alternative to fluorescent probes for multiphoton microscopy^{3,4}. SHG is a nonlinear optical process where two photons interacting with a noncentrosymmetric crystal are converted into one photon with twice energy. In term of multiphoton microscopy, those new exogenous contrast agents provides several advantages such as high photostability (no bleaching and blinking)⁵ and excitation-wavelength tunability for deep imaging⁶. Iron iodate ($\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$) nanocrystals are considered as a promising representative of those SHG nanoprobe based on inorganic particles having noncentrosymmetric crystalline structure⁷.

However, the successful use of those nanocrystals in bioimaging is mainly related to the control of their size, morphology, surface functionality, colloidal stability, biocompatibility and cytotoxicity. Most of these characteristics can be achieved through the encapsulation or the modification of the particles surfaces with organic shells.

In the last decade, inorganic/polymer hybrid nanocapsules have attracted scientists attention due to their interesting numerous applications in various fields such as functional coatings⁸, inks⁹, adhesives¹⁰, food¹¹, cosmetics¹², and particularly in pharmaceutical and biomedical applications^{13,14}. Generally, the encapsulation of inorganic nanoparticles (hydrophilic) in polymer (hydrophobic) matrix leads to phases demixion due to the incompatibility between organic and inorganic materials¹⁵. The surface modification of hydrophilic inorganic nanoparticles has been performed via two main processes; (i) by surfactant adsorption, as reported for iron oxide nanoparticles coated with oleic acid leading to nanoparticles well dispersed in alkane solvents¹⁶, or through electrostatic self-assembly (layer-by-layer assembly (LBL)¹⁷) of preformed polymers¹⁸, and (ii) via chemical modification which is mainly based on chemical grafting of functional monomers using various innovative techniques, including classical emulsion polymerization, microemulsion¹⁴, miniemulsion polymerization, polycondensation¹⁹ and sol-gel processes²⁰.

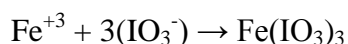
Among these techniques, miniemulsion polymerization is highly favored in the formation of a wide variety of structured inorganic/polymer hybrid particles²¹ which exhibit nano-size ranging from 50 nm to 500 nm, narrow size distributions and high colloidal stability. In the

literature, various inorganic nanoparticles have been encapsulated by polymer shells, through radical miniemulsion polymerization, such as titanium oxide (TiO₂), calcium carbonate (CaCO₃), black coal, ZnO, Quantum Dots (i.e. CdSe/CdS) and iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles²²⁻²⁵.

The key parameter in miniemulsion polymerization is the creation of monodispersed nanodroplets (nanoreactors) in which polymerization is initiated, and finally, each droplet is transformed into particle, conserving the initial droplet size or slightly larger due to the swollen phenomenon. The formation of colloidal stable nanodroplets mainly depends on mode of shear mixing (e.g. ultrasonication or high pressure homogenization)²⁶, type and amount of surface-active agents, and the use of hydrophobic solvent which prevents the diffusion or coalescence of nanodroplets (Ostwald ripening phenomenon). El-Aasser *et al.*²⁷ reported the use of cationic surface-active agents to create miniemulsions. Moreover, it has been shown that cationic and non-ionic surfactants can be efficiently used to create miniemulsions for further polymerization processes, resulting in monodisperse and stable cationic and non-ionic particle dispersions²⁸.

Furthermore, many chemical reactions can be carried out inside miniemulsion nanodroplets (nanoreactors) such as coprecipitation/crystallization^{29,30} or polymerization³¹ reactions using a wide variety of hydrophobic monomers like methyl methacrylate (MMA), styrene (St) etc, and hydrophilic monomers such as hydroxyethyl methacrylate (HEMA), acrylic acid (AA), aminoethyl methacrylate hydrochloride (AEMA), etc.

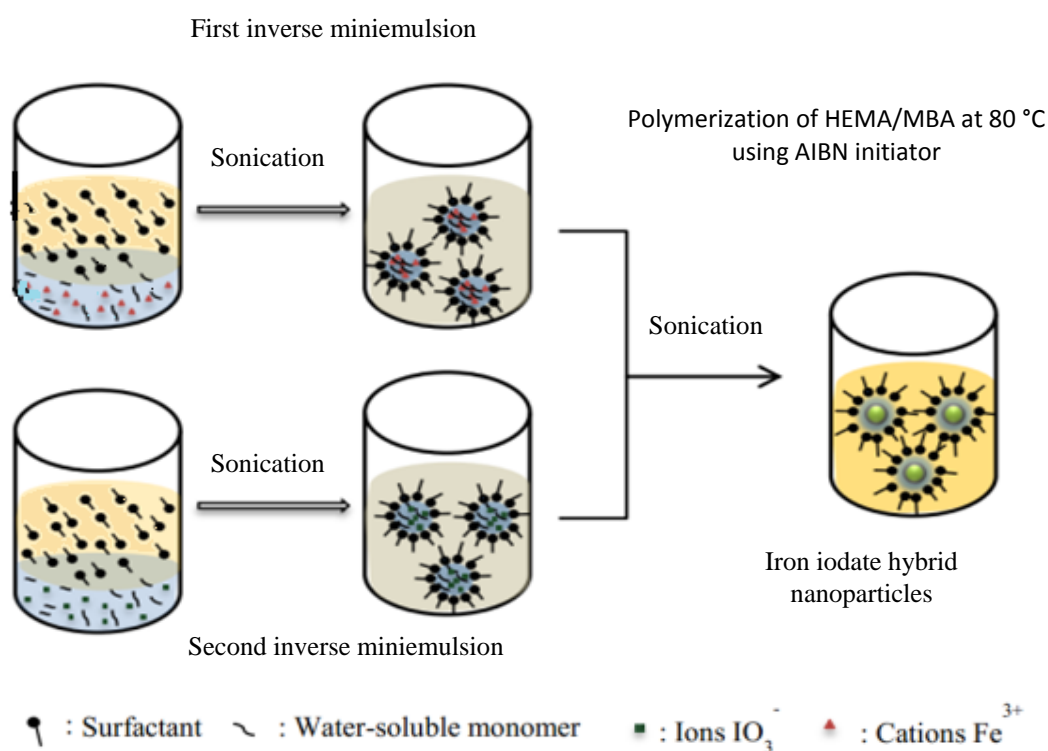
Synthesis of iron iodate nanocrystals was recently reported by Galez *et al.*³². In this work, coprecipitation was used to produce Fe(IO₃)₃ nanorods in aqueous media according to the following reaction:



This technique led to the formation of agglomerated nanopowders which were difficult to be redispersed. For a better control, Mugnier *et al.*³³ used inverse microemulsions to prepare crystalline particles of iron iodates. Unfortunately, while several process parameters have been investigated, it was observed formation of nanorods with a weak control of particles size and morphology.

In this work, we will present the synthesis of Fe(IO₃)₃ bare or encapsulated nanoparticles using inverse miniemulsion technique. First, size-controlled Fe(IO₃)₃ nanocrystals were obtained *via* co-precipitation reaction of iodic acid and iron nitrate inside the aqueous

nanodroplets (*i.e.* nanoreactors) of inverse miniemulsion. Then, we developed a new method for the synthesis, in one step, of monodisperse poly(HEMA-MBA)@Fe(IO₃)₃ hybrid colloidal particles using inverse miniemulsion polymerization. Nanohybrids were prepared via *in situ* co-precipitation reaction by mixing two inverse miniemulsions of iron nitrate and iodic acid containing hydrophilic HEMA monomer and hydrophobic methylenebisacrylamide (MBA) as crosslinker, followed by polymerization reaction, as shown in **Scheme 1**. In the above two cases, the key parameters, including amount of surfactant, concentration of reactants (iodic acid and iron nitrate) were investigated.



Scheme 1. *In situ* synthesis of poly(HEMA/MBA)@Fe(IO₃)₃ hybrid colloidal nanoparticles using inverse miniemulsion polymerization.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Sorbitan mono-oleate 80 (Span 80, purity 99%), cyclohexane (purity 99%), iodic acid (purity 99.5%), iron nitrate (purity 99.9%), hydroxyethyl methacrylate (HEMA, purity 99%), methylene-bis-acrylamide (MBA, purity 99%) and cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) were purchased from Sigma-Aldrich. All these products were used as received. The

oil-soluble initiator azobisisobutyronitrile (AIBN) was purchased from Merck and recrystallized in acetone before use. The organic solvents (acetone and ethanol purity 99%) were purchased from VWR.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of Fe(IO₃)₃ nanocrystals via inverse miniemulsion

Iron iodate Fe(IO₃)₃ nanocrystals were synthesized via chemical co-precipitation reaction inside the nanodroplets of water-in-oil (inverse) miniemulsion. Briefly, 44g of cyclohexane containing 3wt% of Span 80 were mixed with the aqueous phase containing the dissolved iodic acid at a given concentrations (ranging from 0.1 M to 4.0 M) in 6 ml of deionized water, under magnetic stirring at room temperature. The second emulsion was prepared by mixing the same organic phase (44 g) with aqueous phase containing iron nitrate at various concentrations (ranging from 0.025 M to 1.0 M). It is worth to mention that the molar ratio of the reactants (iron nitrate: iodic acid) was fixed at 1:4 (nonstoichiometric). Afterward, the two emulsions were sonicated separately for 5 minutes, by using a Branson sonifier (Model W450) at 90 % of amplitude under ice cooling to minimize the evaporation of cyclohexane. Then, the two miniemulsions were mixed and the resulting mixture was sonicated again, using the same parameters as mentioned before. The mixture, which appeared turbid brown, was then charged into a preheated reactor at 80°C under mechanical stirring (300 rpm) for 3h.

2.2.2. Preparation of poly(HEMA/MBA)@Fe(IO₃)₃ hybrid colloidal particles via inverse miniemulsion polymerization

Poly(HEMA/MBA)@Fe(IO₃)₃ hybrid nanoparticles were prepared using inverse miniemulsion polymerization technique. Briefly, the first emulsion was prepared as follow: 44g of cyclohexane containing 3wt% of Span 80 were mixed with the aqueous phase containing the dissolved iodic acid at a given concentration (ranging from 0.16 M to 0.64 M) in 6 ml of deionized water, HEMA monomer (0.15 g) and MBA crosslinker (5wt% of HEMA, 0.0075 g) under magnetic stirring at room temperature. The second emulsion was prepared by mixing the same organic phase (44 g) with aqueous phase containing iron nitrate at various concentrations (ranging from 0.04 M to 0.16 M), HEMA (0.15 g) and (5 wt% of HEMA, 0.0075 g). The molar ratio of the reactants (iron nitrate: iodic acid) was fixed to 1:4 (nonstoichiometric). Afterward, the two emulsions were sonicated separately for 5 minutes, using the same conditions as mentioned above. Then, the two miniemulsions were mixed and

the resulting mixture was sonicated again. The obtained miniemulsion was charged into a preheated reactor at 80°C under mechanical stirring (300 rpm). The polymerization was then started by adding cyclohexane containing AIBN initiator (4 wt% of total monomers) and kept for 3 hrs. At the end of polymerization, the dispersed particles were precipitated and washed at least three times with ethanol to remove the excess of span 80.

2.3. Characterizations

Average hydrodynamic diameter (D_h , nm) of the prepared particles was measured by dynamic light scattering technique using Zetasizer Malvern 3000 (Malvern Instruments, France). Highly diluted samples were prepared in 10^{-3} M NaCl solution. The average value of at least three measurements was taken.

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Zeta potential (ζ , mV) of the diluted particles was determined by measuring the electrophoretic mobility (μ_e) of the dispersions at 25°C in 10^{-3} M NaCl solution using the Zetasizer 3000. Each reported value was the average of at least three measurements.

$$\mu_e = \frac{\epsilon}{4\pi\eta} \zeta \mu_e \zeta \epsilon \eta$$

Transmission (TEM) and scanning (SEM) electron microscopy images were obtained with a Phillips CM120 TEM (CMEABG) and a Hitachi S800 SEM - FEG, (Centre de microstructures, Université Claude Bernard Lyon 1). A drop of well-dispersed and diluted sample was deposited onto a copper grid (200 mesh and covered with a formvar-carbon) and on an aluminium plate for TEM and SEM, respectively, and then left to dry at room temperature before observations. Thermogravimetric measurement were done on a NETZSCH thermogravimetric analyzer (TG209F1 Iris@ASC). Crystallinity of the dry samples was analyzed with a X-ray diffractometer (Rigaku Miniflex, Japan) with Cu-K α radiation. Fourier Transformed. InfraRed spectroscopy (FTIR) spectra were recorded using an IRPrestige-2, FTIR 8400S instrument. Spectra were typically averaged over 40 scans with a 4 cm $^{-1}$ resolution.

Nonlinear optical response of Fe(IO $_3$) $_3$ and poly(HEMA-MBA)@Fe(IO $_3$) $_3$ hybrid particles was checked by Hyper Rayleigh Scattering (HRS). HRS measurements were performed using a Q-switched Nd:YAG laser operating at 1064 nm and collecting the second harmonic scattering light perpendicularly to the incident beam³⁴.

3. Results and Discussion

3.1. In situ preparation of Fe(IO₃)₃ nanoparticles *via* inverse miniemulsion

Special attention was focused on the influence of the initial reactants (Fe³⁺ and IO₃⁻) concentration and Span-80 content on the size, size distribution, and morphology of the prepared Fe(IO₃)₃ particles.

Table 1. Effect of [Fe³⁺] and [IO₃⁻] concentrations on the size of Fe(IO₃)₃ nanoparticles

Sample code	[Fe ³⁺] (M)	[IO ₃ ⁻] (M)	Initial nanodroplet size* after mixing (nm)	Final particle size** after crystallization (nm)
Blank	0.000	0.0	60	-
f	0.025	0.1	70	75
g	0.100	0.4	70	75
h	0.250	1.0	60	120
i	1.000	4.0	57	80 - 500

Constant parameters: Cyclohexane containing Span-80 (3 wt.%): 44 g, Aqueous phase: 6 g, and AIBN initiator: 4wt% of total monomers. (*) Size measured by DLS, (**) Size measured by TEM

First, the span-80 surfactant concentration was fixed at 3wt% to study the effect of reactants concentration. Droplets size after mixing miniemulsions was measured by DLS for the different conditions (Table 1). A slight decrease of the droplets diameter from 70nm to 57nm is found when the concentration of the reactant increases.

Furthermore, TEM micrographs in Figure 1 show that the morphology of the prepared Fe(IO₃)₃ particles was affected by increasing the concentration of the reactants. Until a concentration of [Fe³⁺]=0.25M, Fe(IO₃)₃ nanoparticles have spherical shape and a size increasing from 75 to 120nm, as shown in the TEM images (f), (g) and (h) on Figure 1. On the other hand, nanorods and spherical nanoparticles with wide size distribution were obtained at high reactants concentration (Figure 1 (i)).

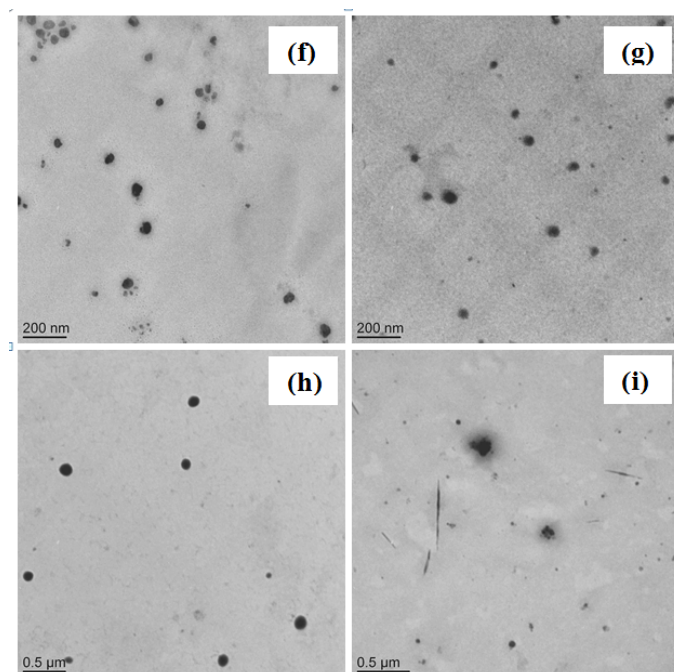


Figure 1. Effect of $[\text{Fe}^{3+}]:[\text{IO}_3^-]$ concentration on the morphology of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanocrystals at fixed span-80 concentration (3wt%), (f) 0.025:0.1 M, (g) 0.1:0.4 M, (h) 0.4:1 M, (i) 1:4 M.

In a second step, the effect of emulsifier concentration was investigated at various loadings (from 0.5 to 5 wt %) with the reactants concentration fixed at $[\text{Fe}^{3+}]=0.1\text{M}$. As a general tendency, the nanodroplets size is directly related to the amount of surfactant used. Indeed, we found a clear decrease of the initial nanodroplet diameter when increasing span 80 content, as shown in table 2.

