

## Liste d'abréviations

AOT :	Diocyl sulfosuccinate de sodium
$\rho$ :	Densité (kg/m <sup>3</sup> )
A549 :	Cellule pulmonaire
AL-C <sub>10</sub> :	(R)-N-décyl-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide
AL-C <sub>18</sub> :	(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-octadécylpentanamide
AL-F <sub>3</sub> :	(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(2,2,2-trifluoroéthyl)pentanamide
AL-F <sub>5</sub> :	(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)pentanamide
AL-F <sub>7</sub> :	(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutyl) pentanamide
AL-PEG <sub>12</sub> -OMe :	(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(méthoxypolyéthylène glycol 550) pentanamide
AL-PEG <sub>17</sub> -OMe :	(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(méthoxypolyéthylène glycol 750) pentanamide
AL-PEG <sub>23</sub> -OMe :	(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(méthoxypolyéthylène glycol 1000) pentanamide
AL-PEG <sub>45</sub> -OMe :	(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(méthoxypolyéthylène glycol 2000) pentanamide
AL-PEG <sub>8</sub> -OMe :	(R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(méthoxypolyéthylène glycol 350 ) pentanamide
APTES :	(3-Aminopropyl)triéthoxysilane
APTS :	Acide paratoluènesulfonique
Aq :	Aqueux
BAL :	2,3 dimercapto-1-propanol
Bi4f <sub>5/2</sub> :	Electron de l'orbital 4f
Bi4f <sub>7/2</sub> :	Electron de l'orbital 4f
C <sub>max</sub> :	Concentration maximum en atome métallique dans la solution
CMC :	Carboxyméthylcellulose
C <sub>min</sub> :	Concentration minimum de nucléation
C <sub>n</sub> :	Chaine carbonée de longueurs variables
Cnam :	Conservatoire National des Arts et Métiers
C <sub>s</sub> :	Concentration de saturation en atome métallique dans la solution
CTAB :	Bromure hexadécyl triméthyle ammonium
DCC :	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM :	Dichlorométhane
DCU :	Dicyclohexylurée
DIPB :	Di-isopropylbenzène
DLS :	Diffusion dynamique de la lumière
DLVO :	Derhaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DMAP :	4-diméthylaminopyridine
DMF :	Diméthylformamide



DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DOSY :	Diffusion ordered spectroscopy
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
EPA :	Agence de protection de l'environnement américain
équiv. :	Equivalent
F127 :	Fluronic 127
F <sub>n</sub> :	Chaîne polyfluorée de longueurs variables
H/E :	Huile dans l'eau
HPLC :	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HT29 :	Cellule humaine du colon
ICP :	Spectrométrie à plasma à couplage inductif
LCP :	Laboratoire de Chimie Physique
LDH :	Lactate déshydrogénase
m/m :	Rapport massique
MeO-PEG <sub>n</sub> -OH :	Méthoxypolyéthylène glycol de longueurs variables
MHA :	Acide 6-mercaptohexanoïque
M <sup>nanoparticule</sup> :	Masse moléculaire de la nanoparticule
n :	Nombre de moles d'atomes
MTT :	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
N :	Nombre de nanoparticules
N.D. :	Non déterminé
N <sub>A</sub> :	Nombre d'avogadro
n <sub>ligand</sub> :	Nombre de ligands adsorbé sur la nanoparticule
P123 :	Poloxamère 123
PEG :	Polyéthylène Glycol
PFOB :	Bromure de perfluorooctyl
PHV-co-PVP :	Copolymère poly(1-hexadécène-co-1-vinylpyrrolidone)
PLGA :	Poly(lactide-co-acide glycolique)
PMMA :	Polyméthylméthacrylate
PPG :	Polypropylène glycol
PSS :	Polysulfonate-4-styrène de sodium
PVP :	Polyvinylpyrrolidone
r <sub>Bi</sub> :	Rayon atomique de bismuth
rdt :	Rendement
RMN :	Résonnance magnétique nucléaire
r <sub>sphère</sub> :	Rayon des nano sphères



SDS :	Dodécylsulfate de sodium
SEM :	Microscopie électronique à balayage
SOA :	Oléate de sodium
T :	Température
t :	Temps
t.a. :	Température ambiante
TEM :	Microscopie électronique en transmission
TEOS :	Tétraéthoxysilane
TGA :	Analyse thermogravimétrie
THF :	Tétrahydrofurane
THP1 :	Monocytes
TOP :	Trioctylphosphine
TOPO :	Oxyde de trioctylphosphine
Uf :	Ultrafiltration
UV :	Ultra-violet
V <sub>A</sub> :	Potentiel d'interaction attractive
V <sub>R</sub> :	Potentiel d'interaction répulsive
V <sub>T</sub> :	Potentiel d'interaction total
XPS :	Spectrométrie photo électronique X
XRD :	Diffraction de rayon X
Z	Numéro atomique



## Liste de produits chimique

AcOEt	Acétate d'éthyle
$(\text{AgI}_4)^{3-}$ :	Iodure d'argent
$[\text{Ag}(\text{CN}_3)^{3-}$ :	Cyanure d'argent
$[\text{Ag}(\text{SO}_3)_2]^{3-}$ :	Sulfure d'argent
Ag :	Argent
$\text{Ag}^+$ :	Ion argent +
AgAc :	Acétate d'argent
$\text{AgNO}_3$ :	Nitrate d'argent
Bi(0) :	Bismuth métallique
$\text{BiAc}_3$ :	Acétate de bismuth
$\text{Bi}(\text{Cl})_3$ :	Chlorure de bismuth
Bi(III) :	Ion bismuth 3+
$\text{Bi}(\text{N}(\text{SiMe}_3))_2$ :	Tris(triméthylsilyl)amide de bismuth
$\text{Bi}(\text{NO})_3$ :	Nitrate de bismuth
$\text{Bi}(\text{OH})_3$ :	Hydroxyde de bismuth
$\text{Bi}(\text{SC}_{12}\text{H}_{25})_3$ :	Dodécanthiolate de bismuth
$\text{Bi}_2(\text{CO}_3)_3$ :	Carbonate de bismuth
$\text{Bi}_2\text{Et}_4$ :	tétraéthyl dibismuthine
$\text{Bi}_2\text{O}_3$ :	Oxyde de bismuth
BiCit :	Citrate de bismuth
$\text{BiI}_3$ :	Iodure de bismuth
$\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_n-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ :	Amino polyfluoré de longueurs variables
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ :	Amino alcane de longueurs variables
$\text{CH}_3\text{CN}$ :	Acétonitrile
Co :	Cobalt
$\text{CO}_2$ :	Dioxyde de carbone
$e^-_{\text{hyd}}$ :	Électron hydraté
EtOH :	Éthanol
$\text{H}_2\text{O}$ :	Eau
$\text{H}_2\text{O}^*$ :	Eau à l'état excité
$\text{H}_2\text{PtCl}_6$ :	Acide chloroplatinique
$\text{HAuCl}_4$ :	Acide chloraurique
HCl :	Acide chlorhydrique
$\text{HfO}_2$ :	Oxyde de l'hafnium



$\text{HNO}_3$ :	Acide nitrique
$\text{KOH}$ :	Hydroxyde de potassium
$\text{Li}(\text{N}(\text{SiMe}_3))_2$ :	Tris(triméthylsilyl)amide de lithium
$\text{LiOH}$ :	Hydroxyde de lithium
$\text{MeOH}$ :	méthanol
$\text{MeO-PEG}_{12}\text{-N}_3$ :	Azido de polyéthylène glycol méthyl éther 550
$\text{MeO-PEG}_{12}\text{-NH}_2$ :	Amino-polyéthylène glycol méthyl éther 550
$\text{MeO-PEG}_{12}\text{-OH}$ :	Méthoxypolyéthylène glycol 550
$\text{MeO-PEG}_{12}\text{-OTs}$ :	Tosylate de polyéthylène glycol méthyl éther 550
$\text{MeO-PEG}_{17}\text{-N}_3$ :	Azido de polyéthylène glycol méthyl éther 750
$\text{MeO-PEG}_{17}\text{-NH}_2$ :	Amino-polyéthylène glycol méthyl éther 750
$\text{MeO-PEG}_{17}\text{-OH}$ :	Méthoxypolyéthylène glycol 750
$\text{MeO-PEG}_{17}\text{-OTs}$ :	Tosylate de polyéthylène glycol méthyl éther 750
$\text{MeO-PEG}_{23}\text{-N}_3$ :	Azido de polyéthylène glycol méthyl éther 1000
$\text{MeO-PEG}_{23}\text{-NH}_2$ :	Amino-polyéthylène glycol méthyl éther 1000
$\text{MeO-PEG}_{23}\text{-OH}$ :	Méthoxypolyéthylène glycol 1000
$\text{MeO-PEG}_{23}\text{-OTs}$ :	Tosylate de polyéthylène glycol méthyl éther 1000
$\text{MeO-PEG}_8\text{-N}_3$ :	Azido de polyéthylène glycol méthyl éther 350
$\text{MeO-PEG}_8\text{-NH}_2$ :	Amino-polyéthylène glycol méthyl éther 350
$\text{MeO-PEG}_8\text{-OH}$ :	méthoxypolyéthylène glycol 350
$\text{MeO-PEG}_8\text{-OTs}$ :	Tosylate de polyéthylène glycol méthyl éther 350
$\text{Na}(\text{N}(\text{SiMe}_3))_2$ :	Tris(triméthylsilyl)amide de sodium
$\text{Na}_3\text{Cit}$ :	Citrate de sodium
$\text{NaBH}_4$ :	Tétrahydruoborate de sodium
$\text{NaBiCit}$ :	Citrate de bismuth et de sodium
$\text{NaCl}$ :	Chlorure de sodium
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :	Dihydrogénophosphate de sodium
$\text{NaN}_3$ :	Azoture de sodium
$\text{NaOH}$ :	Hydroxyde de sodium
$\text{NH}_3$ :	Ammoniac
$(\text{NH}_3)_3\text{Bi}(\text{Cit})_2$ :	Citrate de bismuth et d'ammonium
$\text{Ni}$ :	Nickel
$\text{HO}^\bullet$ :	Radical hydroxyle
$\text{PdCl}_2$ :	Chlorure de palladium
$\text{PPh}_3$ :	Triphénylphosphine
$\text{RhCl}_3$ :	Chlorure de rhodium