Table 2. Effect of Span 80 surfactant concentration on the size of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles

Sample code	Span 80 wt %	Initial nanodroplet size* after mixing (nm)	Final particle size** after crystallization (nm)
j	0	---	>1000
k	0.5	55-400	100-400
l	1.5	60	50-200
g	3	70	75
m	5	60	120

Constant parameters: Cyclohexane containing Span 80 (3 wt.%) (Continuous phase): 44 g, Aqueous phase: 6 g, and $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{IO}_3^-]$ concentration is 0.1:0.4. . (*) Size measured by DLS, (**) Size measured by TEM

Interestingly, the co-precipitation of ferric and iodate ions in aqueous surfactant-free solution (0 wt% span 80) in the presence of cyclohexane (continuous phase), led to the formation of

crystalline nanorods of different lengths but with constant diameter (20-30 nm), as shown in the TEM image (j) in Figure 2. The same one-dimensional morphology was also obtained by co-precipitation in aqueous phase³². Similarly, at very low span 80 concentration, as shown in Figure 2 (k) and 3 (l), nanorods are observed, comparable to that of the image (j) but with shorter lengths. Afterward, increasing span 80 concentration above 3 wt% led to modification of particles morphology from nanorods to spherical shape, as shown in Figure 1 (g) and Figure 2 (m). This phenomenon can be explained by an increase of the nanodroplets stability against the Ostwald ripening during heating, may be linked to the adsorption of span 80 on the entire $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ particles surface.

To summarize this part, we found that an effective control of size and morphology can be achieved using co-precipitation in inverse miniemulsion. Particularly, it is observed spherical $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles with 70nm diameter when the concentration of span is 3%wt and the reactants concentration $[\text{Fe}^{+3}]/[\text{IO}_3^-]$ concentration is 0.1:0.4M. In those conditions, the particles and the nanodroplets dimensions are equal and crystallization is carried out inside the miniemulsion “nanoreactor”, limiting the unilateral growth of iron iodate nanoparticles.

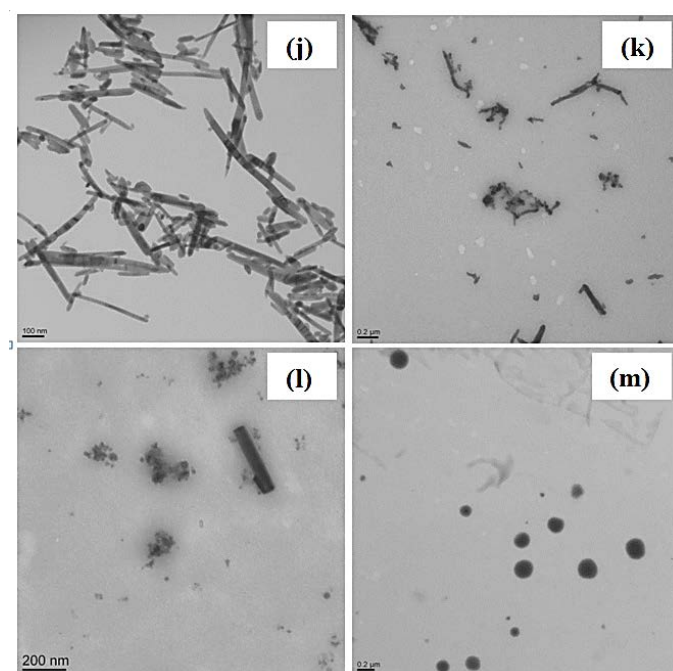


Figure 2. Effect of Span-80 surfactant concentration on the morphology of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanocrystals; (j) 0wt%, (k) 0.5wt%, (l) 1.5wt%, and (m) 5wt%.

3.2. Preparation of poly(HEMA/MBA)@ $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid nanoparticles *via* inverse miniemulsion polymerization

Iron iodate $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid nanoparticles were prepared *in situ* by using inverse miniemulsion polymerization of HEMA:MBA monomers mixture in the presence of the oil soluble AIBN initiator.. To investigate the effect of reactants concentration on the properties of the prepared $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid particles, the MBA/HEMA weight ratio was fixed at 5%, then three different concentrations of the reactants at the same $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{IO}_3^-]$ molar ratio (sample c, d, and e) were used as shown in Table 3.

Table 3. Effect of $[\text{Fe}^{3+}]$ and $[\text{IO}_3^-]$ on $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid nanoparticles formation

Sample code	HEMA, g	MBA, g	$[\text{Fe}^{3+}]$, M	$[\text{IO}_3^-]$, M
c	0.15	0.0075 ^{**}	0.04	0.16
d	0.15	0.0075	0.08	0.32
e	0.15	0.0075	0.16	0.64

Constant parameters: Cyclohexane containing Span-80 (3wt.%): 44 g, Aqueous phase: 6 g, and AIBN initiator: 4wt% of total monomers.^(**) MBA is 5 wt% of HEMA monomer.

At low reactants concentration (Sample c and b), TEM images show particles with spherical core-shell morphology and but also free $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles, as evidenced in TEM images of Figure 3 (c) and (d). The presence of free $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanocrystals can be attributed to the possible instability of the prepared miniemulsion. Such phenomenon has been already observed by Joumaa et al.³⁵ in the case of direct miniemulsion polymerization in the presence of iron oxide, and more recently by Medeiros et al in the case of inverse miniemulsion²⁵. Figure 3 (e) shows that a narrower size distribution is obtained by increasing the reactants concentration. This observed behaviour may be attributed to the effect of salt on the colloidal stability of such inverse miniemulsion via Ostwald ripening deceleration. In this latter case, the nanoparticles diameter is about 60nm. The organic shell is not observed in TEM images but the presence of poly(HEMA/MBA) will be confirmed later with infrared spectroscopy.

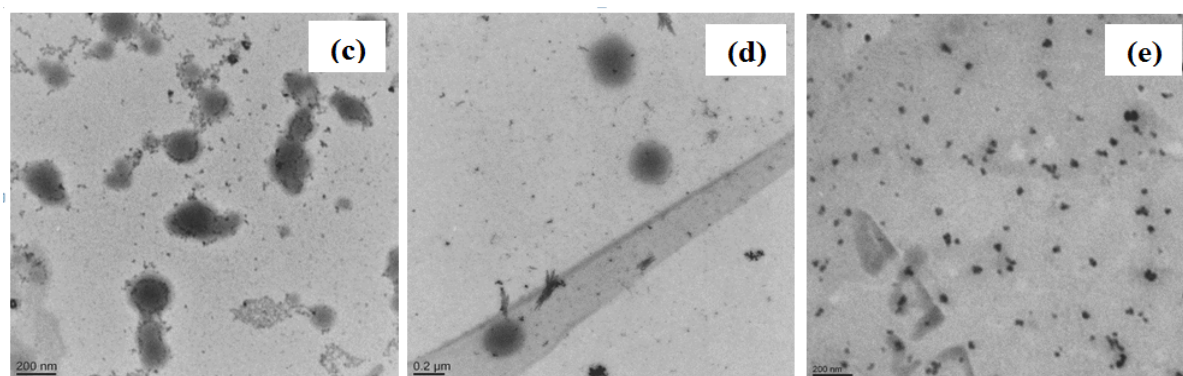


Figure 3. TEM micrographs of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid nanoparticles using 0.15 g of HEMA at different $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{IO}_3^-]$ concentrations, (c) 0.04:0.16, (d) 0.08:0.32, (e) 0.16:0.64. (Scale bare is 200 nm).

3.3. Crystallinity measurements of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles

X-ray diffraction (XRD) analyses were carried out to study the crystallinity of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles and nanohybrids prepared by both methods. Crystallinity of the particles is a crucial parameter with respect to the applications. Indeed, second harmonic properties are directly correlated to the noncentrosymmetric structure of the material. Thus, well-crystallized nanoparticles are required for SHG nanoprobe applications.

Figure 4 shows XRD patterns of the $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles, prepared by inverse miniemulsion, using various reactants concentration (iron nitrate and iodic acid) at fixed amount of span80 (3 wt.%). At low reactants concentration (0.1 M iron nitrate and 0.025 M iodic acid), nanoparticles were not crystallized in the right phase and unidentified well defined peaks are observed (Figure 4 (f)). Those peaks are probably due to the presence of impurities in the resulting powder. By increasing reactants concentration, pure crystallized $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles were obtained (Figure 4 (h) and (i)).

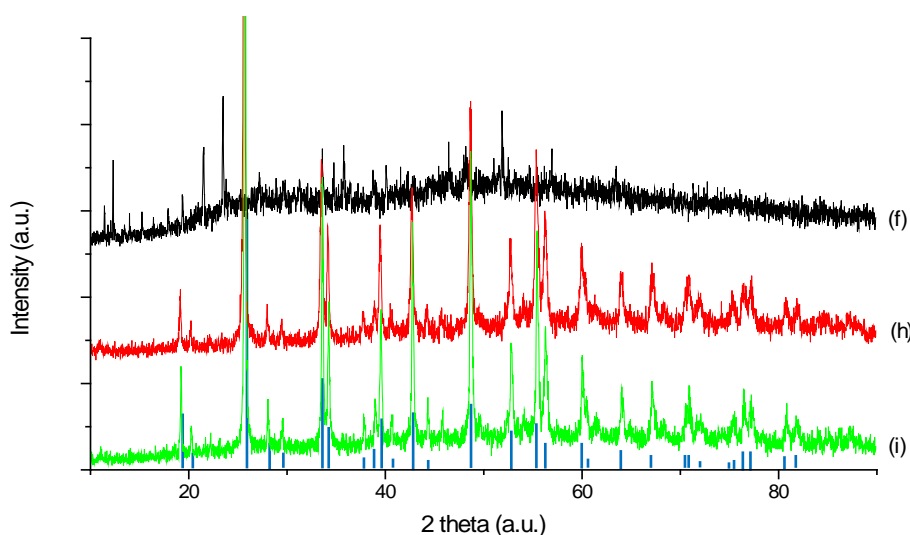


Figure 4. XRD patterns of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles synthesized via inverse miniemulsion at different reactants concentration with various $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{IO}_3^-]$ concentrations: (f) 0.025: 0.1, (h) 0.25:1, (i) 1/ 4. The reference (ICSD #154674) spectrum of iron iodate is given²⁴ (blue lines).

Furthermore, XRD patterns of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles prepared by inverse miniemulsion at fixed concentration of iron nitrate (0.1 M) and iodic acid (0.4 M) and varied amount of span 80 were also investigated. As clearly evidenced from Figure 6, the intensity of diffraction peaks of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles prepared in absence of span-80 (Figure 5 (j)) is very sharp, which refers to the crystalline structure of the pure $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles. Similar results have been previously obtained *via co-precipitation* technique of iron nitrate and iodic acid in aqueous solution³². By incorporation of 3 wt% of span 80, the diffraction peaks of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles are still clearly defined (Figure 5 (g)). Furthermore, the increase of span-80 till 5wt % led to a drastic decrease of the diffraction peaks intensity (Figure 5 (m)). This reduction can be attributed to a perturbative effect of this high amount of span-80 on the crystallization mechanism of iron iodate particles.

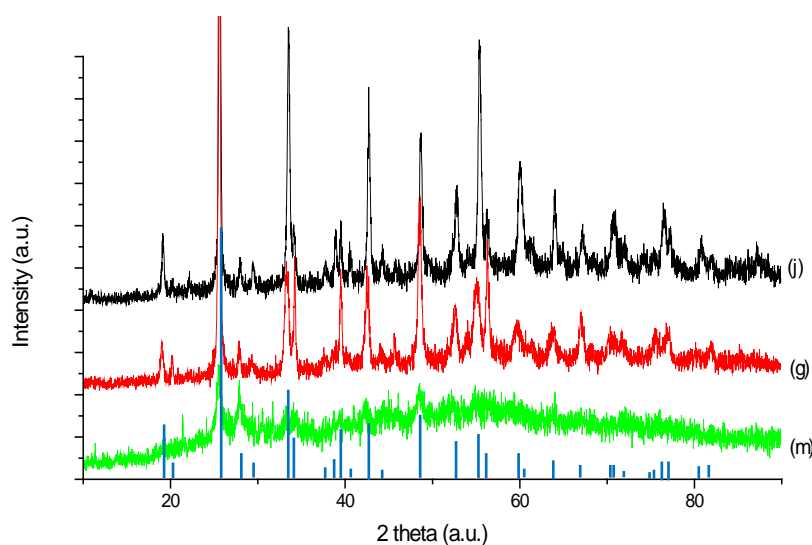


Figure 5. XRD patterns of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles synthesized by inverse miniemulsion at different span 80 concentrations: (j) 0 wt.%, (g) 3 wt.%, and (m) 5 wt.%. The reference (ICSD #154674) spectrum of iron iodate is given²⁴ as well as the main (hkl) diffraction peaks.

Finally, figure 6 shows the effect of reactants concentration on the crystallinity of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ - coated with poly(HEMA-MBA) nanoparticles. It is clear that, at low reactant concentration (sample c), amorphous $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles were obtained (Figure 6 (c)). By increasing the reactant concentrations, the crystallinity of the obtained hybrid particles increases (Figure 6 (d) and (e)).

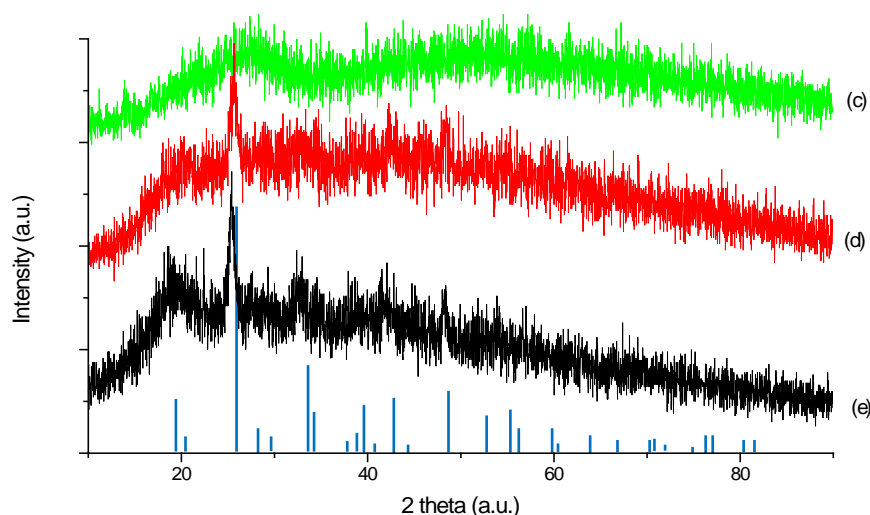


Figure 6. XRD patterns of poly(HEMA)@Fe(IO₃)₃ hybrid nanoparticles synthesized by *in situ* inverse miniemulsion polymerization at different reactants concentration with different [Fe³⁺]/[IO₃⁻] molar ratios, (c) 0.04:0.16; (d) 0.08:0.32; (e) 0.16:0.64. The reference (ICSD #154674) spectrum of iron iodate is given²⁴ as well as the main (hkl) diffraction peaks. More interestingly and according to our recent publication³⁶, all crystallized nanoparticles prepared by both methods show a positive HRS response which makes them suitable to be used as optical probes for multiphoton microscopy.

3.4. FTIR analysis

The different types of synthesized particles were measured by FT-IR spectroscopic technique, as shown in Figure 7. It is clearly seen that all samples have the same absorption bands at 441, 688, 756, and 810 cm⁻¹ attributed to Fe(IO₃)₃ nanoparticles³³. In addition, the intensity of IR absorption bands of Span 80 increases by increasing its concentration, confirming its adsorption on the surface of the iron iodate nanoparticles. The large absorption band between 3633 cm⁻¹ and 3022 cm⁻¹ in Figure 7 (m) is due to terminal hydroxyl group of Span 80. The band at 2923 cm⁻¹ and 2853 cm⁻¹ are due to C–H stretching of CH₂, and the band at 1272 cm⁻¹ is attributed to C–O–C stretching. The characteristic absorption band at 1735 cm⁻¹ is due to C=O stretching vibration.

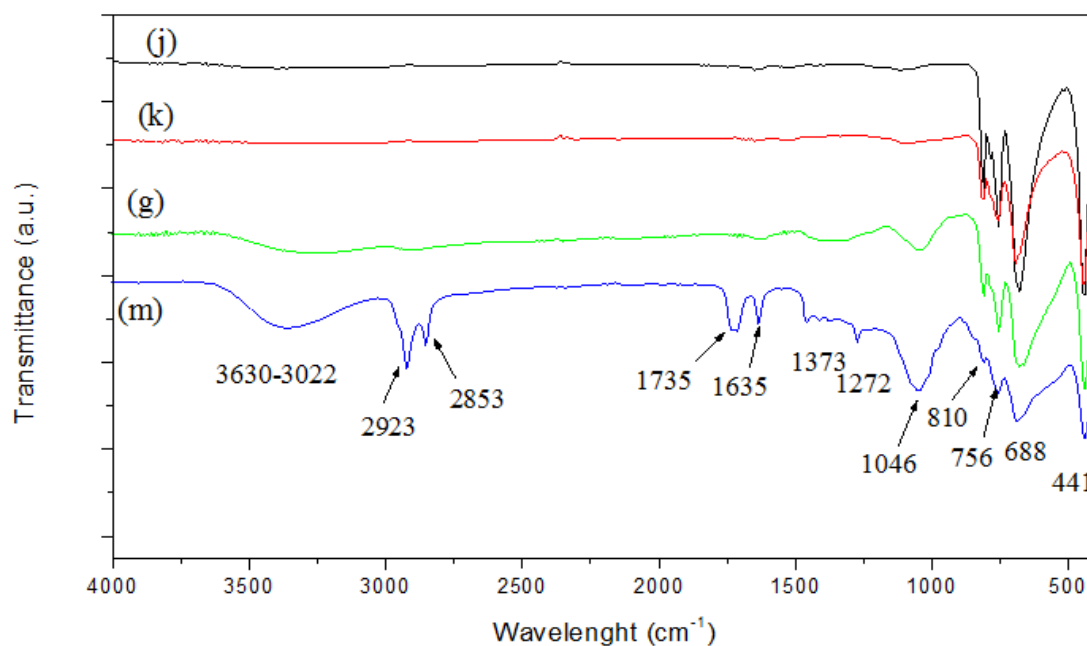


Figure 7. FTIR spectra of crystallized $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles stabilized by Span-80 surfactant at various concentration; (j) 0 wt%, (j) 0.5 wt%, (g) 3 wt%, and (m) 5 wt%.

On the other hand, FTIR spectra of the crosslinked poly(HEMA-MBA) $\text{@Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid nanoparticles was investigated, as shown in Figure 8.

The characteristic absorption FT-IR bands of the organic poly(HEMA-MBA) shell appeared at 3369 cm^{-1} (terminal $-\text{OH}$ hydroxyl group), $2860\text{--}2926\text{ cm}^{-1}$ (CH_2 group), 1272 cm^{-1} due to ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), and a very sharp characteristic peak appeared at 1711 cm^{-1} corresponding to $\text{C}=\text{O}$ stretching vibration. In addition to these bands, the absorption bands of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ appeared at 841 , 799 , 721 and 453 cm^{-1} . Consequently, that gives a decisive evidence of the successful formation of poly(HEMA-MBA) combined with $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles.

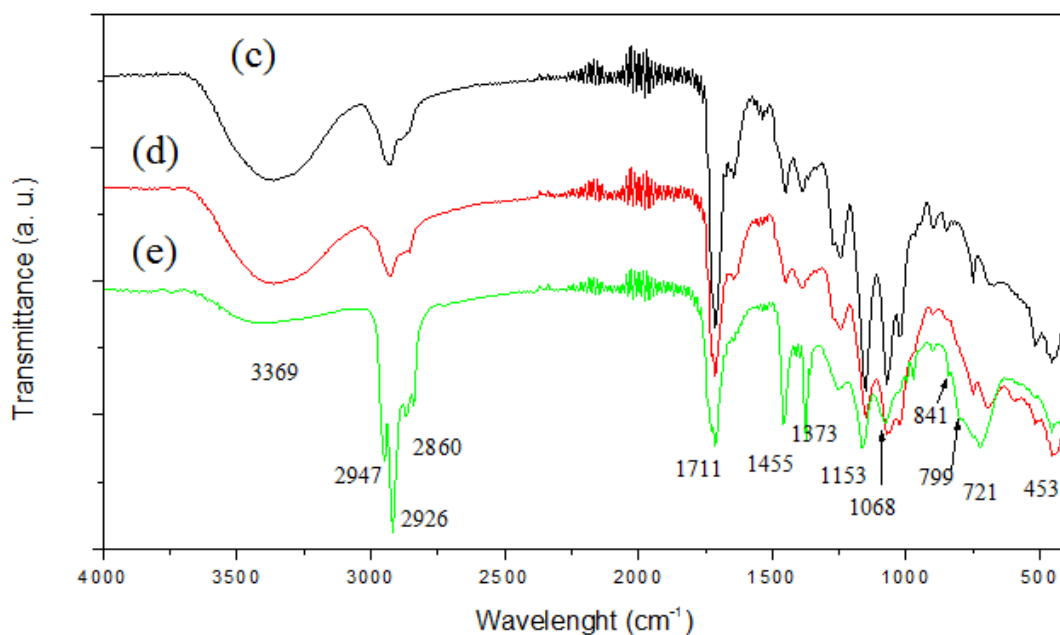


Figure 8. FTIR spectra of poly(HEMA-MBA)@Fe(IO₃)₃ hybrids nanoparticles using 0.15 g of HEMA at different [Fe³⁺]/[IO₃⁻] molar ratios, (c) 0.04:0.16, (d) 0.08:0.32, (e) 0.16:0.64.

3.5. Thermal gravimetric analysis (TGA)

Thermal gravimetric analysis were performed on the prepared bare Fe(IO₃)₃ nanoparticles, as shown in Figure 10. TGA studies were carried out to determine the content of iron iodate nanoparticles in the final product. In absence of Span 80, the weight loss of Fe(IO₃)₃ nanoparticles presented in thermogram (j) is about 7.5 wt.%, attributed to thermal degradation of unidentified impurities. On the other hand, the residual mass of Fe(IO₃)₃ nanocrystals drastically decreases to 49.5 and 20 wt% by increasing the Span 80 concentration from 3 to 5 wt%, respectively (Figure 10 (g) and (m)). At high span concentration (5 wt%), this indicates that about 75 wt.% of the particles mass is due to residual Span 80 adsorbed nanoparticles surface. This result is surprising but in agreement with the FTIR measurements and with the fact that the nanoparticles crystallization is inhibited for this span concentration.

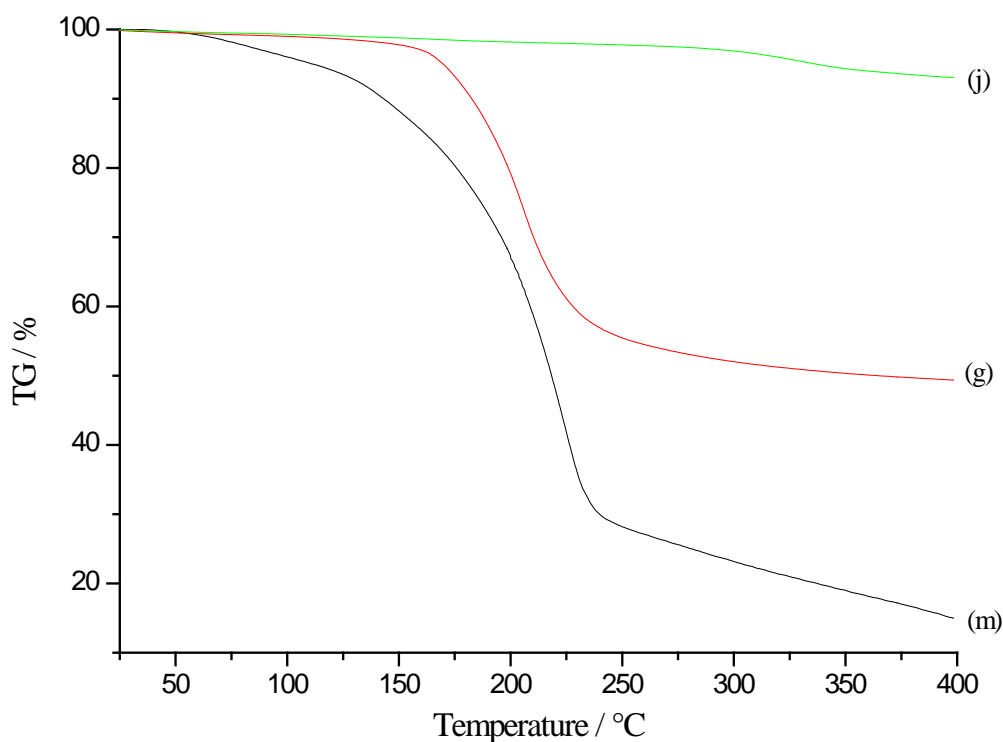


Figure 10. TGA thermograms of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles stabilized in miniemulsion droplets using Span 80 surfactant at various concentrations; (j) 0 wt%, (g) 3 wt%, and (m) 5 wt%.

On the other hand, TGA curves of the poly(HEMA-MBA)@ $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid nanoparticles was obtained as shown in Figure 11. It is clear that the weight loss of poly(HEMA-MBA)-coated $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles decreases by increasing iron nitrate and iodic acid concentrations from 72% (c), 68,5% (d) to 43.5% (e), which corresponding to 28 wt.%, 31.5 wt.%, and 46.5 wt.% of encapsulated iron iodate nanoparticles, respectively. This confirmed the encapsulation of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanocrystals with a polymeric shell.

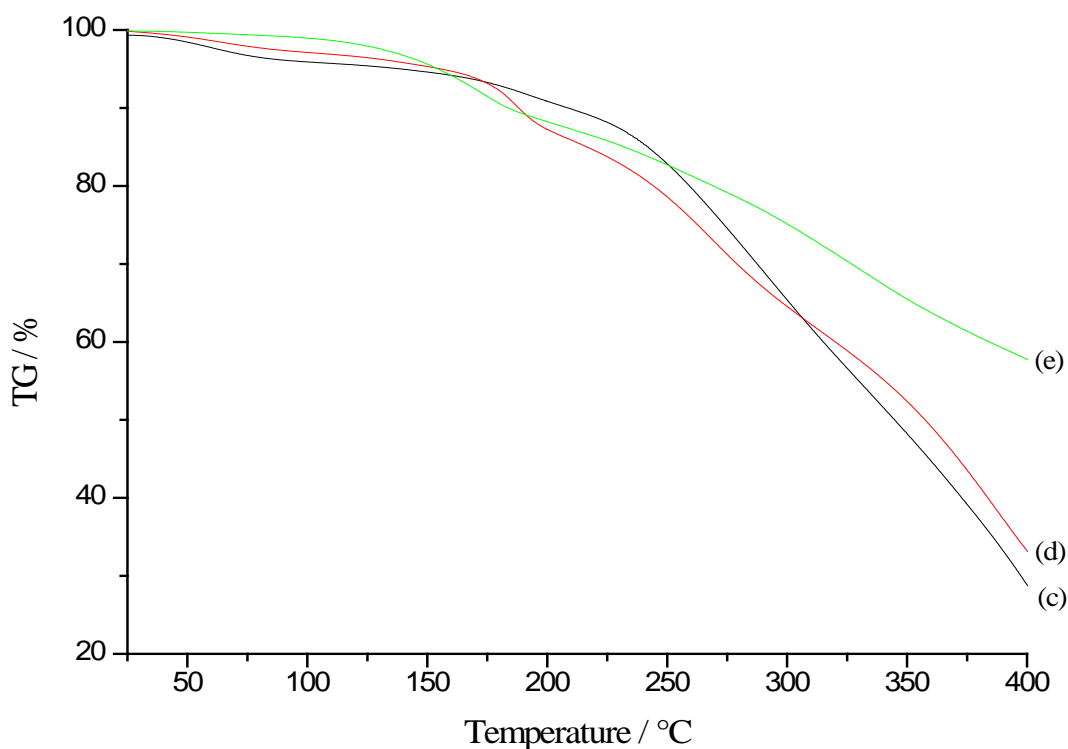


Figure 11. TGA thermograms of poly(HEMA-MBA)-coated $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles prepared at different $[\text{IO}_3^-]/\text{Fe}^{3+}$ molar ratios, (c) 0.16 / 0.04, (d) 0.32 / 0.08, (e) 0.64 / 0.16.

Conclusions

The successful use of iron iodate $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles as SHG probes in bioimaging is related to the control of several parameters such as crystalline structure, particle size, spherical morphology, colloidal stability, biocompatibility and low cytotoxicity. In order to achieve this target, $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles were prepared via chemical co-precipitation reaction inside the nanodroplets of inverse miniemulsion. In addition, they were also prepared *in situ* followed by encapsulation with the biocompatible poly(HEMA-MBA) organic shell, in one step, using inverse miniemulsion polymerization technique. In both cases, the various parameters, which affect on their above-mentioned characteristics, were investigated.

In the first case and at low Fe^{3+} and IO_3^- salts concentrations, spherical and nanosized particles with low degree of crystallinity were observed by using monomers-free inverse miniemulsion precipitation process. The consecutive increase of the salts concentration leads to the formation of spherical $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles with enhanced crystallization efficiency. At high salts concentration, both spherical and rod-like morphologies were obtained. The observed rod-like structure can be attributed to the possible nucleation of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles out of nanodroplets. In addition, the increase of Span 80 amount in the recipe

leads to a drastic decrease in the particle size and a shift from rod-like to spherical morphology.

Regarding the one pot salts co-precipitation and encapsulation of the formed $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles in the hydrophilic poly(HEMA) network matrix, two morphologies were obtained. At low Fe^{3+} and IO_3^- salts concentration, amorphous poly(HEMA-MBA)@ $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid nanoparticles with well-defined core-shell structure was observed in the presence of free $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ nanoparticles. Whereas, at high salts Fe^{3+} and IO_3^- concentration, crystallized spherical nanoparticles were obtained.

In both case, for a specific range of parameters, crystalline iron iodate nanoparticles or nanohybrids with spherical morphology and diameter below 100nm were obtained. Moreover, those particles showed positive HRS response and have a great potential to be used as SHG nanoprobe for multiphoton bioimaging.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the local MACODEV cluster of the Rhone-Alpes region council, from the 2007-2013 French-Swiss INTERREG IV program (project NAOMI) and from the French *Agence Nationale de la Recherche* (project NANOPOP n° 08-NANO-041).

References

- (1) Yin, Y.; Alivisatos, A. P. *Nature* **2005**, *437*, 664–670.
- (2) Bourgeat-Lami, E. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* **2004**, *8*, 305–332.
- (3) Staedler, D.; Magouroux, T.; Hadji, R.; Joulaud, C.; Extermann, J.; Schwung, S.; Passemard, S.; Kasparian, C.; Clarke, G.; Gerrmann, M.; Dantec, R. L.; Mugnier, Y.; Rytz, D.; Ciepielewski, D.; Galez, C.; Gerber-Lemaire, S.; Juillerat-Jeanneret, L.; Bonacina, L.; Wolf, J.-P. *ACS Nano* **2012**, *6*, 2542–2549.
- (4) Pantazis, P.; Maloney, J.; Wu, D.; Fraser, S. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 14535.
- (5) Le Xuan, L.; Zhou, C.; Slablab, A.; Chauvat, D.; Tard, C.; Perruchas, S.; Gacoin, T.; Villeval, P.; Roch, J.-F. *Small* **2008**, *4*, 1332–1336.
- (6) Extermann, J.; Bonacina, L.; Cuna, E.; Kasparian, C.; Mugnier, Y.; Feurer, T.; Wolf, J. *Optics express* **2009**, *17*, 15342.
- (7) Bonacina, L.; Mugnier, Y.; Courvoisier, F.; Le Dantec, R.; Extermann, J.; Lambert, Y.; Boutou, V.; Galez, C.; Wolf, J.-P. *Applied Physics B* **2007**, *87*, 399–403.
- (8) Ghosh, S. K. In *Functional Coatings*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006; pp. 1–28.
- (9) Kamyshny, A.; Ben-Moshe, M.; Aviezer, S.; Magdassi, S. *Macromolecular Rapid Communications* **2005**, *26*, 281–288.
- (10) Lee, H.-H.; Chou, K.-S.; Shih, Z.-W. *International Journal of Adhesion and Adhesives* **2005**, *25*, 437–441.
- (11) Fathi, M.; Mozafari, M. R.; Mohebbi, M. *Trends in Food Science & Technology* **2012**, *23*, 13–27.
- (12) Alvarez-Romàn, R.; Naik, A.; Kalia, Y. .; Fessi, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2004**, 53–62.
- (13) Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 403–419.
- (14) Elaissari, A. *Macromolecular Symposia* **2009**, *281*, 14–19.
- (15) Mock, E. B.; De Bruyn, H.; Hawket, B. S.; Gilbert, R. G.; Zukoski, C. F. *Langmuir* **2006**, *22*, 4037–4043.
- (16) Cheon, J.; Kang, N. J.; Lee, S. M.; Lee, J. H.; Yoon, J. H.; Oh, S. J. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 1950–1951.
- (17) Veyret, R.; Delair, T.; Elaissari, A. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *293*, 171–176.
- (18) Chen, Y.; Ji, T.; Rosenzweig, Z. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 581–584.
- (19) Guyot, A.; Landfester, K.; Joseph Schork, F.; Wang, C. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 1439–1461.
- (20) Avnir, D.; Coradin, T.; Lev, O.; Livage, J. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1013–1030.
- (21) Landfester, K. In *Colloid Chemistry II*; Antonietti, M., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg; Vol. 227, pp. 75–123.
- (22) Erdem, B.; Sudol, E. D.; Dimonie, V. L.; El-Aasser, M. S. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2000**, *38*, 4431–4440.
- (23) Luo, Y.-D.; Dai, C.-A.; Chiu, W.-Y. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2008**, *46*, 8081–8090.
- (24) Harun, N. A.; Horrocks, B. R.; Fulton, D. A. *Nanoscale* **2011**, *3*, 4733–4741.
- (25) Medeiros, S. F.; Santos, A. M.; Fessi, H.; Elaissari, A. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **2012**, *1*, 99–112.
- (26) Sattler, K. D. *Handbook of nanophysics*; CRC Press: Boca Raton, Fla., 2011.
- (27) El-Aasser, M. S.; Sudol, E. D. *JCT Res* **2004**, *1*, 21–31.