$\text{RuCl}_3$ :	Chlorure de ruthélium
tBuONa :	Tert-butoxy de sodium



## Liste des unités

°C :	Température celsius
μm :	Micromètre
μS :	Micro siemens
BST :	Transmission du laser incident
cm :	Centimètre
cm <sup>-1</sup> :	Nombre d'ondes
Da :	Dalton
eV :	Électron volt
Gy :	Gray
h :	Constante de Planck
h :	Heure
J :	Joule
kg :	kilogramme
M :	Molaire
m :	Mètre
m <sup>2</sup> /s :	Mètre au carré par seconde
m <sup>3</sup> :	Mètre au cube
mg :	Milligramme
min :	Minute
mL :	Millilitre
mL/min :	Millilitre par seconde
mm :	Millimètre
mM :	Millimolaire
mol :	Mole
MPa :	Méga pascal
mV :	Milli volt
nm :	Nanomètre
nm <sup>2</sup> :	Nanomètre carré
Osm :	Osmole
ppm :	Parties par millions
Psi :	Pound per square inch
s :	Seconde
tr/min :	Tours par minutes
v :	Fréquence de rayonnement



W : Watt



## Sommaire

Liste d'abréviations .....	7
Liste de produits chimique.....	10
Liste des unités .....	13
Introduction générale.....	17
1 Les nanoparticules .....	19
2 Synthèses de nanoparticules de bismuth métallique décrite dans la littérature.....	30
3 Incorporation des nanoparticules dans des émulsions .....	52
4 Utilisation des nanoparticules pour la radiosensibilisation.....	57
5 Présentation du manuscrit .....	64
Chapitre 1 : Optimisation de la synthèse en procédé non continu .....	65
1 Optimisation de la synthèse des nanoparticules de bismuth métallique en procédé non continu .....	68
2 Caractérisations des nanoparticules obtenues suite à l'optimisation de la synthèse en procédé non continu .....	85
3 Conclusion.....	93
Chapitre 2 : du procédé non continu au procédé continu .....	97
1 Introduction .....	99
2 Synthèse millifluidique de nanoparticules de bismuth métallique .....	104
3 Conclusion.....	134
Chapitre 3 : Fonctionnalisation des nanoparticules .....	138
1 Préambule.....	140
2 Stabilisation des nanoparticules dans le sérum physiologique.....	141
3 Conclusion.....	188
Chapitre 4 : Formulation des émulsions incorporant des nanoparticules .....	191
1 Introduction .....	193
2 Émulsions hydrophobes stabilisées par des phospholipides .....	193
3 Émulsions hydrophobes stabilisées par le poloxamère 188.....	204
4 Émulsions perfluorées stabilisées par des phospholipides.....	213
5 Conclusion.....	216
Chapitre 5 : Evaluation de la cytotoxicité et des effets radiosensibilisants des nanoparticules.....	219
1 Evaluation de la cytotoxicité .....	221
2 Evaluation des effets radiosensibilisants.....	223



3	Conclusion.....	240
	Conclusion générale.....	244
	Material & Methods.....	250
1	Material & methods: Material of organic synthesis .....	252
2	Material & methods : Nanoparticles characterisations .....	253
3	Material & methods : Protocols.....	257
	Références .....	280
	Annexes.....	303



# Introduction générale







## 1 Les nanoparticules

Selon la norme ISO/TS 80004-1, un nanomatériau est un matériau dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique c'est-à-dire comprise approximativement entre 1 et 100 nm ou qui possède une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique.<sup>1</sup>

Dans la famille de nanomatériaux, on définit les nanoobjets comme étant des matériaux dont une, deux ou trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique c'est-à-dire approximativement entre 1 et 100 nm. Plus précisément, les nanoparticules sont définies par la norme ISO/TS 80004-2:2015 comme étant des nanoobjets dont toutes les dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et dont les longueurs du plus grand et plus petit axe ne diffèrent pas de façon significative.<sup>2</sup>

Les nanoparticules peuvent être synthétisées selon deux stratégies différentes. On différencie la méthode dite « ascendante » (en anglais bottom-up) de la méthode dite « descendante » (en anglais top-down). Ces deux stratégies sont illustrées dans la figure 1.

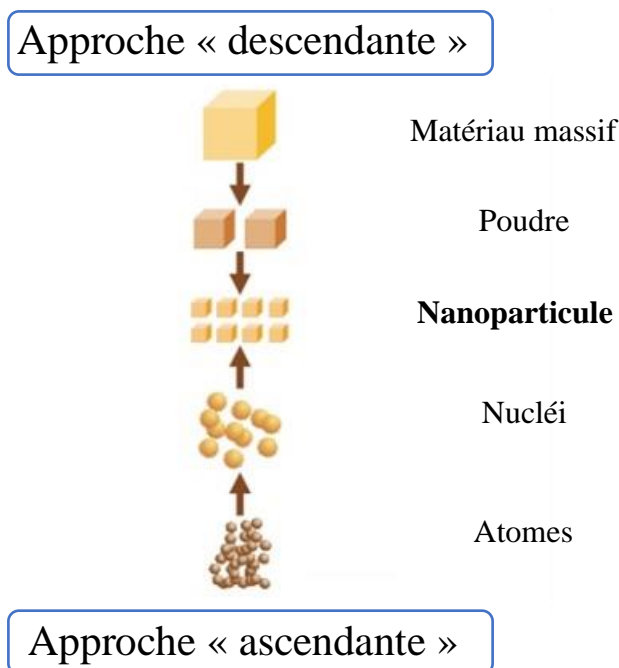


Figure 1: Stratégies ascendante et descendante d'obtention de nanoparticules.

- L'approche « ascendante » consiste à construire les nanoparticules atome par atome. L'assemblage ou le positionnement des atomes s'effectue de façon contrôlée et exponentielle, permettant ainsi l'élaboration de nanoparticules dont la structure est maîtrisée. Cette approche pose souvent des problèmes de reproductibilité notamment lors de la montée en échelle.



- L'approche « descendante » consiste à sous-dimensionner ou à fractionner graduellement un matériau jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques *via* des technologies de mécanosynthèse. Ces technologies permettent de produire de grande quantité de nanoparticules.

### 1.1 Chimie verte appliquée à la nanochimie

La chimie verte ou chimie durable est basée sur douze principes qui permettent notamment de réduire, voire d'éliminer l'usage ou la génération de substances néfastes pour l'environnement. Ces douze principes de la chimie verte publiés en 1998 par les chimistes américains Paul Anastas et John C. Warner,<sup>3</sup> appartenant à l'EPA (Environmental Protection Agency) s'appliquent essentiellement aux synthèses moléculaires organiques. Plus récemment, ils ont été adaptés à d'autres domaines de la chimie : le génie chimique<sup>4</sup> mais aussi la nanochimie.<sup>5,6</sup> Ainsi, les douze principes de chimie verte ont été réorganisés en six principes pour la nanochimie. Ces six principes de nanochimie verte seront illustrés sur la Figure 2.

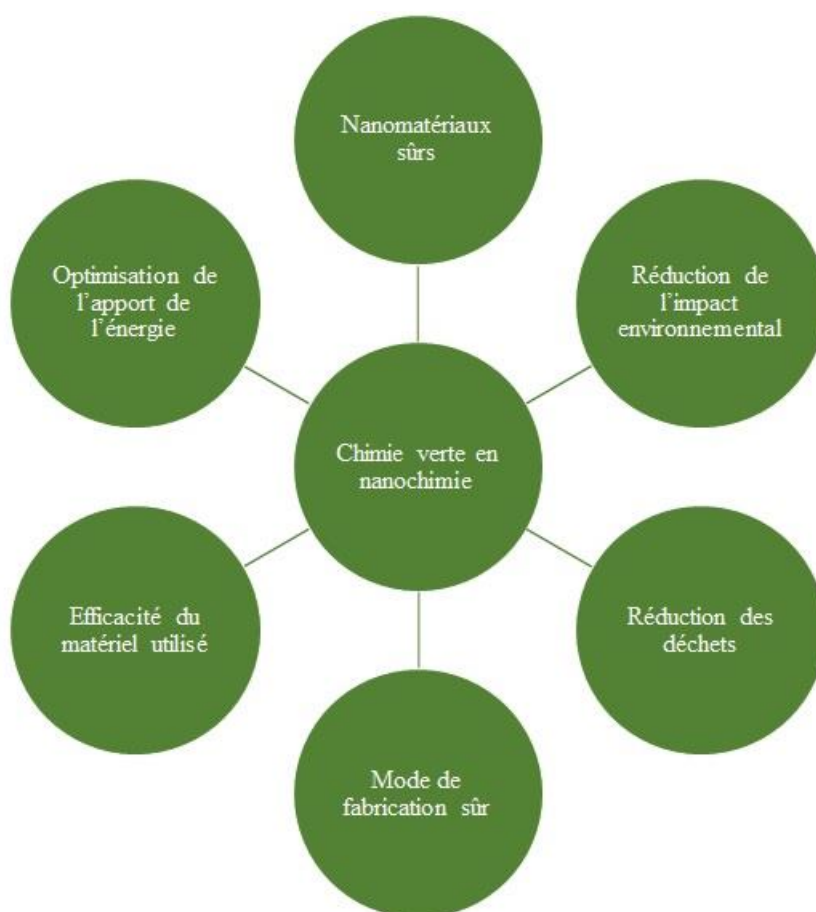


Figure 2: Les six principes de la nanochimie verte.

Tout comme pour les douze principes de la chimie verte, la nanochimie verte se doit de respecter si possible l'ensemble de ces six principes.



### ➤ Utilisation de nanomatériaux sûrs

Ce concept de nanomatériaux sûrs doit tenir compte de tout le cycle de vie du nanomatériau de sa conception à sa dégradation en passant par son utilisation. Le nanomatériau doit être conçu en utilisant des réactifs mais aussi des solvants non-toxiques. Ensuite, les caractéristiques physicochimiques du nanomatériau comme son diamètre, sa forme et sa composition surfacique doivent être étudiés pour appréhender une éventuelle toxicité et notamment sa capacité à passer les barrières biologiques. Il est aussi nécessaire de concevoir des nanomatériaux en intégrant les préoccupations liées à leur fin de vie (réutilisation ou dégradation).<sup>5</sup>

### ➤ Réduction de l'impact environnemental

L'impact du nanomatériau sur l'environnement doit être minimisé. Ainsi dans la phase de conception, on privilégiera l'utilisation de réactifs et de solvants éco-compatibles et éventuellement issus de sources renouvelables. Les quantités de solvants et d'eau utilisés dans le procédé seront aussi minimisées. Idéalement, le cycle de dégradation du nanomatériau doit être connu et son impact sur l'environnement doit être étudié.<sup>5,6</sup>

### ➤ Réduction des déchets

La diminution des déchets générés par la synthèse de nanomatériaux peut se réaliser notamment en minimisant le nombre d'étapes ou de produits auxiliaires comme les solvants. L'optimisation du rendement de formation des nanoparticules est un élément essentiel pour réduire les déchets et la formation d'impuretés. L'optimisation des techniques de purification des nanoparticules est aussi un point clef pour satisfaire ce principe.<sup>5</sup>

### ➤ Mode de fabrication sûr

La sécurisation des procédés de fabrication des nanoparticules est un point clef pour minimiser les dangers. L'idée étant de s'affranchir des conditions réactionnelles dures (hautes températures ou hautes pressions par exemple).<sup>5</sup> Les procédés en flux continu font partie des solutions intéressantes pour sécuriser un procédé (voir infra).



### ➤ Efficacité du matériel utilisé

Afin d'assurer des synthèses reproductibles, un contrôle qualité et en temps réel doit être mis en place afin de pouvoir identifier toutes dérives possibles du procédé.<sup>5</sup> L'efficacité et la productivité des techniques de purification est aussi un point essentiel à étudier.

### ➤ Optimisation de l'apport d'énergie

Le développement de conditions de synthèse et de purification moins coûteuses en énergie est également important. L'utilisation de méthode de chauffage telle que les microondes ou de procédés continus (optimisant les transferts thermiques) en lieu et place du chauffage thermique conventionnelle sont développés pour minimiser la consommation énergétique.

### ➤ Conclusion en termes de conception pour ce travail de thèse

Dans ce travail, la préparation de nanoparticules de bismuth métallique a été conçue pour être la plus verte possible en essayant de développer une synthèse respectant au mieux et simultanément les six principes commentés ci-dessus. Nous avons opté pour une stratégie de synthèse ascendante car elle nous permet de mieux contrôler les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules et est probablement moins coûteuse en énergie et plus respectueuse in fine des six principes de la nanochimie verte qu'une stratégie descendante.<sup>5</sup>

Avant de décrire les différentes synthèses de nanoparticules de bismuth métallique issues de la littérature, nous allons discuter de la théorie décrivant les mécanismes de formation des nanoparticules.

## 1.2 *Processus de formation des nanoparticules*

### 1.2.1 *Etape de formation des nanoparticules métalliques*

La formation des nanoparticules métalliques par une stratégie ascendante est classiquement divisée en quatre étapes décrites sur la figure 3 :

- La réaction rédox
- L'étape de nucléation
- La croissance
- L'agrégation



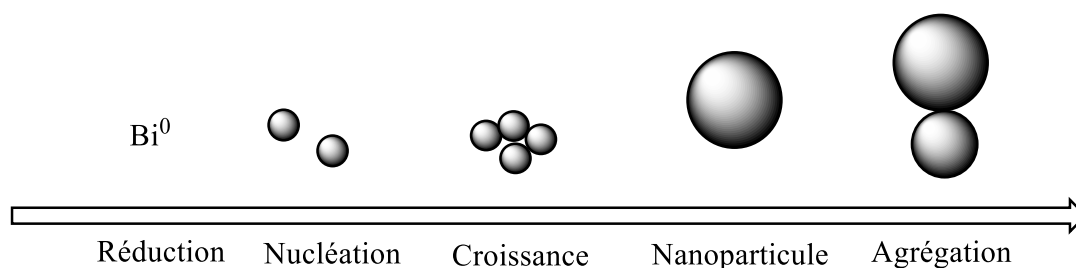


Figure 3: Etapes de formation des nanoparticules : la réduction, la nucléation, la croissance et puis l'agrégation.

Ce mécanisme de formation des nanoparticules est complexe de par les nombreux paramètres susceptibles d'intervenir dans ces différentes étapes. De ce fait, il est difficile voire impossible de prédire le diamètre, la distribution et la forme des nanoparticules synthétisées dans des conditions données. L'expérimentateur est donc obligé de balayer les différents paramètres expérimentaux pour optimiser les caractéristiques des nanoparticules.

#### ➤ La réaction d'oxydo-réduction

Cette réaction consiste en un transfert d'électron du réducteur vers le cation métallique oxydé. Pour que la réaction d'oxydo-réduction est lieu, une différence significative du potentiel d'oxydo-réduction entre les deux couples Ox/Red est nécessaire.

Couple rédox	$E_0$ (V)
$\text{Ag}^+/\text{Ag}^0$	+0.799
$[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+/\text{Ag}^0$	+0.38
$[\text{Ag}(\text{SO}_3)_2]^{3-}/\text{Ag}^0$	+0.29
$(\text{AgI}_4)^{3-}/\text{Ag}^0$	0.09
$[\text{Ag}(\text{CN})_3]^{3-}/\text{Ag}^0$	-0.51

Tableau 1: Variation du potentiel redox selon le ligand de complexation.

De plus, comme montré dans le tableau 1, les potentiels rédox sont très différents entre l'ion seul ou complexé et selon le contre ion présent (Tableau 1). Ces paramètres devront donc être pris en compte pour choisir le sel précurseur au départ de la synthèse des nanoparticules ainsi que le réducteur pour obtenir une réduction complète en espèces métalliques.

#### ➤ La nucléation

La théorie de la nucléation et de la croissance des nanoparticules est décrite classiquement par la théorie de LaMer.<sup>7</sup> Trois seuils de concentration en réactifs sont introduits dans cette théorie (Figure 4).



## Introduction générale

- $C_s$  : concentration de saturation en atome métallique dans la solution.
- $C_{min}$  : concentration minimum de nucléation.
- $C_{max}$  : concentration maximum en atome métallique dans la solution.

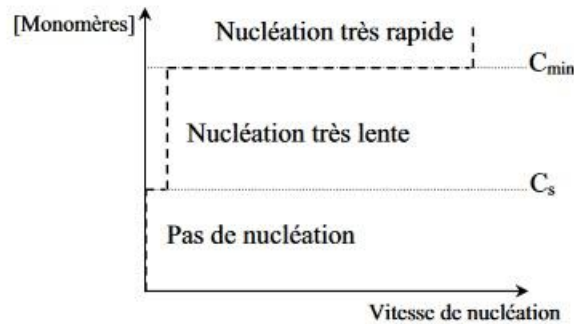


Figure 4: Concentrations  $C_s$  et  $C_{min}$  en fonction de la vitesse de nucléation.

Sous un certain seuil ( $C_s$ ), aucune nucléation n'est observée. Au-dessus de la  $C_s$ , la réaction de nucléation est possible mais reste très lente. Il faut atteindre la  $C_{min}$  pour que la vitesse de nucléation soit rapide. Ainsi quand la  $C_{min}$  est atteinte ( $C_{min} > C_s$ ), des nucléi se forment en un temps très court. Au cours de la réaction de nucléation, la concentration en atomes métalliques en solution baisse (car consommés dans les nucléi) en dessous de la concentration minimum de nucléation  $C_{min}$  et l'étape de nucléation s'arrête (ou devient très lente).<sup>8</sup>

La nucléation est un phénomène très difficile à étudier expérimentalement car les variations de vitesse sont très brusques et dépendantes des concentrations qui varient rapidement.