- (28) Landfester, K.; Bechthold, N.; Tiarks, F.; Antonietti, M. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2679–2683.
- (29) Taden, A.; Landfester, K. *Macromolecules* **2003**, *36*, 4037–4041.
- (30) Montenegro, R.; Antonietti, M.; Mastai, Y.; Landfester, K. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 5088–5094.
- (31) de Barros, D. P. C.; Fonseca, L. P.; Cabral, J.; Weiss, C. K.; Landfester, K. *Biotechnology Journal* **2009**, *4*, 674–683.
- (32) Galez, C.; Mugnier, Y.; Bouillot, J.; Lambert, Y.; Le Dantec, R. *Journal of Alloys and Compounds* **2006**, *416*, 261–264.
- (33) Mugnier, Y.; Houf, L.; El-Kass, M.; Dantec, R. L.; Hadji, R.; Vincent, B.; Djanta, G.; Badie, L.; Joulaud, C.; Eschbach, J.; Rouxel, D.; Galez, C. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 23–30.
- (34) Le Dantec, R.; Mugnier, Y.; Djanta, G.; Bonacina, L.; Extermann, J.; Badie, L.; Joulaud, C.; Germann, M.; Rytz, D.; Wolf, J. P.; Galez, C. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 15140–15146.
- (35) Joumaa, N.; Toussay, P.; Lansalot, M.; Elaissari, A. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2007**, *46*, 327–340.
- (36) Ladj, R.; El Kass, M.; Mugnier, Y.; Le Dantec, R.; Fessi, H.; Galez, C.; Elaissari, A. *Crystal Growth & Design* **2012**, 121011154137006.
- (37) Nielsen, L. E. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* **1969**, *3*, 69–103.

II. Encapsulation par adsorption de polymère

II.1. Introduction

L'encapsulation par la méthode nommée "layer-by-layer" consiste à déposer de manière séquentielle et alternée de fines couches de macromolécules de charges opposées sur la surface chargée de nanoparticules. En effet, cette peut être réalisée par dépôt de polyélectrolytes^{6,7} ou polyélectrolytes et des nanoparticules^{8,9} par auto-assemblage électrostatique sur des polymères colloïdales. Le traitement thermique ainsi que la dissolution de ces nanoparticules hybrides formulées par cette méthode produit des structures de polymères à cœur vide. L'épaisseur, la morphologie et l'uniformité de la capsule sont des paramètres essentiels de la technique qui peuvent être contrôlées. Par exemple, des nanocristaux de tellure de mercure (HgTe) ont été encapsulés par cette méthode au sein d'une capsule polymérique d'épaisseur contrôlable^{10,11} ont préparé des nanoparticules hybrides à base d'or avec des polyélectrolytes pour diverses applications telles que la détection ou la catalyse. Des nanoparticules de phosphate de calcium enrobées par une capsule uniforme composée de polymères cationiques (poly(allylamine hydrochloride)) et de polymères anioniques (poly(sodium 4-styrene sulfonate)) ont été développées par¹² pour des applications in vivo et en particulier comme vecteur de médicaments « drug delivery ».

Plus proche de nos objectifs, cette méthode peut être la première étape avant une fonctionnalisation de la surface de la particule grâce aux groupements fonctionnels du polymère.¹³ ont préparé des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées par adsorption du poly(éthylène imine) (PEI) à la surface des particules d'oxyde de fer *via* les interactions électrostatiques attractives. Ces nanoparticules ont été utilisées pour l'adsorption d'acides nucléiques et l'amplification enzymatique. Suivant le même principe,¹⁴ ont montré l'adsorption d'aminodextran à la surface des nanoparticules d'oxydes de fer. Ils ont formulé ainsi des nanoparticules magnétiques en exploitant les interactions électrostatiques entre l'aminodextran chargé positivement et la surface des particules magnétique chargée négativement. Dans ce cas, des nanoparticules colloïdales stables sont obtenues avec succès sans ajout de molécules tensioactives.

En nous inspirant de ces derniers travaux, nous avons synthétisé des nanoparticules hybrides fonctionnalisées de niobate de potassium, par interactions électrostatiques entre les nanocristaux et l'aminodextran (polymère saccharidique à fonctionnalité amine).

II.2. Synthèse des travaux

Comme nous l'avons déjà dit, le niobate de potassium présente de très bonnes propriétés optiques non linéaires et une stabilité chimique excellente. Ces nanocristaux ont été proposés, parmi d'autres, comme nanosondes SHG dans le cadre du projet NAOMI ; il était donc intéressant de proposer des méthodes de fonctionnalisation pour les applications développées par nos partenaires (imagerie biomédicale *in vitro*).

Les premières analyses sur des suspensions de KNbO_3 ont montré une charge de surface négative, comme cela est souvent observé pour les oxydes. Son encapsulation avec un polymère biocompatible de charge positive était donc envisageable. Du point de vue des applications, cette encapsulation permet aussi la régulation de la charge de surface pour de meilleures interactions avec le milieu vivant.

Nous avons utilisé l'aminodextran qui est un polymère cationique biocompatible. Ce polymère a été synthétisé au LAGEP suivant une procédure spécifique décrite par ¹⁴. Un des avantages est que l'adsorption est réalisée en milieu aqueux, sans ajout de molécules tensioactives ni de solvants : ce process est par conséquent adapté aux applications biomédicales. Nous avons développé avec attention un protocole expérimental permettant de limiter les phénomènes de floculation. Les suspensions ont ensuite été caractérisées en utilisant principalement la mesure du rayon hydrodynamique par diffusion dynamique de la lumière (DLS), la mesure du potentiel zêta, la microscopie électronique (MET et MEB) et la spectroscopie infrarouge (FTIR).

Toutes les caractérisations concordent pour démontrer une adsorption de l'aminodextran en surface des particules : augmentation de la taille en DLS, variation significative et cohérente du potentiel zeta, analyse des mesures FTIR. De plus, nous avons déterminé la masse d'aminodextran adsorbé en surface des nanocristaux grâce à un dosage réalisé par une méthodologie spécifique utilisant la fluorescamine¹⁵. La concentration de l'aminodextran adsorbé est de 80.8 mg/g de nanoparticules de niobate de potassium. ¹⁴ ont rapporté une valeur comparable dans le cas de l'encapsulation de particules d'oxyde de fer par adsorption d'aminodextran.

Enfin, nous avons démontré la potentialité de ces particules pour les applications de nanosondes SHG grâce à des images obtenues sur des échantillons biologiques. Des nanoparticules encapsulées par l'aminodextran ont été mis en contact avec des cellules pulmonaires puis imagées par microscopie de génération de second harmonique à l'université de Genève. Sur ces images, les nanosondes apparaissent avec un excellent contraste et

délivrent un signal stable et facilement détectable. Aucune toxicité particulière n'a été constatée et les particules sont localisées en périphérie des cellules.

Conclusion

L'encapsulation des nanoparticules inorganiques a été menée par deux procédés fondamentalement différents. D'une part, nous avons utilisé le procédé de polymérisation en miniémulsion inverse *in situ* pour les nanoparticules d'iodate de fer. D'autre part, l'encapsulation des nanocristaux de niobate de potassium a été réalisée par voie physique *via* le procédé d'adsorption de polymère.

Les nanoparticules hybrides d'iodate fer présentent une taille et une morphologie contrôlée, avec la possibilité d'obtenir des objets colloïdaux sphériques de 100 nm de diamètre. Ces nanoparticules présentent des propriétés optiques non linéaires souhaitables pour des applications en imagerie *in vitro*.

Les nanoparticules fonctionnalisées de niobate de potassium et stable ont été obtenues avec succès. Par imagerie de second harmonique, nous avons démontré et validé les potentialités de ces nanosondes.

Références

- (1) Dou, J.; Zhang, Q.; Jian, L.; Gu, J. *Colloid & Polymer Science* **2010**, *288*, 1751–1756.
- (2) Landfester, K. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 4488–4507.
- (3) Cao, Z.; Wang, Z.; Herrmann, C.; Ziener, U.; Landfester, K. *Langmuir* **2010**, *26*, 7054–7061.
- (4) Ramos, J.; Forcada, J. *Langmuir* **2011**, *27*, 7222–7230.
- (5) Wu, Y.; Zhang, Y.; Xu, J.; Chen, M.; Wu, L. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, *343*, 18–24.
- (6) Sukhorukov, G. B.; Donath, E.; Davis, S.; Lichtenfeld, H.; Caruso, F.; Popov, V. I.; Möhwald, H. *Polymers for Advanced Technologies* **1998**, *9*, 759–767.
- (7) Gao, C.; Leporatti, S.; Moya, S.; Donath, E.; Möhwald, H. *Langmuir* **2001**, *17*, 3491–3495.
- (8) Caruso, F.; Möhwald, H. *Langmuir* **1999**, *15*, 8276–8281.
- (9) Rhodes, K. H.; Davis, S. A.; Caruso, F.; Zhang, B.; Mann, S. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 2832–2834.
- (10) Rogach, A. L.; Koktysh, D. S.; Harrison, M.; Kotov, N. A. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1526–1528.
- (11) Angelatos, A. S.; Katagiri, K.; Caruso, F. *Soft Matter* **2005**, *2*, 18–23.
- (12) Schwiertz, J.; Meyer-Zaika, W.; Ruiz-Gonzalez, L.; González-Calbet, J. M.; Vallet-Regi, M.; Epple, M. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3831–3834.
- (13) Veyret, R.; Delair, T.; Pichot, C.; Elaïssari, A. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *295*, 155–163.
- (14) Mouaziz, H.; Veyret, R.; Theretz, A.; Ginot, F.; Elaïssari, A. *J Biomed Nanotechnol* **2009**, *5*, 172–181.
- (15) Ganachaud, F.; Bouali, B.; Véron, L.; Lantéri, P.; Elaïssari, A.; Pichot, C. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1998**, *137*, 141–154.

Aminodextran-coated potassium niobate (KNbO₃) nanocrystals for Second Harmonic Generation bio-imaging

Rachid Ladj^{1,2}, Thibaud Magouroux³, Hatem Fessi¹, Yannick Mugnier², Ronan Le Dantec², Marc Dubled², Christine Galez², Abdelhamid Elaissari^{1*}

¹ University of Lyon, F- 69622, Lyon, France; University of Lyon-1, Villeurbanne, CNRS, UMR 5007, LAGEP-CPE-308G, 43 bd. du 11 Nov.1918, F-69622, Villeurbanne, France.

² SYMME, Université de Savoie, BP 80439, 74944, Annecy Le Vieux Cedex, France.

³GAP Biophotonics, Université de Genève, 22 chemin de Pinchat, CH-1211, Genève 4, Switzerland.

* Corresponding author: E-mail: elaissari@lagep.univ-lyon1.fr

Phone: +33-472431841, Fax: +33-472431682

Abstract

Potassium niobate (KNbO₃) nanoparticles with high second order nonlinear optical properties were coated with amine containing dextran. The surface coating was performed *via* attractive electrostatic interaction. During the aminodextran adsorption onto negatively potassium niobate, flocculation phenomena was observed and limited by controlling the adsorption methodology. The obtained particles bearing aminodextran shell were mainly characterized using Transmission Electron Microscopy (TEM), infrared analysis (FTIR), Dynamic Light Scattering (DLS) and zeta potential as a function of the pH. A clear polymer adsorption onto the nanoparticles surface is demonstrated. The colloidal study was completed by investigating the possible detection of such particles by multiphoton imaging microscope.

1. Introduction

Due to their outstanding properties explored in numerous applications such as biosensing,¹ *in vitro* imaging², biomedical diagnostic³, *in vivo* imaging⁴ and bionanotechnology area⁵, an increasing attractive interest has been dedicated to the elaboration of divers functional

inorganic colloidal particles. The most studied inorganic nanoparticles are iron oxide, quantum dots, silica, gold, titanium oxide and special attention is dedicated to colloidal nanoparticles bearing intrinsic physical properties (optical, magnetic electric...etc) and functionality⁶.

In biomedical area, iron oxide nanoparticles have been extensively used as support and carriers of biomolecules mainly for *in vitro* and for *in vivo* diagnostic imaging. In fact, the magnetic colloids are firstly used in immunoassays (i.e. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA tests) and nucleic acid detection (enzyme-linked oligosorbent assay ELOSA)⁷. The main objective of *in vitro* biomedical diagnosis is the elaboration of new magnetic colloids and tested methodologies in order to enhance analysis sensitivity, specificity to replace to centrifugation steps and to be ready to be integrated in microsystems and Lab-on-chip. The problem encountered in this field, and particularly in the area of nucleic acid probes⁸, is the sensitivity level. One possibility to partially solve this problem is to increase the concentration of the target (RNA and/or DNA) in the considered medium before specific detection of the target probe. Then utilization of appropriate magnetic particles for extraction and concentration of nucleic acids would be of extreme interest⁹. Iron oxide nanoparticles are also largely used for *in vivo* biomedical diagnostic based in magnetic resonance imaging. In such application, iron oxide nanoparticles are first functionalized *via* surface modification and chemically grafting of specific antibody in order to recognize the tumours for instance¹⁰.

For bioimaging, fluorescent nanoparticles are used as label for detecting or quantifying the target (i.e. protein, nucleic acid or antibody)¹¹⁻¹³. Two major nanoparticles are used; (a) nanoparticles labelled with small fluorescent molecules such as fluorescein isothiocyanate (FITC) or Rhodamine¹⁴ and (b) semi-conducting nanoparticles i.e. quantum dots (QD). Quantum dots nanoparticles are used in order to solve the bleaching problem generally observed in the case of classical fluorescent organic molecules¹⁵.

Before their using in biomedical applications, all used nanoparticles are firstly subjected to surface modification for two main reasons: (i) to enhance their biocompatibility with biomolecules and (ii) to induce or create reactive functional groups on their surfaces for specific targeting or for bio-recognition ability.^{16,17}

Surface modification of inorganic nanoparticles can be performed through different encapsulation processes. One of the first approaches is based on chemical crosslinking of proteins on the surface of seed inorganic nanoparticles as reported in the case of iron oxide

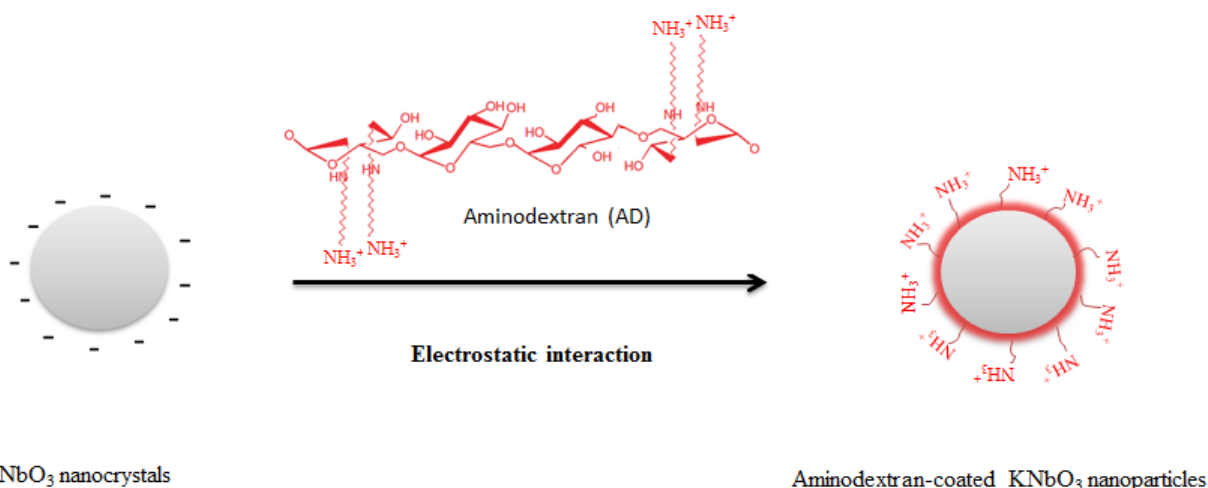
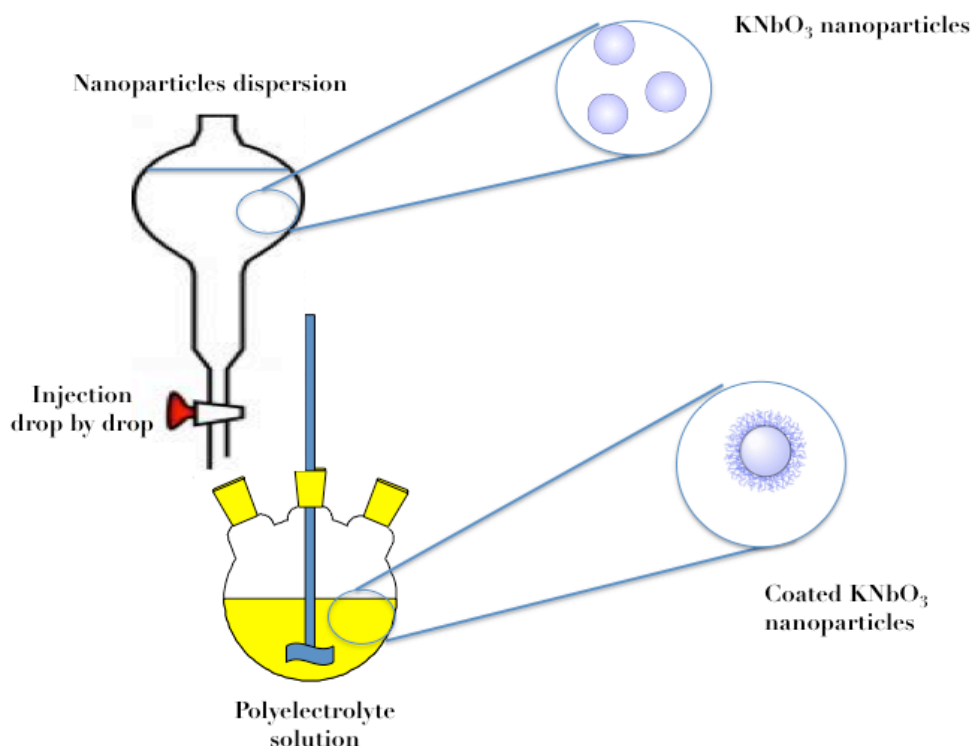
nanoparticles¹⁸. The adsorbed proteins are crosslinked at high temperature with a chemical crosslinking agent such as glutaraldehyde. Such modified magnetic nanoparticles are mainly used for *in vitro* biomedical diagnostic applications and particularly in molecular biology.