### ➤ La croissance

Dans la phase de croissance, les nucléi formés vont croître pour se stabiliser. Dans cette étape, les atomes métalliques vont se lier sur les nucléi déjà formés. La croissance peut se poursuivre tant que la concentration en atome métallique reste supérieure à la concentration de saturation ( $C_s$ ) (Figure 5).



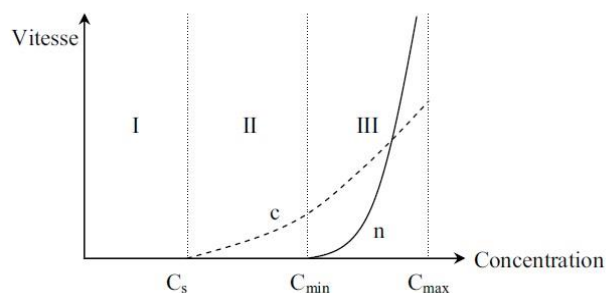


Figure 5: Vitesses de nucléation ( $n$ ) et de croissance ( $c$ ) en fonction de la concentration du précurseur en solution.

Lors de cette étape de croissance, l'utilisation d'un agent de revêtement peut permettre de limiter la croissance et/ou d'empêcher l'agrégation.

### ➤ L'agrégation

Quand les nanoparticules primaires sont obtenues, elles ne sont pas forcément stables d'un point de vue thermodynamique. Si cette instabilité est avérée, les nanoparticules vont évoluer *via* des phénomènes d'agrégation. Ce phénomène d'agrégation provoque une diminution de l'interface et donc stabilise le système d'un point de vue thermodynamique.

Afin de mieux contrôler et éventuellement découpler les étapes de nucléation et de croissance des nanoparticules et d'améliorer leur distribution en taille, des synthèses ont été développées en utilisant notamment le chauffage sous irradiation microondes et des procédés en flux continu.

### 1.2.2 Synthèses des nanoparticules sous irradiation microondes et flux continu

Pour obtenir des nanoparticules monodisperses, il est important que tous les nucléi se forment et se développent dans un environnement chimique homogène. Le contrôle des paramètres comme la pression, la température, la concentration du milieu réactionnel est donc primordial.

#### 1.2.2.1 L'utilisation du chauffage sous irradiation microondes

Le chauffage thermique conventionnel repose sur le transfert de chaleur par convection et conduction ce qui provoque des inhomogénéités de transfert thermique dans la solution. Les gradients thermiques provoquent des processus de nucléation inhomogènes.

A l'inverse, le chauffage sous irradiation microondes permet de chauffer un mélange réactionnel de manière très homogène et très rapide *via* les mécanismes de polarisation



dipolaire et de conduction ionique. La polarisation dipolaire est due à la rotation des molécules polaires sur elles-mêmes pour s'aligner sur le champ électrique alternatif de l'appareil. La conduction ionique produit quant à elle l'oscillation des ions en interaction avec les ondes et induit des collisions entre molécules. Ces deux phénomènes provoquent une dissipation d'énergie sous forme de chaleur.

Outre cet apport d'un transfert thermique homogène, l'utilisation du chauffage sous irradiation microondes va avoir d'autres influences sur la formation des nanoparticules.<sup>9</sup>

- Les cinétiques de nucléation et de croissance sont augmentées mais aussi la dissolution des réactifs ce qui peut avoir un impact sur le diamètre, la forme et la polydispersité des nanoparticules.
- Les phénomènes de nucléation sur les parois du réacteur sont quant à eux limités grâce aux effets microondes en comparaison au chauffage thermique conventionnel où la formation de nucléi peut apparaître sur les parois chaudes du réacteur.
- Des effets de chauffage sélectif peuvent aussi être observés. En effet, l'absorption de l'énergie des ondes microondes est dépendante du matériau ce qui induit un chauffage des espèces possédant les propriétés d'absorption les plus élevées.
- Des effets non thermiques sont aussi produits. Il s'agit d'accélération de cinétique qui ne peuvent pas être rationalisées par des effets purement thermiques ou par des effets spécifiques. Ces effets seraient liés à une interaction directe du champ électrique microonde avec des molécules ou des matériaux spécifiques dans le milieu réactionnel sans produire d'effet de température macroscopique. L'existence de ces effets en synthèse organique est fortement remise en cause et est attribuée à des mesures incorrectes de la température réactionnelle.<sup>10</sup> Dans le cadre de la synthèse de nanoparticules, l'existence de ces effets n'est pas clairement démontrée et fait toujours l'objet de controverses scientifiques.<sup>9</sup>

Deux inconvénients peuvent néanmoins être mentionnés concernant l'utilisation du chauffage sous irradiation microondes :

- Le coût élevé des réacteurs microondes dédiés qui peuvent facilement représenter plusieurs dizaines de milliers d'euro.
- La faible profondeur de pénétration de l'onde microonde dans le milieu liquide qui limite la taille des réacteurs et constitue un problème pour la montée en échelle.



### 1.2.2.2 Procédé en flux continu

L'utilisation d'un procédé en flux continu permet d'améliorer la monodispersité des nanoparticules par rapport à un procédé non continu. En effet, les procédés en flux permettent d'améliorer à la fois les transferts de matière (capacité de mélange des réactifs dans un délai très rapide) et les transferts de chaleur (possibilité de contrôler la température ou le gradient de température le long de la tubulure pour chauffer ou refroidir rapidement le mélange des réactifs) afin de garantir un environnement réactionnel homogène.<sup>11</sup>

## 1.3 Stabilité des nanoparticules

Une caractéristique essentielle des nanoparticules que nous voulons synthétiser dans ce travail est de les rendre stables en milieu aqueux et dans des milieux biologiques (sérum, milieu de cultures cellulaires, etc) pour les utiliser à des fins biomédicales.

### 1.3.1 Théorie DLVO

La stabilité des solutions colloïdales est la résultante de la somme des différentes forces qui agissent sur les nanoparticules afin de les maintenir dispersées dans le solvant. Ces forces peuvent être attractives entre les nanoparticules générant leur floculation (phénomène réversible) ou leur sédimentation (phénomène irréversible) ou au contraire répulsives assurant ainsi la stabilité colloïdale.

Cette stabilité colloïdale entre deux sphères chargées en solution est décrite par la théorie DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek).<sup>12</sup> Cette théorie propose que la stabilité d'une solution colloïdale est dépendante du potentiel d'interaction total ( $V_T$ ) qui est la somme des potentiels d'interaction attractif ( $V_A$ ) et du potentiel d'interaction répulsif ( $V_R$ ).

$$V_T = V_R + V_A$$

Avec :

- $V_T$  : potentiel d'interaction total entre deux nanoparticules
- $V_R$  : potentiel d'interaction répulsive induit par des effets électrostatiques ou stériques
- $V_A$  : potentiel d'interaction attractive induit par des forces de Van der Waals



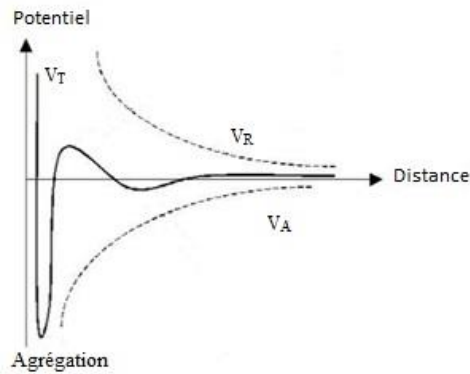


Figure 6: Potentiels d'interaction suivant la distance séparant deux particules chargées.

L'addition des deux contributions attractives et répulsives conduit à l'apparition d'un maximum dans la courbe  $V_T$  appelé barrière de potentiel (Figure 6). Si le système nanoparticulaire possède assez d'énergie pour passer cette barrière énergétique, les forces d'attraction deviennent dominantes. Par conséquent, les nanoparticules s'agrègent de façon irréversible.

### 1.3.2 Stabilisation électrostatique et stérique

Concrètement, la stabilisation d'une solution colloïdale nécessite d'augmenter le potentiel de répulsion *via* deux stratégies qui peuvent être complémentaires : la stabilisation électrostatique et stérique.

#### ➤ Stabilisation électrostatique

Lorsque les nanoparticules sont en solution dans un solvant polaire comme l'eau, elles développent à leurs surfaces une charge électrique et une double couche ionique (Figure 7).

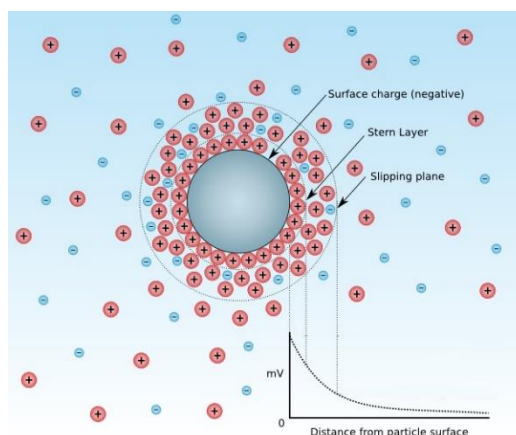


Figure 7: Illustration de la double couche ionique.