Encapsulation of inorganic nanoparticles *via* chemical process has been largely investigated using various polymerization techniques in dispersion media.⁹ The conventional approach is based on classical emulsion polymerization of styrene in the presence of inorganic nanoparticles. Unfortunately, the polymerization of hydrophobic monomers like styrene in presence of the bare hydrophilic inorganic nanoparticles leads incontestably to non-encapsulated particles. Accordingly, to improve the encapsulation efficiency of inorganic nanoparticles, surface modification is of a paramount importance. Therefore, surface modification of inorganic nanoparticles makes their surfaces hydrophobic, which enhances their compatibility with the polymer during the encapsulation process.¹⁹ This can be achieved via surfactant adsorption to obtain organic dispersible nanoparticles within the polymer matrix. However, emulsion polymerization in the presence of surface modified nanoparticles leads to small amount of nanoparticles.²⁰ On the other hand, radical miniemulsion polymerization technique has been largely explored. The first reported work based on surface nanoparticles modification, evidenced good and homogeneous encapsulation of inorganic material.²¹ Such an approach has been extended to the encapsulation of various inorganic nanoparticles but as-obtained particles have high size, usually above 150 nm.²²

In order to keep the particles size within nanometer range or below 100 nm, a polymer coating remains the most appropriate way: it can be performed via chemical grafting or physical adsorption on the surface of inorganic nanoparticles.^{23,7} In the first case, functionalization was achieved with the introduction of amino, carboxylic, thiol or aldehyde reactive functional groups. Usually, the grafting polymer density is low, but highly expanded, and lead to the formation of hairy like particles.²⁴ For the latter case, physical adsorption was mainly performed via attractive electrostatic interactions, which lead to a homogeneous coating. However, flocculation was frequently observed, so that a careful adsorption control and removal of the formed aggregated particles are needed. As compared to chemical grafting, polymer adsorption is more sensitive to experimental parameters such as salinity and pH of the medium .

In this study, preparation of aminodextran-coated KNbO₃ nanoparticles exhibiting excellent nonlinear optical properties is reported. Such Second Harmonic Generation (SHG) nanoparticles were recently proposed as new optical probes for bio-labelling in multiphoton microscopy.²⁵⁻²⁹ Comparatively with traditional fluorescent labels like dyes or quantum-dots,

harmonic nanocrystals exhibit several interesting features such as high optical contrast, absence of bleaching or blinking and excitation wavelength tunability. Among the different available SHG nanocrystals, KNbO₃ exhibits high second harmonic efficiency and acceptable cytotoxicity.²⁹ Accordingly, the aim of this work is to investigate the possible surface modification of KNbO₃ nanoparticles for bio-imaging applications, *via* adsorption of aminodextran hydrophilic and biocompatible polymer. The final particles were subject to colloidal and physical chemistry characterization. Special attention was focused on the adsorption process leading to stable functionalized KNbO₃ nanoparticles dispersion as schematically represented in Scheme (1) below. Finally, the prepared particles have been imaged in a multiphoton microscope, demonstrating the great potential of such probes.



Scheme 1: Schematic illustration of the preparation of aminodextran-coated KNbO₃ nanoparticles *via* drop-by-drop addition of diluted nanoparticles into aminodextran solution.

2. Experimental section

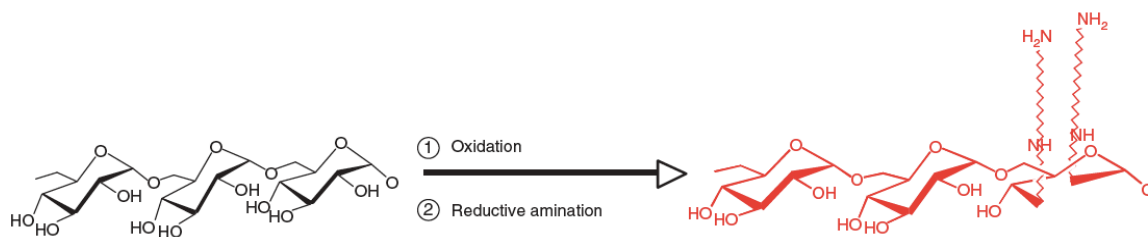
2.1. Material

Sodium borohydride (NaBH_4), sodium periodate (NaIO_4), hydrochloric acid, acetic acid, ammonia, tetramethyl ammonium hydroxide solution (1 M), potassium hydroxide, and hexamethylenediamine were purchased from Merck. Dextran T40 was from Amersham Biosciences. Reagents were of pure grade and were used as received.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of aminodextran aqueous solution

Dextran was first dissolved in a buffer solution of sodium acetate, followed by oxidation in the dark using sodium periodate at room temperature for four hours. Afterward, the solution was dialyzed against Milli-Q water. It was cooled at 8°C before adding the hexamethylenediamine. Then, the mixture was stirred overnight at 8°C until obtention of a homogeneous solution. The imine functional groups produced by the reaction between the oxidized dextran and diamine was reduced by sodium borohydride in a solution of potassium hydroxide. The mixture was left under stirring overnight at room temperature, followed by dialysis against Milli-Q water. Finally, the obtained solution was lyophilized to get aminodextran as a yellow powder. More details about the preparation of aminodextran were reported by Mouaziz *et al.*³⁷ Finally, 0.2g of amino-dextran (AD) powder was solubilized in 100 ml of Milli-Q water.



Scheme 2: Schematic illustration of chemical aminodextran preparation from dextran

2.2.2. Preparation of AD-coated KNbO₃ nanoparticles

KNbO₃ nanoparticles, kindly provided by FEE GmbH Company (Idar-Oberstein, Germany), were obtained after ball grinding of bulk crystal. Nanoparticles were first solubilized in deionized water and left for one week without stirring to allow sedimentation. Afterward, the supernatant was collected and evaporated with rotary evaporator at 40 °C until completely dry to estimate the exact mass of powder. After that, the powder was redispersed in 20 mL of distilled water at pH 9, using ultrasonic bath. This nanoparticles suspension was added dropwise to 40 ml of aqueous solution of AD (2g/L) under a moderate magnetic stirring (scheme 1). The mixture was left overnight at room temperature under magnetic stirring. The result

was a milky liquid, consisting of dispersed AD-coated KNbO₃ nanoparticles that were recovered under centrifugation at 30000 rpm for 30 minutes. This was followed by several washing with deionized water to remove any excess of free-amino-dextran. Finally, the AD-coated KNbO₃ nanoparticles were redispersed in Milli-Q water.

3. Characterization of aminodextran coated potassium niobate nanoparticles

3.1. Chemical composition

The chemical composition of the prepared AD-coated KNbO₃ nanoparticles was investigated by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) (IRPrestige-2, Shimadzu). Spectra were recorded with an average of 40 scans and a resolution of 4 cm⁻¹.

3.2. Particle Size measurements

Average hydrodynamic diameter (D_h) of bare and coated particles was measured by dynamic light scattering (DLS) (Zetasizer Malvern 3000-HSA, Malvern Instruments). The measurements were carried out at 25°C using a highly diluted sample in 10⁻³ Mol/L NaCl solution. The average value of at least three measurements was determined.

3.3. Zeta potential (ζ) measurements

The surface charge (zeta potential) of the particles was determined with the same instrument, after measuring the electrophoretic mobility (μ_e) of the dispersions, as a function of pH at 25°C in 10⁻³ Mol/L NaCl solution. Each reported value is the average of three measurements.

3.4. Morphology of Amino dextran-coated KNbO₃ nanoparticles

The morphology of AD-coated KNbO₃ nanoparticles was investigated by using transmission electron microscopy (TEM) (Phillips CM120) and scanning electron microscopy (SEM) (Hitachi S800, SEM-FEG). For TEM observations, samples were diluted at least 10 times in distilled water. A drop of a well-dispersed suspension was then dried onto a copper grid (200 mesh and covered with a formvar-carbon) at room temperature.

3.5. Determination of the amount of aminodextran adsorbed on KNbO₃ nanoparticles

Concentration of surface amino groups on AD-coated KNbO₃ nanoparticles was determined by fluorescence titration according to the method published by Ganachaud et al.³¹ Briefly, this method is based on the reaction of fluorescamine with the primary amino groups of aminodextran, yielding a highly fluorescent product. The measurements were carried out in a

MicroMax microwell plate reader (FluoroMax-3 spectrofluorometer, Jobin Yvon) with excitation and emission wavelengths of 393nm and 477nm respectively. The amino group content was measured in the supernatant obtained after centrifugation of latex particles. A calibration curve was first obtained using several aminodextran solutions in Milli-Q water (pH 9.5) with concentrations ranging from 0 to 10 $\mu\text{g/mL}$. Then, 2 mL of a solution prepared by adding 1mL of supernatant solution in 100 mL of Milli-Q water at pH 9.5, was mixed with 2 mL of fluorescamine solution in acetone (0.3 g/L). Afterward, 2.5 mL of this mixture was used for fluorescence measurement. The total content of the surface amino groups on the latex particles was calculated from the difference in fluorescent intensities between the calibration curve and the measured samples.

4. Multiphoton Imaging characterizations

Human lung cells lines (BEAS-2B) were grown for 24 h on round glass slides (12 mm diameter) in 24-well plates (Corning, 500 $\mu\text{L/well}$). Nanoparticles diluted in fresh complete culture medium at 50 $\mu\text{g/mL}$ concentrations were added to the cells, which were further incubated for different time periods (5 and 24 h). Then, cells were exposed to 5 $\mu\text{g/mL}$ of FM1-43FX fluorescent probe (Invitrogen, 1 mg/mL stock solution in DMSO) for 1 min in ice, followed by washing with PBS, and finally maintained in 4% buffered paraformaldehyde solution at 4°C until image acquisition.

A Spectra-Physics Mai-Tai DeepSee tunable Ti:Sapphire oscillator was used as the excitation source. The latter was coupled to a Nikon A1R-MP multi-photon imaging platform via a hybrid galvanometric/resonant laser. Nikon A1R-MP features four independent non-descanned parallel detectors, whose spectral acceptance is defined by tailored pairs of dichroic mirror and interferometric filters. A Plan APO 40 \times WI N.A. 1.25 objective was used to focus the excitation laser and to epi-collect the nonlinearly excited signal (SHG) and dye markers fluorescence.

5. Results and discussion

5.1. Adsorption of Amino dextran onto KNbO_3 nanoparticles

Adsorption of water-soluble polymers at solid-liquid interfaces may result from the establishment of hydrogen bonds and/or hydrophobic interactions. Regarding polyelectrolytes interaction with charged solids, these forces may act concomitantly with charge-charge

interactions^{32–35}. Our investigation concerned the selective adsorption of polycation (amino-dextran) of well-defined molecular weight and charge density on KNbO₃ colloidal nanoparticles suspended in water at a given pH, where only electrostatic interactions are engaged in the process.

Let us first imagine that a unique colloidal KNbO₃ nanoparticle becomes immersed in aqueous solution containing polycation (amino-dextran) polyelectrolyte. In such condition and in the presence of oppositely charged polyelectrolyte, various phenomena can be observed as a function of polycation concentration. (i) When the polymer concentration is lower than the surface saturation condition, the adsorption leads to bridging flocculation even in batch adsorption conditions. (ii) Under the surface saturation conditions, stable coated particles are generally observed. But with increasing the nanoparticles number in the adsorption medium, the polymer concentration becomes lower than the surface saturation condition and aggregation was then observed as in the first case. (iii) Largely above the surface saturation condition, the introduction in the adsorption medium particle per particle leads to full surface coverage with limited aggregated particles.

After aminodextran adsorption onto KNbO₃ nanoparticles, the particles were centrifuged and the supernatant was collected, then the amount of aminodextran was determined via supernatant analysis (depletion method) using fluorescamine based method,³⁶ after standard curve elaboration. This method depends on the reaction of fluorescamine with the primary amine groups of aminodextran leading to formation of a fluorescent adduct, as shown in Figure 1. The amount of aminodextran was found to be around 80.8 mg/g of KNbO₃ particles. Similar adsorbed amount has been reported by Mouaziz et al³⁷ via the investigation of aminodextran adsorbed on iron oxide nanoparticles.

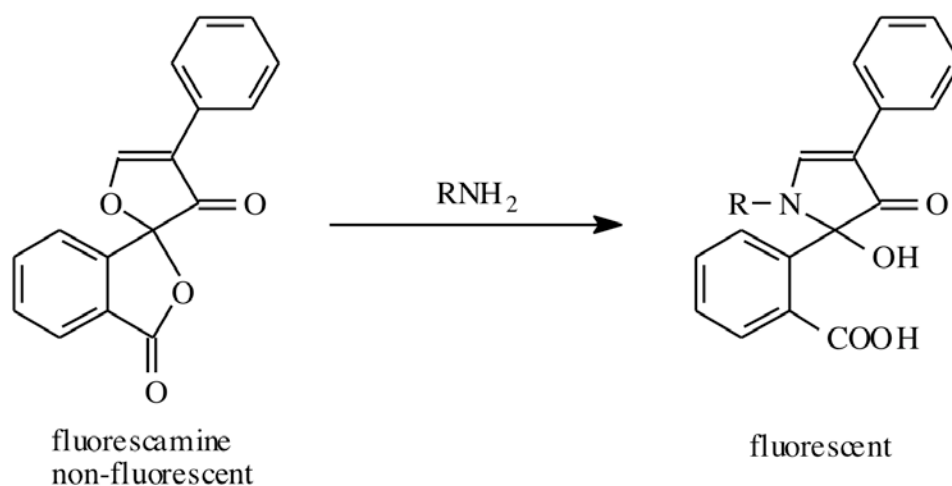


Figure 1: Titration of amine group using fluorescamine based method. The fluorescent compound was detected and quantified at 393/477 nm Excitation/Emission wavelengths.³¹

5.2. Chemical composition of Amino dextran -coated KNbO₃ nanoparticles

The chemical structure of the bare and KNbO₃ nanoparticles containing adsorbed amino-dextran polymer was characterized by FT-IR analysis, as shown in Figure 2. On the bare nanoparticles spectrum (Figure 2-a), it is observed a large dip presented two peaks at 509 cm⁻¹ and 593cm⁻¹ corresponding to the stretching vibration bands of O-Nb-O bond of KNbO₃. After coating, the IR spectrum on figure 2-c shows the appearance of two characteristic peaks at 2857 and 2927 cm⁻¹ of symmetric and asymmetric stretching modes of CH₂, the large bond observed between 3000 and 3500 cm⁻¹ correspond to -NH₂ and -OH groups of aminodextran, respectively, and the peak at 1635 cm⁻¹ is attributed to the C=O stretching mode of dextran. Furthermore, the peaks at 1152, 1109 and 1017 cm⁻¹ are attributed to C-O-C of the pyranose ring of aminodextran polymer, which appear in spectra (b) and (c) of Figure 2. In fact, these results give a conclusive evidence for the successful deposition of aminodextran polymer on KNbO₃ surfaces, even after few washes.