La stabilisation électrostatique résulte de la répulsion entre deux surfaces électriques de même charge. L'augmentation de la force ionique va limiter la portée de cette répulsion électrostatique *via* la compression de la double couche ionique. Ainsi des nanoparticules stables dans l'eau à pH=7 peuvent être déstabilisées dans un milieu représentatif d'un milieu biologique par exemple le sérum physiologique (NaCl 9 g/L). Cette répulsion électrostatique peut être potentialisée en utilisant des agents de recouvrement ionisés au pH d'utilisation de la nanoparticule. En pratique, la mesure du potentiel zêta de la solution nanoparticulaire permet de connaître la charge électrique qu'une nanoparticule acquiert en surface selon le pH de la solution.

### ➤ Stabilisation stérique

Des molécules encombrantes stériquement (souvent des polymères) adsorbées à la surface des nanoparticules induisent des forces répulsives permettant de les stabiliser. L'intensité de ces forces répulsives dépend du degré de couverture de la surface (régime brosse ou champignon) et de la nature du solvant. Ce phénomène est expliqué par la théorie de Flory-Huggins qui définit la notion de "bon" ou de "mauvais" solvant. Dans le cas d'un bon solvant, les chaînes polymériques restent mieux individualisées car elles ont plus d'affinité pour le solvant qu'entre elles. De ce fait, le rapprochement de deux nanoparticules revêtues de chaînes polymériques est défavorable thermodynamiquement car le solvant doit être expulsé. Il en résulte donc une répulsion stérique entre les deux nanoparticules (Figure 8).

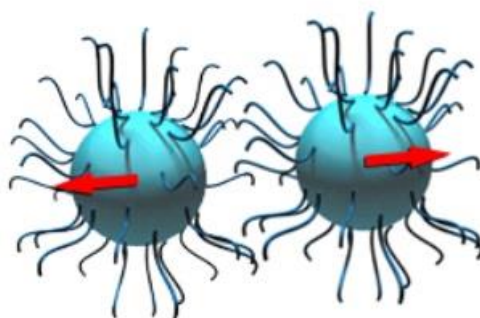


Figure 8: Représentation de la répulsion stérique.

### ➤ Stabilisation électro stérique

L'ajout de molécules à la fois encombrantes et chargées au pH d'utilisation de la nanoparticule permet de cumuler ces deux principes de stabilisation électrostatiques et stériques.



### 1.3.2.1 Liaisons à la surface des nanoparticules des agents de recouvrement

La liaison entre les ligands et la surface des nanoparticules va dépendre d'une part de la nature chimique de la surface (et notamment de son état d'oxydation) et bien sûr de l'affinité des ligands avec les atomes de surface. Il existe un équilibre entre le ligand lié en surface et le ligand dispersé en solution. On définit ainsi des ligands en interaction faible avec la surface et des ligands en interaction forte avec la surface. Cette notion de force d'interaction permet d'envisager des échanges de ligands à la surface des nanoparticules.

## 2 Synthèses de nanoparticules de bismuth métallique décrite dans la littérature

La littérature portant sur la synthèse de nanoparticules de bismuth métallique n'est pas très importante quantitativement. On recense, à ce jour, un peu moins d'une centaine d'articles. Une revue a déjà été publiée par notre équipe en 2018 sur ce sujet (en annexe de ce manuscrit).<sup>13</sup> Dans ce paragraphe, nous allons discuter du complément de l'état de l'art c'est à dire les articles qui sont sortis depuis 2018 sur ce sujet ou que nous avons identifiés après la publication de notre revue. Nous analyserons les différentes synthèses à la lumière des six principes de nanochimie verte. Les cases grisées dans les tableaux 2 à 6 correspondent aux articles déjà analysés dans la revue de 2018 et ne seront pas commentés ici.<sup>13</sup>

Plusieurs méthodes existent pour former des nanoparticules de bismuth métallique par la stratégie ascendante :

- La synthèse en nanoréacteurs (microémulsions ou micelles)
- La méthode polyol
- La décomposition thermique
- La réduction dans des solvants organiques
- La réduction dans l'eau

### 2.1 Synthèses en nanoréacteurs (microémulsions ou micelles inverses)

Synthétiser des nanoparticules en nanoréacteurs nécessite l'utilisation de surfactants amphotères pour créer des micelles ou des microémulsions dans des solvants apolaires. Dans ces systèmes, le sel de bismuth est dissout dans l'eau puis est encapsulé par des surfactants. Le confinement en microréacteur influence les étapes de nucléation et de croissance.



### 2.1.1 Compléments de l'état de l'art

Depuis la publication de la revue de 2018,<sup>13</sup> quatre nouvelles synthèses de nanoparticules de bismuth métallique en nanoréacteur ont été identifiées.

En 1999, Stroke *et al.* ont synthétisé des nanoparticules de bismuth métallique par microémulsion à partir de citrate de bismuth (BiCit) ou de nitrate de bismuth ( $\text{BiNO}_3$ )<sub>3</sub> réduit par du tétrahydruoborate de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ). Les tensio-actifs utilisés pour stabiliser la microémulsion n'ont pas été mentionnés. L'agent de revêtement est le polyméthylméthacrylate (PMMA) qui a été polymérisé *in situ* ou le polyvinylpyrrolidone (PVP). Ces agents de revêtement ont conféré des formes différentes aux nanoobjets. En effet, en présence de PMMA, les nanoobjets ont été obtenus sous forme de nanobâres et avec le PVP sous forme de nanoparticules.<sup>14</sup>

Stubenrauch *et al.* ont utilisé un système de microémulsion constitué d'eau, de décane, de butanol et de surfactants tels que dioctyl sulfosuccinate de sodium (AOT) et le dodécylsulfate de sodium (SDS). Ainsi, des nanoparticules de bismuth ont été obtenues et caractérisées par un diamètre en microscopie électronique en transmission (TEM) de 25 nm.<sup>15</sup>

Brütsch *et al.* ont synthétisé des nanoparticules de bismuth de 5 nm en TEM par émulsion inverse en utilisant la photochimie comme mode de réduction. Du bromure de bismuth ( $\text{BiBr}_3$ ) a été solubilisé dans du carbonate de propylène alors que l'agent de revêtement, l'oléamine, a été solubilisé dans l'heptane. Les deux solutions non-miscibles ont été vigoureusement mélangées pendant deux heures et irradiées sous ultraviolet.<sup>16</sup>

Petsom *et al.* ont synthétisé des nanoparticules de bismuth par micelle inverse. La synthèse s'est déroulée dans un milieu aqueux en présence de nitrate de bismuth, des surfactants AOT, de l'oléate de sodium (SOA) et du réducteur  $\text{NaBH}_4$ . L'ajout d'acide ascorbique complexant le Bi(III) a permis de diminuer la vitesse de nucléation mais le diamètre des nanoparticules n'en a pas été affecté (48 nm en TEM). Enfin, de l'éthanol a été ajouté pour augmenter la taille des micelles. Le diamètre des nanoparticules obtenues a alors été de 63 nm.<sup>17</sup>

### 2.1.2 Synthèses en nanoréacteur en termes de chimie verte

Un des avantages d'utiliser des nanoréacteurs est de contrôler et moduler efficacement le diamètre des nanoparticules de bismuth selon le nanoréacteur utilisé comme l'a montré la dernière publication (Petsom *et al.*).<sup>17</sup>

En termes de chimie verte, l'utilisation et l'élimination de tensio-actifs issus de la pétrochimie reste un inconvénient. De plus, leur usage peut modifier les caractéristiques de surface des



nanoparticules. Par contre, les surfactants biosourcés sont actuellement utilisés et représentent clairement un axe d'optimisation de ce type de synthèses.<sup>18</sup>



## Introduction générale

Entrées	Emulsions	Sources de bismuth	Agents réducteurs	Agents de revêtement	Températures (°C)	Diamètres en TEM (nm)	Milieux réactionnels	Étapes de purification	Références
1	Microémulsion	BiCit	NaBH <sub>4</sub>	PVP	t.a.	20 (DLS 96 nm)	Eau / NH <sub>3</sub>	Centrifugation et lavage	Fang 2001 <sup>19</sup>
2	Microémulsion	BiCit	NaBH <sub>4</sub>	PVP	t.a.	20 (DLS 96 nm)	Eau / NH <sub>3</sub>	Centrifugation et lavage	Fang 2000 <sup>20</sup>
3	Microémulsion	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	Monomère de méthyl méthacrylate et monomère de 2-hydroxyéthyle méthacrylate	t.a.	20	Eau	Centrifugation et lavage	Fang 2000 <sup>21</sup>
4	Micelle inverse	BiOCIO <sub>4</sub>	NaBH <sub>4</sub>	AOT	N.D.	3,2 ; 6,9 ; 8,0	Eau	Centrifugation et lavage	Foos 2000 <sup>22</sup>
5	Microémulsion	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> BiCit	NaBH <sub>4</sub>	Monomère de méthyl méthacrylate et PVP	t.a.	20	Eau	Évaporation	Stokes 1999 <sup>14</sup>
6	Microémulsion	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	SDS/AOT	t.a.	25	Eau/décane/butanol	Centrifugation et lavage	Stubenrauch 2008 <sup>15</sup>
7	Microémulsion	BiBr <sub>3</sub>	Rayonnement UV	Oléylamine	t.a.	5	Propylène carbonate/heptane	Transfert de phase	Brütsch 2017 <sup>16</sup>
8	Micelle	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	Acide tartrique	t.a.	47 ; 48 ; 63	Eau	Filtration	Petsom 2018 <sup>17</sup>

*N.D. : non déterminé*

*Tableau 2: Conditions expérimentales des synthèses réalisées en nanoréacteurs (les lignes grisées ont été discutées dans la revue de 2018).*



### 2.2 Synthèses par décomposition thermique

La méthode de décomposition thermique a été décrite pour synthétiser des nanoparticules de bismuth avec un bon contrôle de leur taille. Des températures élevées sont appliquées pour solubiliser le sel de bismuth et l'agent de revêtement.