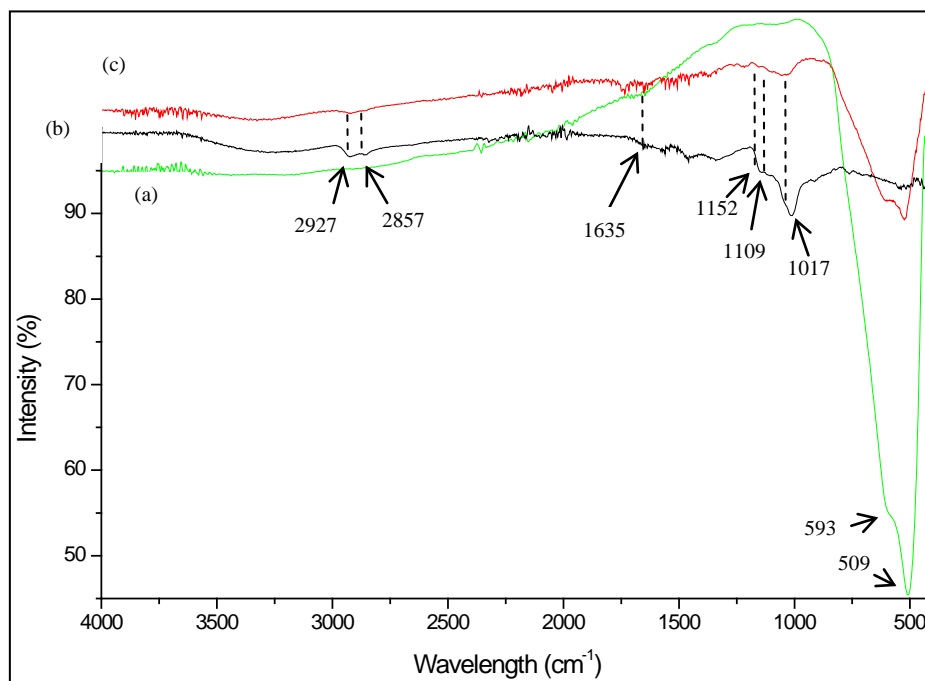


Figure 2: FTIR Spectra of aminodextran as reference (b) uncoated (a) and Aminodextran-coated KNbO₃ nanoparticles (c).

5.3. Morphology analysis of uncoated and aminodextran-coated KNbO₃ nanocrystals

Firstly, the morphology of uncoated KNbO₃ nanoparticles was examined using transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). The TEM micrographs (Figure 3-A) show that uncoated KNbO₃ nanocrystals have non-spherical and non-homogeneous morphology. This can be attributed to the ball grinding process used for the preparation of the nanoparticles. In addition, their particles size is in the submicron range with high polydispersity. Interestingly, AD-coated KNbO₃ nanocrystals have the same morphology (Figure 3-B), which can be attributed to low thickness and density of the interfacial polymer shell.

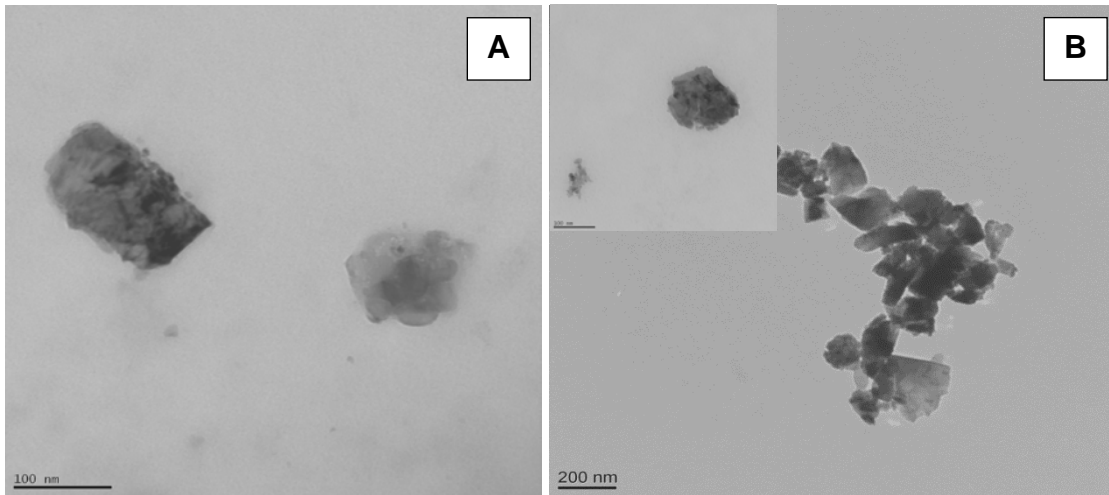


Figure 3: TEM images of uncoated (A), and AD-coated KNbO₃ nanoparticles (B)

On the other hand, scanning electron micrographs of coated and uncoated KNbO₃ nanoparticles (Figure 4) show that the particles are non-spherical which corroborates TEM observations. Furthermore, the observed clusters are attributed to the fact that the analysis was carried out under dried state, which explains the aggregation of particles.

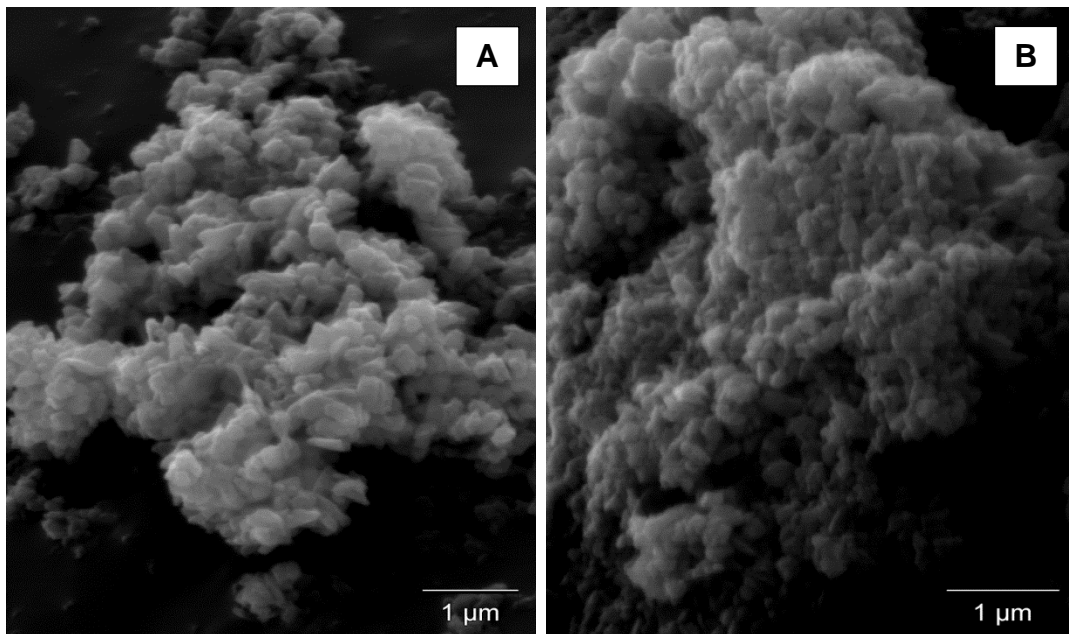


Figure 4: SEM images of uncoated (A), and AD-coated KNbO₃ nanoparticles (B)

5.4. Size and size distribution of aminodextran-coated KNbO₃ nanoparticles

The hydrodynamic particles size of uncoated and coated KNbO₃ crystals was examined by light scattering in a highly diluted 1mM NaCl aqueous solution. The average hydrodynamic diameter of uncoated KNbO₃ particles was found to be 140 nm and a broad size distribution ranging from 60 to 400 nm is observed (Figure 5). This measure is consistent with the TEM observation shown in the previous section. After coating, the value of hydrodynamic diameter shifts to 180 nm. It should be noted that, after treatment of KNbO₃ particles with aminodextran polymer solution, several washing through consecutive centrifugation-redispersion cycles using Milli-Q water are done to remove free (unreacted) aminodextran polymer. The hydrodynamic diameter increase is thus probably explained by a successful AD-coating of the particles.

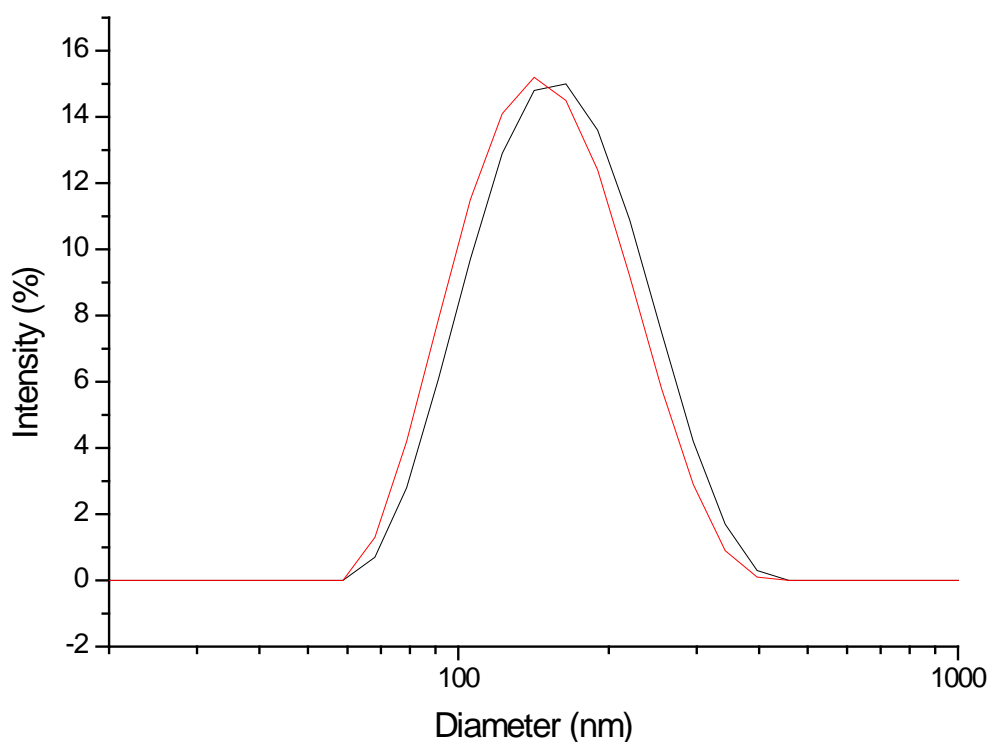


Figure 5: Size distribution of uncoated (red) and aminodextran coated-KNbO₃ nanoparticles (black) in 10⁻³ Mol/L NaCl solution at pH 9

5.5. Electrokinetic study

In order to confirm the adsorption of aminodextran polymer, zeta potential of uncoated and coated KNbO₃ nanoparticles was examined as a function of pH, in 1 mM NaCl solution. Zeta potential of uncoated KNbO₃ nanoparticles, was positive below pH 3.5 and negative above as shown in Figure 6. This can be attributed to a possible protonation of hydroxyl groups on the

particles surface as generally reported for inorganic oxide particles. Upon coating, a global positive shift of the zeta potential curve was observed with a new isoelectric point at pH 8.5. This shift is attributed to the presence of primary amine groups on the particles surface. Below pH 8.5, the amine groups are protonated forming quaternary positive ammonium cation ($-\text{NH}_3^+$). In the vicinity of pH 8.5, close to the pKa of primary amine groups (i.e. pH 10), the particles become less and less positively charged as expected. Such behavior has already been observed in the case of iron oxide nanoparticles containing aminodextran polymer.³⁷ These results give strong indications of the successful adsorption of aminodextran onto KNbO_3 nanoparticles, confirming the previous experimental characterizations.

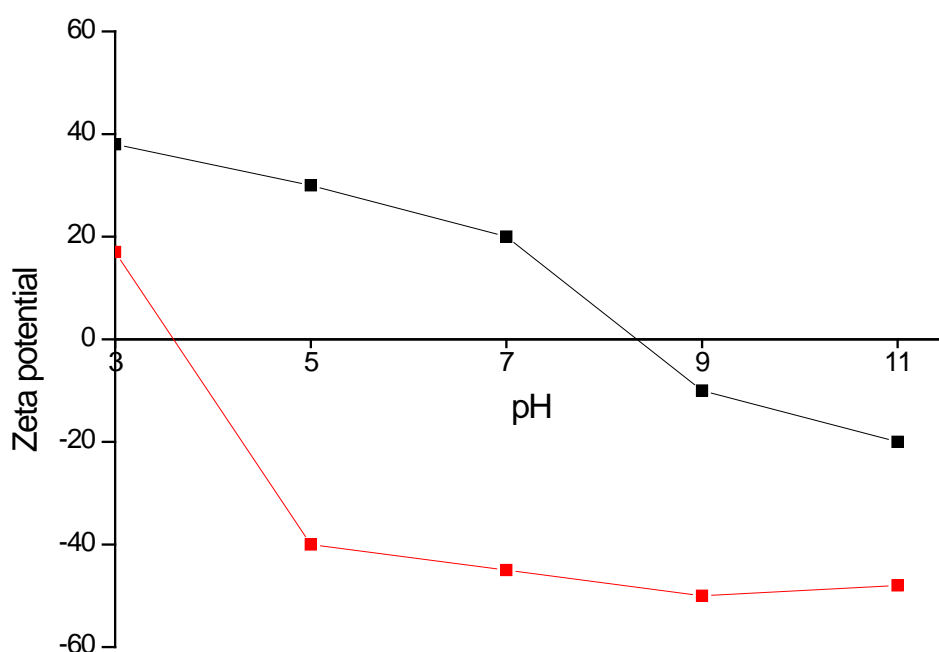


Figure 6: Zeta potential as a function pH of uncoated (red spectrum) and aminodextran-coated KNbO_3 nanocrystals (black spectrum) in 10^{-3} mol/L NaCl at 25°C .

5.6. Multiphoton Imaging

To assess the AD-coated KNbO_3 nanoparticles as imaging labels for the various cells, a systematic image screening has been carried out over the different cell lines using multiphoton imaging microscope. The cells were exposed for 5 h and 24 h to AD coated KNbO_3 nanoparticles. A representative result is shown in Figure 9, displaying BEAS-2B non-tumoral cells (in yellow) exposed for 24 h to nanoparticles (in blue) at $50 \mu\text{g/mL}$ concentration (Figure 7). Excitation wavelength of the laser is set at 790 nm.

Cells exposed to nanoparticles are numerous and healthy, in agreement with the good survival rate observed with PEG-coated KNbO_3 nanoparticles nanoparticles display an intense and

photostable signal. They are mostly confined to cell membranes, co-localizing with the cell membrane dye.

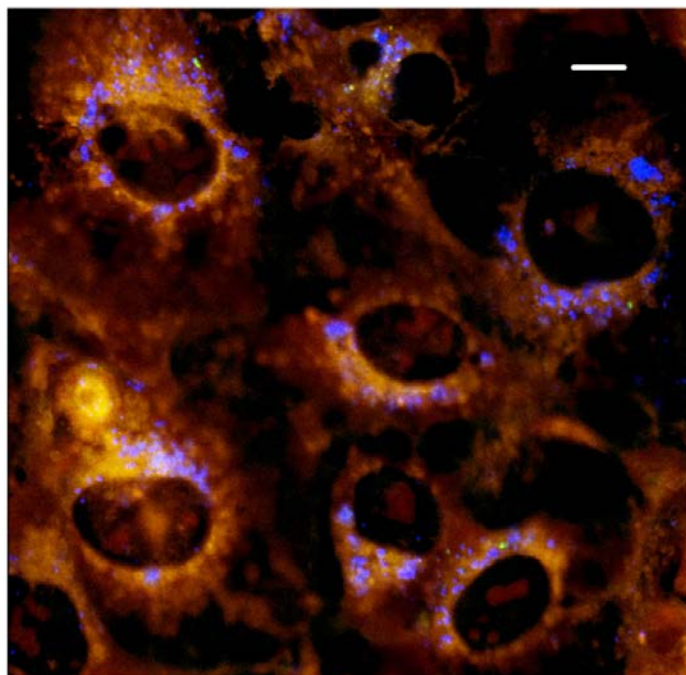


Figure 7: BEAS-2B cells (in yellow) exposed for 24 h to KNbO₃ coated with 0.05% Aminodextran (in blue) at 50 µg/mL. The scale bar corresponds to 10 µm.

6. Conclusion

The aminodextran prepared from dextran via chemical grafting of hexamethylenediamine onto oxidized dextran was adsorbed on KNbO₃ nanoparticles. The adsorption was governed by attractive electrostatic interactions since the mixing was performed above pH 4, where the particle surface is negative. In order to obtain stable KNbO₃ nanoparticles containing aminodextran, the adsorption is achieved by introducing dropwise highly diluted KNbO₃ nanoparticles in high polyelectrolyte concentration solution. The adsorbed amount was quantified using chemical method and the presence of aminodextran onto nanoparticles was also evidenced by IR and zeta potential measurement. The measure of zeta potential as a function of pH revealed the cationic character of the particles induced by the adsorbed polycation.

The second harmonic property of the KNbO₃ nanoparticles containing aminodextran was clearly evidenced by imaging the particles in a cell culture. Due to the attractive interactions between the cationic aminodextran coated KNbO₃ nanoparticles and the cells, high local concentration of particles was observed around the cells.

Acknowledgements:

This research has been partially conducted under the European FP7 Research Project *NAMDIATREAM* (NMP4-LA-2010-246479, <http://www.namdiatream.eu>) and INTERREG IV France-Switzerland *NAOMI*. We are grateful to Dr Daniel Rytz at FEE GmbH (Idar-Oberstein, Germany) for providing us with KNbO₃ nano-powder, Daniel Ciepielewski (Nikon France, Division Instruments) for the multi-photon microscopy platform in Geneva and Davide Staedler (Institute of Chemical Sciences and Engineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne) for cells preparation and manipulation. We thank MACODEV cluster from Région Rhône-Alpes for the financial support of Rachid Ladj PhD thesis.

References

1. Sun, E. Y., Josephson, L., Kelly, K. A. & Weissleder, R. Development of Nanoparticle Libraries for Biosensing. *Bioconjugate Chemistry* **17**, 109–113 (2006).
2. Hsieh, C.-L., Grange, R., Pu, Y. & Psaltis, D. Bioconjugation of barium titanate nanocrystals with immunoglobulin G antibody for second harmonic radiation imaging probes. *Biomaterials* **31**, 2272–2277 (2010).
3. Jain, R., Dandekar, P. & Patravale, V. Diagnostic nanocarriers for sentinel lymph node imaging. *Journal of Controlled Release* **138**, 90–102 (2009).
4. Jiang, Y. Biomedical imaging for preclinical and clinical applications. *Bone* **47**, S378–S379 (2010).
5. Elaissari, A. Magnetic Latex Particles in Nanobiotechnologies for Biomedical Diagnostic Applications: State of the Art. *Macromolecular Symposia* **281**, 14–19 (2009).
6. Sanvicens, N. & Marco, M. P. Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology* **26**, 425–433 (2008).
7. Veyret, R., Elaissari, A. & Delair, T. Polyelectrolyte functionalized magnetic emulsion for specific isolation of nucleic acids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **53**, 78–86 (2006).
8. Berensmeier, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied microbiology and biotechnology* **73**, 495–504 (2006).
9. Rahman, M. M., Chehimi, M. M., Fessi, H. & Elaissari, A. Highly temperature responsive core–shell magnetic particles: Synthesis, characterization and colloidal properties. *Journal of Colloid and Interface Science* **360**, 556–564 (2011).
10. Huh, Y. M. *et al.* In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 12387–12391 (2005).
11. Lim, S. H., Buchy, P., Mardy, S., Kang, M. S. & Yu, A. D. C. Specific nucleic acid detection using photophysical properties of quantum dot probes. *Analytical chemistry* **82**, 886–891 (2009).
12. Gu, Z. *et al.* Probing protease activity by single-fluorescent-protein nanocapsules. *Chem. Commun.* **46**, 6467–6469 (2010).
13. Zhou, X. & Zhou, J. Improving the signal sensitivity and photostability of DNA hybridizations on microarrays by using dye-doped core-shell silica nanoparticles. *Analytical chemistry* **76**, 5302–5312 (2004).
14. Weissleder, R., Kelly, K., Sun, E. Y., Shtatland, T. & Josephson, L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature biotechnology* **23**, 1418–1423 (2005).
15. Wang, X. *et al.* Non-blinking semiconductor nanocrystals. *Nature* **459**, 686–689 (2009).
16. Bajpai, A. K., Shukla, S. K., Bhanu, S. & Kankane, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* **33**, 1088–1118 (2008).
17. Faraji, A. H. & Wipf, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**, 2950–2962 (2009).
18. Elaissari, A. & Bourrel, V. Thermosensitive magnetic latex particles for controlling protein adsorption and desorption. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **225**, 151–155 (2001).
19. Chaix, C., Pacard, E., Elaissari, A., Hilaire, J.-F. & Pichot, C. Surface functionalization of oil-in-water nanoemulsion with a reactive copolymer: colloidal characterization and peptide immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **29**, 39–52 (2003).
20. Musyanovych, A. & Adler, H.-J. P. Grafting of Amino Functional Monomer onto Initiator-Modified Polystyrene Particles. *Langmuir* **21**, 2209–2217 (2005).

21. Musyanovych, A., Rossmannith, R., Tontsch, C. & Landfester, K. Effect of Hydrophilic Comonomer and Surfactant Type on the Colloidal Stability and Size Distribution of Carboxyl- and Amino-Functionalized Polystyrene Particles Prepared by Miniemulsion Polymerization. *Langmuir* **23**, 5367–5376 (2007).
22. Harun, N. A., Horrocks, B. R. & Fulton, D. A. A miniemulsion polymerization technique for encapsulation of silicon quantum dots in polymer nanoparticles. *Nanoscale* **3**, 4733–4741 (2011).
23. Anderson, R. E. & Chan, W. C. W. Systematic Investigation of Preparing Biocompatible, Single, and Small ZnS-Capped CdSe Quantum Dots with Amphiphilic Polymers. *ACS Nano* **2**, 1341–1352 (2008).
24. Delair, T., Meunier, F., Elaïssari, A., Charles, M.-H. & Pichot, C. Amino-containing cationic latex–oligodeoxyribonucleotide conjugates: application to diagnostic test sensitivity enhancement. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **153**, 341–353 (1999).
25. Dempsey, W. P., Fraser, S. E. & Pantazis, P. SHG nanoprobe: Advancing harmonic imaging in biology. *BioEssays* **34**, 351–360 (2012).
26. Grange, R., Lanvin, T., Hsieh, C.-L., Pu, Y. & Psaltis, D. Imaging with second-harmonic radiation probes in living tissue. *Biomed. Opt. Express* **2**, 2532–2539 (2011).
27. Pantazis, P., Maloney, J., Wu, D. & Fraser, S. E. Second harmonic generating (SHG) nanoprobe for in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 14535 (2010).
28. Extermann, J. *et al.* Nanodoublets as deep imaging markers for multi-photon microscopy. *Optics express* **17**, 15342 (2009).
29. Staedler, D. *et al.* Harmonic nanocrystals for biolabeling: a survey of optical properties and biocompatibility. *ACS Nano* **6**, 2542–2549 (2012).
30. Birdi, K. S. *Handbook of surface and colloid chemistry*. (CRC Press/Taylor & Francis: 2008).
31. Ganachaud, F. *et al.* Surface characterisation of amine-containing latexes by charge titration and contact angle measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **137**, 141–154 (1998).
32. Elaïssari, A., Haouam, A., Huguenard, C. & Pefferkorn, E. Kinetic factors in polymer adsorption at solid/liquid interfaces. Methods of study of the adsorption mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science* **149**, 68–83 (1992).
33. Elaïssari, A., Chauveteau, G., Huguenard, C. & Pefferkorn, E. Surface Area Exclusion Chromatography: Influence of Localized and Mobile Adsorption Processes. *Journal of Colloid and Interface Science* **173**, 221–230 (1995).
34. Pefferkorn, E. & Elaïssari, A. Adsorption--desorption processes in charged polymer/colloid systems; structural relaxation of adsorbed macromolecules. *Journal of Colloid and Interface Science* **138**, 187–194 (1990).
35. Huguenard, C., Widmaier, J., Elaïssari, A. & Pefferkorn, E. Adsorption of Polyelectrolytes on Chromatographic Columns. Simulated and Experimental Concentration Profiles. *Macromolecules* **30**, 1434–1441 (1997).
36. Pihlajamaki, A., Shabtai, Y. & Gilron, J. Detection of free primary amines in TFC membranes by microscopic fluorescence imaging. *Desalination* **286**, 80–86 (2012).
37. Mouaziz, H., Veyret, R., Theretz, A., Ginot, F. & Elaïssari, A. Aminodextran containing magnetite nanoparticles for molecular biology applications: preparation and evaluation. *J Biomed Nanotechnol* **5**, 172–181 (2009).

Conclusions

L'encapsulation des nanoparticules inorganiques a été menée par deux procédés fondamentalement différents. D'une part, nous avons utilisé le procédé de polymérisation en miniémulsion inverse *in situ* pour les nanoparticules d'iodate de fer. D'autre part, l'encapsulation des nanocristaux de niobate de potassium a été réalisée par voie physique *via* le procédé d'adsorption de polymère.

Les nanoparticules hybrides d'iodate fer présentent une taille et une morphologie contrôlée, avec la possibilité d'obtenir des objets colloïdaux sphériques de 100 nm de diamètre. Ces nanoparticules présentent des propriétés optiques non linéaires souhaitables pour des applications en imagerie *in vitro*.

Les nanoparticules fonctionnalisées de niobate de potassium et stable ont été obtenues avec succès. Par imagerie de second harmonique, nous avons démontré et validé les potentialités de ces nanosondes.

Conclusion Générale & Perspectives

Les enjeux de la nanomédecine sont considérables car les apports des nanomatériaux, des nanosystèmes et de la micro-fluidique offrent de nouvelles potentialités dans les domaines du diagnostic, de l'imagerie biomédicale et du théranostic. Dans ces domaines, les nanoparticules organiques sont utilisées pour la vectorisation ciblée de médicaments. En ce qui concerne les nanoparticules inorganiques et en particulier les particules magnétiques, elles sont utilisées pour le développement de nouveaux agents de contraste pour l'IRM et l'obtention de nanosondes thérapeutiques pouvant créer localement une élévation de température sous l'action de champs magnétiques alternatifs. En termes de microscopie optique, le contraste peut être obtenu par des boîtes quantiques fluorescentes (ou *quantum dots*) qui, après excitation, ont l'avantage d'émettre à des longueurs d'ondes particulières associées à la taille de ces nanoparticules. Cela permet, à partir d'un même matériau de type CdS ou CdSe, de marquer spécifiquement des cellules (ou biomolécules) après une fonctionnalisation adéquate de la surface des nano-marqueurs.

L'approche développée dans ce travail de thèse, basée sur l'utilisation de nanosondes optiquement non-linéaires, n'a pas pour but de concurrencer ces marqueurs fluorescents mais se veut plutôt comme une voie complémentaire. L'intensité de fluorescence émise par les boîtes quantiques est en effet supérieure à la SHG produite par un nanocristal non-centrosymétrique mais le clignotement des *quantum dots* et la toxicité de ses éléments chimiques peuvent être des limitations à des utilisations *in vitro* et *in vivo*. De plus, la fluorescence est un phénomène résonnant au sens que les longueurs d'ondes d'excitation et de détection sont « fixées » par la nanoparticule. Au contraire, l'absence de résonance pour la SHG permet de se décaler dans l'infrarouge et d'utiliser des régions spectrales dans lesquelles les tissus sont moins absorbants et augmenter ainsi la profondeur de pénétration tout en diminuant l'énergie lumineuse déposée dans le milieu. On peut aussi de cette manière éviter l'autofluorescence émise dans le visible par les tissus.

Dans ce contexte, le nombre de groupe de recherche et de travaux expérimentaux portant sur les nanocristaux optiquement non-linéaires ont considérablement augmenté ces dernières années. En microscopie de SHG, plusieurs études indépendantes ont montré qu'il était relativement aisé de détecter individuellement des nanocristaux. Des mesures quantitatives indiquent aussi que les coefficients optiques non-linéaires des matériaux massifs et des nanocristaux varient peu d'un matériau à l'autre. D'autres critères, que ceux relatifs à la réponse optique, doivent donc être pris en considération afin de sélectionner « le meilleur » matériau en tant qu'agents de contraste pour la microscopie de SHG. La première raison pour

laquelle l'iodate de fer a retenu notre attention concerne ses propriétés paramagnétiques (contrairement aux matériaux mentionnés ci-dessus) pouvant être mises à profit pour l'IRM. Cela fait de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ une nanosonde multifonctionnelle pouvant générer un contraste en microscopie multiphotonique et en IRM. Par ailleurs, les applications de ces nanomatériaux dépendent très fortement de leur toxicité éventuelle (or les éléments Fe, I et O sont a priori adaptés) mais aussi des méthodes de synthèse qui doivent assurer une préparation reproductible des nanocristaux. Le bon contrôle de la taille et de la forme est en effet absolument nécessaire à une évaluation aussi précise que possible des propriétés physiques, chimiques et de cytotoxicité des nanomatériaux.

la polydispersité de taille et de forme a donc été l'une de nos préoccupations principales au cours de ce travail de thèse car la préparation de tous les oxydes non-centrosymétriques disponibles à ce jour est encore très mal maîtrisée, en comparaison avec les nanoparticules métalliques et semi-conductrices, par exemple. En ce qui concerne l'iodate de fer, des nanocristaux sont facilement obtenus par *co*-précipitation en solution aqueuse homogène à partir d'acide iodique et de nitrate de fer mais sans aucun contrôle de la morphologie. De plus, l'obtention de poudres agglomérées rend difficile leur stabilisation dans l'eau et toute modification possible de leur chimie de surface pour un marquage cellulaire spécifique. Enfin, l'approche microémulsion inverse conduit seulement à la formation de nano-bâtonnets et nanofils de diamètre 20 nm mais de longueur très variable en fonction des conditions de synthèse.

Dans ce manuscrit de thèse, la bibliographie se rapportant à la préparation et aux applications biomédicales des nanoparticules inorganiques est exposée au premier chapitre. Le travail expérimental associé à la synthèse des nanocristaux de $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ par microémulsions et miniémulsions inverses est ensuite rassemblé dans le chapitre II. Il est démontré, dans le cas des microémulsions, que l'ajout^{de} macromolécules de type polymères hydrosolubles permet d'obtenir soit des nanoparticules individuelles soit des microstructures hybrides de morphologie contrôlée mais de taille très variable. Différents polymères ont d'abord été examinées afin d'obtenir, par rapport aux applications visées, des nanocristaux sphériques de taille inférieure à 100 nm et de réduire les interactions organiques-inorganiques conduisant à l'apparition des nanofils. Des molécules courtes de polyéthylène glycol (PEG-400) ont été retenues en raison de la biocompatibilité de ce polymère et de premiers tests encourageants quant au diamètre, inférieur à 100 nm, des premières particules ainsi préparées. Par la suite, la variation systématique des compositions initiales des microémulsions a permis de décrire les

mécanismes (et les cinétiques) de croissance et de cristallisation du matériau. Dans des études précédentes sur le système ternaire eau/octane/AOT, il avait montré que l'interaction des molécules d'AOT à la surface des particules était à l'origine des difficultés rencontrées quant au contrôle de la taille et de la morphologie.

En revanche, en présence de PEG à une concentration aqueuse supérieure à 5g/L, il est possible, pour une faible teneur en eau ($w=5,8$), de diminuer les interactions entre les têtes chargées de l'AOT et la surface des nanoparticules primaires de telle sorte que des nanocristaux sphériques de diamètre ~ 15 nm ont été obtenus pour la première fois. On peut souligner le rôle coopératif des molécules d'AOT et de PEG puisque le tensioactif est nécessaire à la formation de micelles inverses alors que le PEG participe à une meilleure stabilisation stérique des nanocristaux tout en diminuant les interactions organiques-inorganiques. De plus, pour une quantité d'eau initiale plus importante ($w=12,2$), nous avons observé une augmentation importante de la cinétique globale incluant les étapes de coprécipitation, de nucléation et de cristallisation due à une flexibilité accrue du film de tensioactifs. Celui-ci ne joue plus son rôle de gabarit car des nano-bâtonnets, dont la croissance est dirigée selon l'axe polaire, apparaissent rapidement. Dans ce cas, l'AOT contribue à une inter-digitation des nano-bâtonnets de telle sorte que cette nucléation homogène résulte en micro-bouquets de nano-filaments puis en structures hybrides quasi-sphériques de type oursins. Cette auto-organisation, ou auto-assemblage, à l'échelle de 10-15 μ m permet de diminuer l'énergie d'interface entre le film de tensioactifs et la phase continue. Le PEG contribue à une augmentation de la dispersion spatiale des nanofilaments en raison de frustrations stériques plus importantes.

Ainsi, l'approche microémulsion permet d'obtenir soit des nanocristaux sphériques de 15 nm soit, après auto-organisation, des microstructures hybrides dont la taille n'est pas adaptée aux applications visées. Nous avons donc continué notre travail par une étude portant sur le procédé de miniémulsion, avec comme objectif la synthèse contrôlée de nanocristaux d'iodate de fer. Cette approche « miniémulsion » pour la synthèse de nanoparticules inorganiques est relativement peu exploitée et décrite dans la littérature, par rapport aux nombreux travaux basés sur les microémulsions inverses. La synthèse en miniémulsion présente pourtant des caractéristiques très intéressantes et bien adaptées aux problèmes rencontrés. En effet, les nanogouttelettes générées en miniémulsion sont très stables et cela permet d'éviter les phénomènes d'agrégation rencontrés en microémulsions inverses (sans ajout d'additifs) pendant la phase de cristallisation des nanoparticules. A partir de cette hypothèse, nous avons

développé un protocole de synthèse et nous avons démontré un contrôle effectif de la taille et de la morphologie des nanocristaux d'iodate de fer pour une certaine gamme de concentration en tensioactifs et en réactifs. Des nanocristaux sphériques de diamètre 70 nm ont ainsi été obtenus pour une concentration molaire en réactifs de $[\text{Fe}^{3+}]:[\text{IO}_3^-]$ de 0,1:0,4 M et une concentration en span 80 de 3wt.%. En dehors de cette gamme, c'est à dire lorsque la concentration en réactifs devient trop importante, ou la quantité de surfactant trop faible, la stabilité de la miniémulsion n'est certainement plus suffisante et des particules en forme de nanobâtonnets sont observées.