#### 2.2.1 Compléments de l'état de l'art

Depuis la publication de la revue de 2018,<sup>13</sup> cinq nouvelles synthèses de nanoparticules de bismuth métallique par décomposition thermique ont été identifiées.

Une synthèse intercalant des nanoparticules de bismuth dans de l'oxyde de graphène a été décrite par Yan *et al.* L'acétate de bismuth ( $\text{BiAc}_3$ ) a été solubilisé dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et la réaction s'est déroulée dans un autoclave à 180 °C pendant trois heures. Les nanoparticules ont été purifiées par centrifugation, puis calcinées à 500 °C sous argon afin de fixer les nanoparticules dans les mailles du graphène.<sup>23</sup>

Chakravarty *et al.* ont réalisé une synthèse de nanoparticules de bismuth à partir de chlorure de bismuth ( $\text{BiCl}_3$ ) dissout dans l'octadécène. Les nanoparticules formées ont été mesurées à 12 nm en TEM et ont été revêtues d'un copolymère poly(1-hexadécène-co-1-vinylpyrrolidone) (PHD-co-PVP). Les auteurs ont montré que ces nanoparticules se dégradent à pH=5,5. Pour limiter la vitesse de dégradation, les nanoparticules ont ensuite été encapsulées dans du poly(lactique-co-acide glycolique) (PLGA) ou de la silice.<sup>24</sup>

Un échange de ligand à partir de nanoparticules de bismuth métallique a été réalisé par Bi *et al.* Les nanoparticules ont été synthétisées en partant du néodécanoate de bismuth qui a été solubilisé dans un mélange d'octadécylène et d'acide oléique puis chauffé à 260 °C pendant 30 minutes. Cette synthèse a abouti à des nanoparticules revêtues d'acide oléique mesurant 4 nm en TEM. Après purification par centrifugation, un échange de ligand a été effectué avec un amino-polyéthylène glycol pour solubiliser les nanoparticules en phase aqueuse.<sup>25</sup>

Winter *et al.* ont eux aussi effectué un échange de ligand pour obtenir une solution colloïdale dans l'eau. Dans un premier temps, les nanoparticules de bismuth ont été synthétisées à partir de l'iodure de bismuth ( $\text{BiI}_3$ ) solubilisé dans un mélange de solvants di-isopropylbenzène (DIPB)/hexadécylamine à 100 °C. Après ajout d'acide oléique jouant le rôle d'agent de revêtement, la température de la réaction a été augmentée à 180 °C. Après purification, un échange de ligand entre l'acide oléique et le PVP a été réalisé afin de disperser les nanoparticules en phase aqueuse. Une autre stratégie consistant à former une couche de silice autour de la nanoparticule a aussi été utilisée. Pour ce faire, les nanoparticules ont été



solubilisées dans un mélange éthanol/eau (9/1) en présence d'ammoniaque puis du tétraéthoxysilane (TEOS) a été rajouté pour former la couche de silice.<sup>26</sup>

Hu *et al.* ont synthétisé des nanoparticules à partir d'acétate de bismuth solubilisé dans l'éthylène glycol. La solution obtenue a été chauffée à 200 °C pendant vingt minutes afin de générer des nanoparticules de bismuth métallique de 200 nm. Après une étape de centrifugation, une couche de silice a été créée à la surface des nanoparticules à l'aide de TEOS suivant le même protocole que celui utilisé par Winter *et al.*<sup>27</sup>

### 2.2.2 Apport de la décomposition par voie thermique en termes de chimie verte

Suivant les conditions expérimentales sélectionnées, la décomposition par voie thermique donne des diamètres de nanoparticules comprise entre 3 et 600 nm en TEM. Le processus de thermolyse nécessite de hautes températures (et parfois des conditions anhydres) ce qui n'est pas favorable en termes de consommation énergétique.

L'utilisation de températures élevées est préjudiciable pour envisager un procédé sûr pour une montée en échelle. Cependant, quelques-unes de ces synthèses ont été développées sans solvant ce qui est un avantage indéniable en terme de chimie verte.<sup>28–30</sup>



## Introduction générale

Entrées	Sources de bismuth	Agents de revêtement	Températures (°C)	Diamètres en TEM (nm)	Milieux réactionnels	Étapes de purification	Références
1	Bi(N(SiMe <sub>3</sub> )) <sub>2</sub>	PHD-co-PVP + Na(N(SiMe <sub>3</sub> )) <sub>2</sub>	180	3-30	THF + DIPB	N.D.	Wang 2008 <sup>31</sup>
2	Bi(N(SiMe <sub>3</sub> )) <sub>2</sub>	PHD-co-PVP + Na(N(SiMe <sub>3</sub> )) <sub>2</sub>	180	1,9-29	THF + DIPB	N.D.	Richards 2011 <sup>32</sup>
3	BiCl <sub>3</sub>	PHD-co-PVP + Na(N(SiMe <sub>3</sub> )) <sub>2</sub>	200	4-29	THF + DIPB	N.D.	Wang 2010 <sup>28</sup>
4	Bi(N(SiMe <sub>3</sub> )) <sub>2</sub>	Acide oléique + Li(N(SiMe <sub>3</sub> )) <sub>2</sub>	150	11-22	Hexadécylamine	Précipitation dans éthanol	Yarema 2010 <sup>33</sup>
5	Bi <sub>2</sub> Et <sub>4</sub>	PVP + Na(N(SiMe <sub>3</sub> )) <sub>2</sub>	170	25	THF + DIPB	Centrifugation	Schulz 2012 <sup>34</sup>
6	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> formation <i>in situ</i> de Bi[SC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> ] <sub>3</sub>	1-dodecanethiol & (PVP),	85 – 105	100-214	Pas de solvant	Centrifugation	Wang 2010 <sup>35</sup>
7	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> formation <i>in situ</i> de Bi[SC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> ] <sub>3</sub>	1-dodecanethiol	178	22	Pas de solvant	Centrifugation	Wei 2016 <sup>29</sup>
8	Bi(SC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> ) <sub>3</sub>	(C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> S) <sub>2</sub>	140 -180	(SEM) 170 -601	Pas de solvant	Centrifugation	Carotenuto 2009 <sup>30</sup>
9	BiAc <sub>3</sub>	N.D.	315	30-60	Oleylamine	Centrifugation	Wang 2014 <sup>36</sup>
10	BiAc <sub>3</sub>	Oxide de graphène	180	300	DMSO	Centrifugation et lavage	Yan 2017 <sup>23</sup>
11	Néodécanoate de Bi	Acide oléique PEG	260	4	Octadécyle, acide oléique	Centrifugation	Bi 2018 <sup>25</sup>
12	BiCl <sub>3</sub>	PHD-co-PVP	170	12	Octadécène	Aucune purification	Chakravarty <sup>24</sup> 2016
13	BiI <sub>3</sub>	Acide oléique PVP TEOS	180	40-80	DIPB/hexadécylamine	Centrifugation	Winter 2018 <sup>26</sup>
14	BiAc <sub>3</sub>	PVP TEOS	200	200	Ethylène glycol	Centrifugation	Hu 2011 <sup>27</sup>

Tableau 3: Conditions expérimentales des synthèses réalisées par décomposition thermique (les lignes grisées ont été discutées dans la revue de 2018).



### 2.3 Synthèses via les polyols

La méthode polyol est une approche de synthèse conduisant en général à un bon contrôle de la forme et du diamètre des nanoparticules. Les solvants polyols offrent des propriétés intéressantes. En effet, ils solubilisent les sels inorganiques de bismuth de part leurs constantes diélectriques élevées, ils peuvent être utilisés sur une plage de température large car ils ont des points d'ébullition élevés et ils peuvent jouer le rôle de réducteur.

#### 2.3.1 Compléments de l'état de l'art

Des travaux complémentaires ont été référencés dans lesquels la nature du métal et son degré d'oxydation ont été étudiées.

L'influence de la nature chimique du métal sur le diamètre des nanoparticules a été étudiée par Wang *et al.* La synthèse de nanoparticules métalliques de différentes natures chimiques (bismuth, étain, indium et plomb) par voie polyol a été réalisée en partant à chaque fois d'un sel métallique d'acétate. Le précurseur et le PVP ont été solubilisés dans l'éthylène glycol puis chauffés à 200 °C pendant vingt minutes. Après une purification par centrifugation, le diamètre des différentes nanoparticules a varié de 30 à 200 nm selon le métal utilisé.<sup>37</sup>

Kong *et al.* ont étudié l'influence de l'état d'oxydation du précurseur de bismuth sur le diamètre des nanoparticules obtenues par voie polyol. Le précurseur de Bi(III), le nitrate de bismuth et le précurseur de Bi(V), le bismutate de sodium ( $\text{NaBiO}_3$ ), ont été solubilisés dans du glycérol sous atmosphère inerte puis la solution a été chauffée en autoclave à 200 °C durant vingt-quatre heures. Les nanoobjets obtenus étaient différents selon le précurseur utilisé. Ainsi, des nanoparticules et des nanoobjets hexagonaux ont été formés à partir du précurseur Bi(III) et des nanotubes ont été obtenues à partir du précurseur Bi(V).<sup>38</sup>

Kim *et al.* ont proposé un protocole où la synthèse de nanoparticules de bismuth revêtues de PVP a été réalisée en solubilisant préalablement le carbonate de bismuth  $[(\text{Bi}_2\text{CO}_3)_3]$  dans le tétraéthylèneglycol à 200 °C. La température de la réaction a ensuite été augmentée à 300 °C durant cinq minutes. Des nanoparticules de 60 nm (en TEM) ont été obtenues.<sup>39</sup>

Tian *et al.* ont synthétisé des nanoparticules de bismuth en solubilisant du nitrate de bismuth dans l'éthylène glycol. Dans cette synthèse, le tripolyphosphate a été utilisé comme agent de revêtement. Les résultats obtenus ont montré que le temps de réaction avait une influence sur les diamètres des nanoparticules. En effet, après trois heures de réaction, des nanoparticules de 20 nm ont été obtenues alors qu'après trente-six heures elles mesuraient 40 nm en TEM.<sup>40</sup>



### 2.3.2 Synthèse polyol du point de vue de la chimie verte

La méthode de synthèse polyol est d'un grand intérêt en termes de nanochimie verte. En effet, les polyols sont généralement non-toxiques et ils jouent simultanément le rôle de solvant, de réducteur et même d'agent de revêtement stabilisateur comme démontré dans plusieurs études.<sup>38,41-43</sup> Cette méthode donne accès à une grande variété de tailles et de formes de nanoparticules selon les conditions expérimentales.

La synthèse de Wu *et al.*<sup>44</sup> est particulièrement intéressante car elle utilise comme agent de revêtement le citrate qui stabilise les nanoparticules dans l'eau et provient du sel précurseur : le citrate de bismuth. La synthèse, réalisée sous irradiation microondes, doit normalement permettre de mieux contrôler les étapes de nucléation et de croissance. Les nanoparticules obtenues sont caractérisées par un diamètre de 400 à 700 nm. Il serait intéressant d'envisager une étude complémentaire des paramètres expérimentaux afin d'obtenir *via* ce procédé des nanoparticules plus petites.



## Introduction générale

Entrées	Sources de bismuth	Agents de revêtement	Températures (°C)	Diamètres en TEM (nm)	Milieux réactionnels	Étapes de purification	Références
1	BiAc <sub>3</sub>	PVP	198	225	Ethylène glycol	N.D.	Wang 2004 <sup>45</sup>
2	BiCl <sub>3</sub>	PVP	190	Nanofils avec la présence de nanosphère	Ethylène glycol- NaOH	Centrifugation	Wang 2008 <sup>46</sup>
3	BiCl <sub>3</sub>	PVP	190	Nanofils avec la présence de nanosphère	Ethylène glycol- NaOH	Centrifugation	Chen 2005 <sup>47</sup>
4	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	PVP	185	200-400	Ethylène glycol	Centrifugation	Li 2009 <sup>48</sup>
5	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	PVP	180	180	Ethylène glycol	Centrifugation	Wu 2011 <sup>49</sup>
6	BiCit, urée	PVP ou polyéthylène Glycol (PEG) ou bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB)	198	(SEM) 500	Ethylène glycol	N.D.	Cheng 2009 <sup>50</sup>
7	BiCit, urée	Citrate	Microondes	400-700	Diéthylène glycol	Centrifugation	Wu 2010 <sup>44</sup>
8	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	N.D.	Microondes 750W	N.D.	Propylène glycol ou éthylène glycol	N.D.	Safardoust-Hojaghan 2012 <sup>42</sup>
9	Bi(OH) <sub>3</sub> , Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , BiAc <sub>3</sub> , Bi <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	N.D.	188–350	80 nm à quelques microns	Ethylène glycol ou propylène glycol ou 1,3-propane diol ou diéthylène glycol ou glycérol ou tétra éthylène glycol	Précipitation et lavage	Goia 2005 <sup>43</sup>
10	NaBiO <sub>3</sub>	Acétone	180-200	30-50	Ethylène glycol + acétone	Filtration et lavage	Wang 2004 <sup>37</sup>
11	NaBiO <sub>3</sub>	Ethanol	200	85-144 (SEM). Mélange de fils et de nanoparticules	Mélange de solvant : éthanol absolue and éthylène glycol	Centrifugation	Zou 2009 <sup>51</sup>
12	NaBiO <sub>3</sub>	PVP	200	75	Ethylène glycol	N.D.	Wang 2006 <sup>52</sup>
13	NaBiO <sub>3</sub>	N.D.	Microondes 600-1200 W	45-10000	Ethylène glycol	Lavage et filtration	Flores 2016 <sup>41</sup>
14	BiCl <sub>3</sub>	PVP	190-193	400	Ethylène glycol NaOH	Centrifugation	Kitamura 2014 <sup>53</sup>
15	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Ethylène glycol	190	50-200	Ethylène glycol	Centrifugation	Zhang 2013 <sup>54</sup>



## Introduction générale

Entrées	Sources de bismuth	Agents de revêtement	Températures (°C)	Diamètres en TEM (nm)	Milieus réactionnels	Étapes de purification	Références
16	$\text{Bi}_2(\text{CO}_3)_3$	PVP	300	60	Tétraéthylène glycol	Centrifugation méthanol	Kim 2015 <sup>39</sup>
17	$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ $\text{NaBiO}_3$	Glycérol	200	30-150	Glycérol	Lavage	Kong 2018 <sup>38</sup>
18	$\text{BiAc}_3$	PVP APTES	200	100	Éthylène glycol	Centrifugation éthanol	Wang 2011 <sup>37</sup>
19	$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$	Tripolyphosphate	180	20-45	Éthylène glycol	Centrifugation et lavage	Tian 2016 <sup>40</sup>

Tableau 4: Conditions expérimentales des synthèses réalisées par la méthode polyol (les lignes grisées ont été discutées dans la revue de 2018).



### 2.4 Synthèses via une réduction en solvant organique

Dans les synthèses utilisant une réduction d'un sel de bismuth dans un solvant organique, la taille et la forme des nanoparticules dépendent beaucoup du précurseur de bismuth, du réducteur et des solvants utilisés. Quand un réducteur fort est utilisé, la réduction du sel métallique est plus rapide que la solubilisation de celui-ci ce qui provoque une polydispersité de la taille des nanoparticules. Afin d'obtenir des nanoparticules plus monodisperses, l'utilisation de réducteurs forts avec une cinétique lente de réduction est préférée afin de contrôler les cinétiques des étapes de nucléation et de croissance. Ce problème de solubilité a aussi été résolu en utilisant des sels de bismuth solubles comme les complexes de thiolate de bismuth ou la sonication pour solubiliser certains précurseurs ou encore la modification des contre ions qui améliorent la solubilité des précurseurs de sel de bismuth.

#### 2.4.1 Compléments de l'état de l'art

Douze nouvelles synthèses ont été identifiées depuis la parution de notre revue en 2018.<sup>13</sup>

Des nanoparticules plus petites ont été synthétisées en utilisant des conditions décrites dans notre revue<sup>55-57</sup> à savoir le nitrate de bismuth comme précurseur,  $\text{NaBH}_4$  comme réducteur et le PVP comme agent de revêtement. L'utilisation de mélange de solvants tels que le couple glycérol/éthanol a permis de réduire le diamètre des nanoparticules à 2 nm en TEM<sup>58</sup> alors que le mélange eau/diméthylformamide (DMF) induit une augmentation du diamètre des nanoparticules à 77 nm.<sup>59</sup>

Via un processus radicalaire, le composé tris(triméthylsilyl)amide de bismuth  $[\text{Bi}(\text{N}(\text{SiMe}_3)_2)_2]$  a été réduit en présence de naphthaléniure de sodium dans un mélange tétrahydrofurane (THF) /octyne à 0°C. Les nanoparticules revêtues d'octyne ont été obtenues avec un diamètre de 2,8 nm en TEM.<sup>60</sup>

Les nanoparticules peuvent être incorporées dans une matrice d'oxyde de graphènes et de nanotubes après la réduction du nitrate de bismuth par l'hydrazine à 160 °C. Des nanoparticules de bismuth de 15-60 nm ont alors été obtenues.<sup>61</sup> Cette incorporation a aussi été effectuée sous ultrasons (42 kHz) avec l'acide ascorbique comme réducteur et agent de revêtement et l'éthylène glycol comme solvant dans des conditions plus vertes.<sup>62</sup>

Pour solubiliser le bismuth, le précurseur dodécanthiolate de bismuth est formé *in situ* lors de la synthèse. Le néodécanoate de bismuth est solubilisé dans l'octadécène à 80 °C. Après l'ajout du dodécanthiol, la solution devient jaune. Ce changement de couleur indique la formation du complexe dodécanthiolate de bismuth. Ce précurseur est réduit par l'oléamine



à 80 °C pour former des nanoparticules de bismuth métallique de 40 nm en TEM dans un cas.<sup>63</sup> Dans un autre cas, la trioctylphosphine assure le rôle de réducteur à 100 °C et des nanoparticules revêtues d'acide oléique avec un diamètre de 162 nm en TEM sont obtenues.<sup>64</sup>

### 2.4.2 Optimisation et fiabilisation d'une des synthèses décrites

A l'issue de cette analyse de la bibliographie, la synthèse de Brown *et al.* nous a paru particulièrement intéressante.<sup>65</sup> Cette synthèse a d'ailleurs été réutilisée dans plusieurs publications ultérieures mais sa reproduction n'a pas conduit à des nanoparticules de bismuth de mêmes diamètres.<sup>66-69</sup> Ce point pose donc la question de la reproductibilité de cette synthèse.