On peut noter enfin qu'une particule de 70nm est certainement mieux adaptée par rapport à une particule de 15 nm du point de vue des applications optique. En effet, le signal de second harmonique émis sera supérieur à la limite de détection des systèmes de microscopie multiphotonique actuels, ce qui n'est pas forcément le cas pour une particule de 15 nm.

Le chapitre III présente nos travaux portant sur l'encapsulation des nanocristaux SHG. Les enjeux sont, comme nous l'avons déjà rappelé, une protection des particules et une amélioration de leur stabilité et biocompatibilité. Cela constitue également une première étape en vue d'une fonctionnalisation pour des applications biomédicales spécifiques. Nous avons utilisé deux méthodes assez différentes pour atteindre cet objectif.

D'une part, nous avons poursuivi les travaux portant sur la technique de miniémulsion pour synthétiser des particules hybrides. Le principe de notre étude est de contrôler les étapes de cristallisation des nanoparticules et de polymérisation de l'HEMA afin d'obtenir des nanoparticules d'iodate de fer insérées dans une matrice polymérique de poly(HEMA-MBA)). Le poly(HEMA-MBA) est un polymère biocompatible hydrosoluble prometteur pour les applications biomédicales en raison de sa faible toxicité. On peut noter que cette synthèse simultanée des nanocristaux et de l'écorce polymérique constitue l'une des originalités de cette partie. Après une étude portant essentiellement sur la concentration en réactifs, nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des nanoparticules hybrides de type cœur-écorce. La cristallisation et la polymérisation ont lieu à l'intérieur des nanogouttelettes ce qui limite la croissance des nanoparticules inorganiques et des chaînes polymériques. Ces premiers résultats sont positifs et il serait intéressant poursuivre les études de manière systématique afin bien comprendre l'influence des différents paramètres impliqués dans la synthèse. La nature de l'agent stabilisant pourrait jouer un rôle dans le contrôle des caractéristiques des objets formés. Par conséquent, la synthèse de nanoparticules à base d'HEMA a été obtenue par divers agents stabilisants. En raison de leur nature polymérique, les copolymères à blocs se

sont avérés être les plus efficaces pour ce procédé de polymérisation car ils fournissent une stabilisation stérique maximale permettant un contrôle parfait des structures synthétisées.

Enfin, nous avons présenté dans la dernière partie de ce manuscrit les résultats de nos travaux portant sur l'encapsulation de nanocristaux de niobate de potassium par adsorption d'aminodextran. L'objectif était de rendre la surface de ces particules fonctionnelle et d'envisager un ciblage spécifique. Le procédé d'adsorption de ce polymère a été réalisé en phase aqueuse sans ajout de tensioactifs, ce qui est compatible avec les applications biomédicales *in vivo*. L'aminodextran est un polycationique, non disponible commercialement, qui est obtenu au LAGEG. Ces groupements cationiques s'adsorbent sur la surface des nanocristaux de niobate de potassium de charge opposée *via* des interactions électrostatiques attractives. L'adsorption de ce polymère sur les nanocristaux de niobate de potassium a été confirmée notamment par des mesures du potentiel zêta sur des nanocristaux nus (potentiel zêta négatif) et sur les nanoparticules hybrides finales (potentiel zêta positif). Cette modification de la surface favoriserait les interactions attractives avec les cellules vivantes. Les images de microscopie de second harmonique sur des cultures cellulaires « marquées » par les particules hybrides montrent leur localisation en périphérie des cellules. Ces images démontrent l'excellent contraste obtenu avec ces sondes.

Perspectives

(1) Encapsulation des nanocristaux d'iodate de fer : méthode alternative

Les nanoparticules sphériques d'iodate de fer présentées au Chapitre II ont été élaborées par le procédé de microémulsion inverse *via* l'ajout du PEG-400. Afin de permettre leur transfert en phase aqueuse, nous avons réalisé une étude préliminaire sur leur encapsulation par le procédé d'émulsification diffusion de solvant en utilisant un copolymère block polycaprolactone-polyéthylène glycol (PCL-*b*-PEG) synthétisé au laboratoire LAGEP.

En premier lieu, les nanoparticules colloïdales d'iodate de fer, issues des synthèses en microémulsions, ont été stockées dans l'acétate d'éthyle à +4°C. L'observation de ces cristaux par MET a montré une stabilité supérieure à un an et la possibilité de les réutiliser pour ces études.

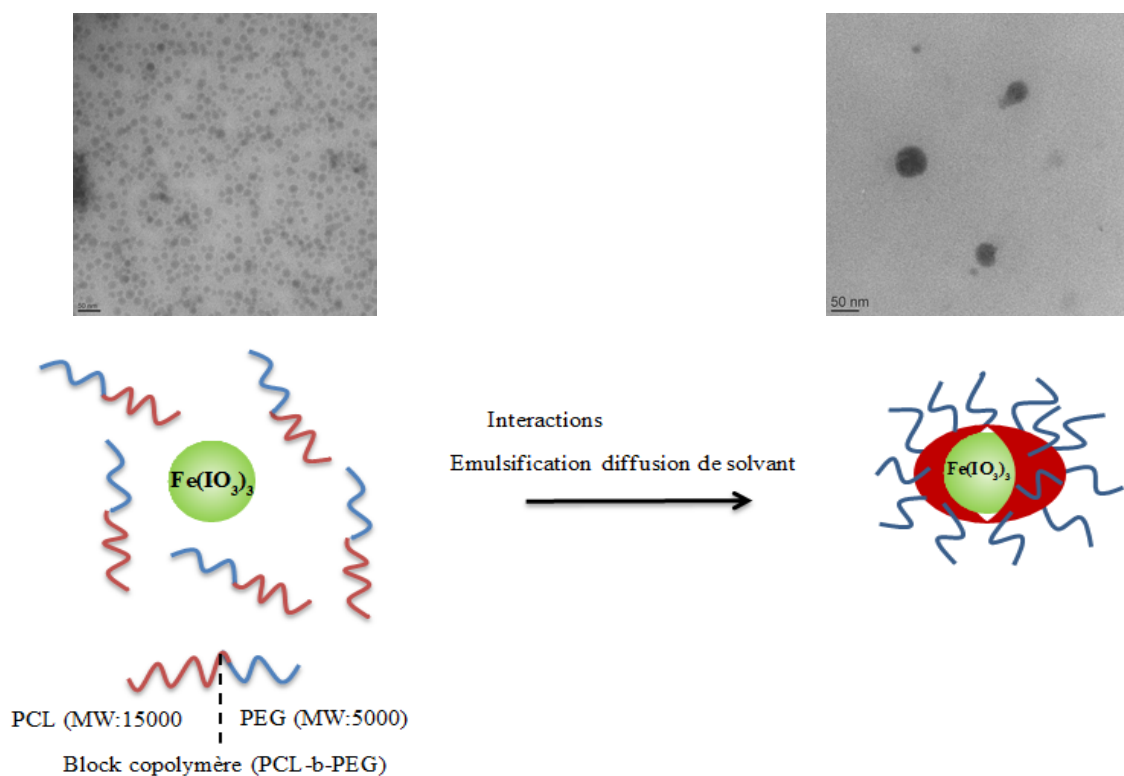


Figure P.23 : Illustration schématique du principe d'encapsulation des nanoparticules d'iodate de fer par le procédé d'émulsion diffusion.

La Figure P.1 illustre schématiquement le principe de formation des nanoparticules hybrides d'iodate de fer/PCL-*b*-PEG. Brièvement, le PCL-*b*-PEG a été solubilisé dans une phase organique (acétate d'éthyle saturé en eau) contenant des nanocristaux d'iodate de fer. Cette

phase organique a été émulsionnée dans une phase aqueuse (eau saturée en acétate d'éthyle) contenant un polymère stabilisant (Pluronic F68) à l'aide d'un ultraturax pendant 2 minutes à 17500 rpm. Une seconde phase aqueuse composée exclusivement d'eau a été ajoutée spontanément à l'émulsion. Le solvant organique a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Une suspension de couleur bleutée a été obtenue. Le produit final a été récupéré par lyophilisation avec l'ajout de 5%wt de Glucose. Un premier test de redispersion dans l'eau a été réalisé avec succès par simple agitation. Des nanoparticules hybrides de 50 nm de diamètres ont été observées par MET. Ces premiers tests sont encourageants et sont à poursuivre, en comparant notamment la stabilité de ces particules hybrides avec les particules d'iodate de fer nues.

(2) Fonctionnalisation des nanocristaux de $KNbO_3$ pour le ciblage et la détection d'amibes

La modification de la surface des nanoparticules hybrides de niobate de potassium a été conduite afin de greffer des groupements réactifs en surface. La surface des nanoparticules de niobate de potassium, enrobées par l'aminodextran, a été modifiée par greffage covalent du copolymère poly(méthyl vinyl éther-co-anhydride maléique) (AMVE). Ce copolymère possède des unités réactives d'intérêt, les anhydrides maléiques. La réaction chimique se produit entre les groupements amines à la surface des nanoparticules hybrides et les groupements anhydrides maléique de l'AMVE (cf. Figure P.2). La réaction a été réalisée dans le DMSO. Ce solvant organique empêche l'hydrolyse du copolymère et laisse la surface réactive après le couplage. Ceci rend envisageables d'autres réactions chimiques entre les groupements d'anhydride maléique et d'autres amines primaires, notamment celles d'oligonucléotides.

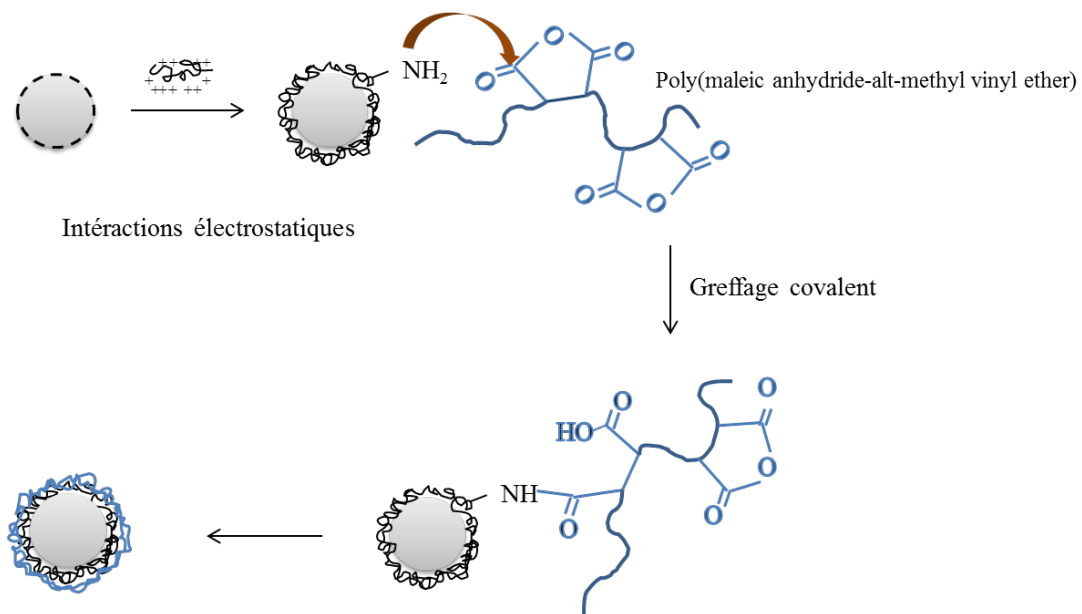


Figure P.24 : Illustration schématique de l'encapsulation et modification de la surface des nanoparticules de KNbO₃

Des essais en imagerie pour la détection spécifique d'amibes sont en cours de développement au laboratoire CARTELE.

Annexe 1 : Informations supplémentaires de la synthèse des nanocristaux d'iodate de fer par miniémulsion inverse (Chapitre III).

Supporting Information

To investigate the effect of reactants (Fe^{3+} and IO_3^-) concentration on the properties of the prepared $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid particles, the MBA/HEMA weight ratio was fixed at 20%, then two different concentrations of the reactants at the same $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{IO}_3^-]$ molar ratio (sample a, and b) were used as shown in Table 4.

Table 4. Effect of $[\text{Fe}^{3+}]$ and $[\text{IO}_3^-]$ on $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid nanoparticles formation

Sample code	HEMA, g	MBA, g	$[\text{Fe}^{3+}]$, M	$[\text{IO}_3^-]$, M
a	0.08	0.016*	0.0075	0.03
b	0.08	0.016	0.025	0.10

At low reactants concentration (Sample a), $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid nanoparticles exhibited spherical core-shell morphology, as evidenced by the TEM image in Figure 12 (a). The core consists of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ inorganic nanoparticles and the shell composed of the organic crosslinked poly(HEMA). In addition, they have hydrodynamic size less than 100 nm. Interestingly, by increasing the amount of the reactants to three folds ($[\text{Fe}^{3+}]/[\text{IO}_3^-]$ molar ratio= 0.025/0.1) (sample b), two morphologies were obtained; sphere-like and rod-like hybrid nanoparticles (Figure 12 (b)). Although the rod-like morphology was formed³³, the sphere-like hybrid nanoparticles were predominant which can be attributed to the nuclei formation inside the nanodroplets, followed by formation of the crosslinked poly(HEMA). The growing process of the particles is limited by the size of the formed nanodroplets and also by the crosslinking density of the formed polymer matrix. On the other hand, the formation of the rod-like structure can be attributed to the possible nucleation of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ particles out of nanodroplets.

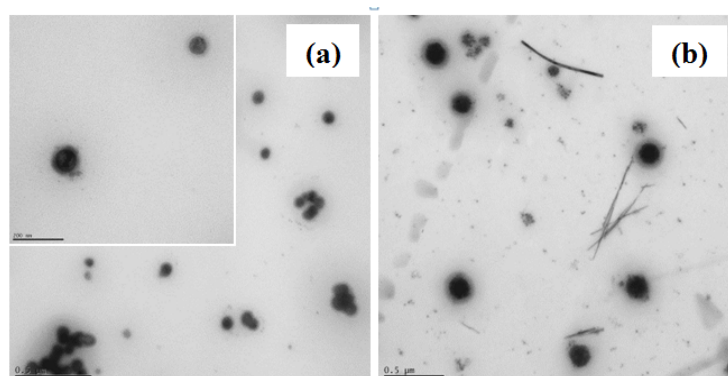


Figure 10. TEM micrographs of $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ hybrid nanoparticles using 0.08 g of HEMA at different $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{IO}_3^-]$ molar ratios ; (a) 0.0075:0.03/, (b) 0.025:0.1. (Scale bar is 500 nm).

It is worth to mention that the weight percentage of crosslinking agent has significant effect on the physico-chemical properties of the obtained particles. In addition, the increase in the crosslinking agent leads generally to high polymerization conversion, rapid polymerization kinetic and high crosslinking density of the formed polymer matrix³⁷.

In this context, MBA crosslinking agent was examined at two different MBA/HEMA weight ratios (5 and 20wt %), as reported in Table 3. The formed inorganic nanoparticles should be homogeneously encapsulated in the crosslinked polymer shell. But both free Fe(IO₃)₃ and the encapsulated one are observed irrespective of MBA amount.

Listes des figures

Figure I.1: Représentation des variations de l'énergie libre d'un système (reproduit par Mullin ⁶)	14
Figure I.2: Diagramme La Mer ⁷	14
Figure I.3 : Représentation des phénomènes de croissance par diffusion.....	15
Figure I.4: Représentation schématique des processus de déstabilisation	16
Figure I.5: Illustration schématique du phénomène de mûrissement d'Ostwald.	17
Figure I.6: Illustration schématique de la structure d'un tensioactif (a), d'une micelle inverse (eau dans huile) (b) et directe (huile dans eau) (c).....	19
Figure I.7: Structure chimique de l'AOT (a) et du CTAB (b)	20
Figure I.8: Structure chimique du Span 80 (a) et C ₁₂ E ₄ (b).....	20
Figure I.9: Schéma représentatif de la formation des micelles en fonction de la concentration en tensioactifs.	21
Figure I.10 : Schéma représentant différents systèmes d'auto-assemblage de tensioactifs ¹⁸ . .	22
Figure I.11 : Diagramme de phase théorique pour des systèmes de microémulsion	23
Figure I. 12: structure d'une micelle inverse.....	24
Figure I.13: Mécanisme de Formation de précipitation dans la micelle inverse.....	25
Figure I.14 : Représentation schématique d'un dimère formé après collision de deux gouttelettes.	26
Figure I.15 : Schéma de la formation de la miniémulsion par ultrason.	30
Figure I.16 : Représentation schématique du copolymère block amphiphile employé pour la miniémulsion inverse ⁶¹	31
Figure I.17 : représentation schématique de la formation des nanoparticules d'iodate de fer par la méthode de microémulsion inverse et miniémulsion inverse	32