Dans un travail préliminaire, cette voie de synthèse a été explorée plus en détails dans notre laboratoire. Les premières expérimentations en procédé non continu ont été menées au laboratoire par Alexandra Pastor<sup>70</sup> dans le cadre de son mémoire d'ingénieur Cnam. J'ai ensuite repris ces travaux pour fiabiliser le protocole puis purifier et caractériser les nanoparticules obtenues et enfin étudier leur mécanisme de formation. Les premiers résultats ont été extrapolés en procédé continu à l'aide du dispositif expérimental qui sera détaillé dans le chapitre 2.

L'obtention de nanoparticules dans les conditions décrites par Brown *et al.* a nécessité des ajustements. En effet, une solubilité incomplète du D-glucose a été observée dans le 1,2-propanediol ce qui conduit, avec les quantités utilisées, à un milieu hétérogène. Pour mieux contrôler les paramètres, tels que les quantités de réactifs, les temps de réaction et fiabiliser cette synthèse, nous avons tenté d'appliquer les principes de la nanochimie verte.

La synthèse et la reproductibilité ont été améliorées en :

- Diminuant les quantités de D-glucose et par conséquent la quantité de déchets.
- Modifiant la méthode de chauffage en passant d'un chauffage thermique conventionnel à une irradiation sous ultrasons.
- Réduisant totalement le Bi(III) en Bi(0) et en évaluant le taux de transformation par spectroscopie UV-Visible.
- Optimisant les conditions de purification *via* l'utilisation d'un système d'ultrafiltration.
- Améliorant la productivité par un procédé de flux continu sous irradiation d'ultrasons.



Différentes analyses effectuées ont permis de confirmer l'obtention de nanoparticules de bismuth métallique recouvertes par du D-glucose.

Ces travaux ont donné lieu à une publication dans le journal *Ultrasonics Sonochemistry* en 2019 (en annexe de ce manuscrit).<sup>71</sup>

### 2.4.3 Réduction en milieu organique du point de vue de la chimie verte

Les réductions en milieu organique présentent encore quelques limitations du point de vue de la chimie verte. En effet, la plupart de ces synthèses utilisent des réducteurs toxiques dans des quantités stœchiométriques et des solvants organiques toxiques. Cependant, de nombreuses améliorations ont été apportées pour tendre vers des conditions de synthèse plus vertes. Au niveau des réactifs, des agents réducteurs moins toxiques comme l'acide ascorbique ou des solvants plus verts comme l'éthylène glycol ou le 1,2-propanediol sont de plus en plus utilisés. Au niveau des méthodes d'activation, la photochimie, la sonochimie et l'irradiation sous microondes sont aussi exploitées.



## Introduction générale

Entrées	Sources de bismuth	Agents réducteurs	Agents de revêtement	Températures (°C)	Diamètres en TEM (nm)	Milieux réactionnels	Etapes de Purification	Références
1	Dodécane-thiolate de bismuth	TOP	Dodécane-thiol	80	6-27	Octadécène	Précipitation et centrifugation	Son 2011 <sup>72</sup>
2	Dodécane-thiolate de bismuth	TOP	Dodécane-thiol	60	38	Octadécène	Précipitation et centrifugation	Swy 2014 <sup>73</sup>
3	2-éthylhexanoate de bismuth	LiBEt <sub>3</sub> H	TOP / Acide oléique : 4/1	175	15	Diocetyl éther	Centrifugation	Fang 2001 <sup>74</sup>
4	2-éthylhexanoate de bismuth	NaBH <sub>4</sub>	TOP	t.a.	20	Diocetyl éther	Précipitation et Centrifugation	Fanfair 2005 <sup>75</sup>
5	Acétate de bismuth, 2-éthylhexanoate de bismuth, oléate de bismuth	hv	Dodécane-thiol	t.a.	9,2	THF	Centrifugation	Warren 2007 <sup>76</sup>
6	BiCl <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	PVP	t.a.	6-13	DMF	Centrifugation	Wang 2005 <sup>77</sup>
7	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	PVP	N.D.	30	DMF	Centrifugation	Hossain 2012 <sup>55</sup>
8	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	PVP	N.D.	20	DMF	Centrifugation	Luo 2012 <sup>56</sup>
9	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	PVP	N.D.	30	DMF	Centrifugation	Luo 2013 <sup>57</sup>
10	BiCl <sub>3</sub>	NaH	t-BuONa	65	1,8-3	THF	N.D.	Balan 2004 <sup>78</sup>
11	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Acide ascorbique	N.D.	Microonde 700 W	70	Éthylène glycol	Centrifugation	Cui 2015 <sup>79</sup>
12	Bi (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Borane morpholine	D-Glucose & 1,2-propanediol	60-100	74 (DLS 86 nm)	1,2-propanediol	Centrifugation et dialyse	Brown 2014 <sup>65</sup>
13	Bi(NO <sub>3</sub> )	NaBH <sub>4</sub>	Citrate	t.a.	3,3	DMSO	Centrifugation	Velasco-Arias 2012 <sup>80</sup>
14	BiAc <sub>3</sub>	Oleyamine	Acide oléique	260	3	Oleyamine	Lavage/centrifugation	Yu 2017 <sup>81</sup>
15	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	PVP	t.a.	2	Glycérol/éthanol	N.D.	Lei 2017 <sup>58</sup>
16	Néodécanoate de bismuth	Oleyamine	Dodécane-thiol	80	40	Octadécène	Centrifugation méthanol	Yu 2018 <sup>63</sup>
18	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Borane morpholine	D-Glucose	80	41	1,2-propanediol	Centrifugation et dialyse	Li 2017 <sup>67</sup>
19	Bi(N(SiMe) <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Na-naphtalène	Octyne	0	2,8	THF	N.D.	Branca 2017 <sup>60</sup>



## Introduction générale

Entrées	Sources de bismuth	Agents réducteurs	Agents de revêtement	Températures (°C)	Diamètres en TEM (nm)	Milieus réactionnels	Etapes de Purification	Références
20	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Borane morpholine	D-Glucose	90	40	Propanediol	Centrifugation	Deng 2018 <sup>66</sup>
21	BiAc <sub>3</sub>	Trioctylphosphine	Acide oléique	100	162	Dodecanthiol	Lavage acétone	Yang 2018 C <sup>64</sup>
22	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Borane morpholine	D-Glucose	90	40	Propanediol	Centrifugation	Deng 2018 <sup>69</sup>
23	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Hydrazine hydrate	Oxyde de graphène/nanotube	160	15-60	DMF	Lavage	Jerominyas 2018 <sup>61</sup>
24	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Borane morpholine	D-Glucose	80	70	Propanediol	Centrifugation	Yang 2018 <sup>64</sup>
25	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Acide ascorbique	Acide ascorbique Oxyde de graphène	Bain à ultrasons 42 kHz	3,5 à 7	Éthylène glycol	Lavage à l'éthanol	Bindewald 2017 <sup>62</sup>
26	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	PVP	t.a.	77	DMF/eau	Précipitation	Hamood 2016 <sup>59</sup>
27	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Borane morpholine	D-Glucose	Sonde à ultrasons	3	Propanediol	Ultrafiltration	Gomez 2019 <sup>71</sup>

*Tableau 5: Conditions expérimentales des synthèses réalisées par réduction dans des solvants organiques (les lignes grisées ont été discutées dans la revue de 2018).*



### 2.5 Synthèses via une réduction dans l'eau

La synthèse des nanoparticules de bismuth en milieu aqueux apparaît particulièrement intéressante d'un point de vue environnemental puisque l'eau est un solvant vert.<sup>82</sup> Néanmoins, l'utilisation de l'eau reste problématique car les sels de bismuth sont pour la plupart insolubles et sont facilement hydrolysables ou oxydables dans l'eau. Pour contribuer à cette amélioration, l'utilisation de sels de bismuth hydrosolubles a été envisagée.

#### 2.5.1 Compléments de l'état de l'art

Douze nouvelles synthèses ont été identifiées depuis la parution de notre revue en 2018.<sup>13</sup>

Hernandez *et al.* ont réalisé plusieurs synthèses dans les mêmes conditions pour obtenir des nanoparticules revêtues de 2,3 dimercapto-1-propanol (BAL). Dans un premier temps, les auteurs ont synthétisé le précurseur en complexant le nitrate de bismuth et le BAL à température ambiante dans le propylène glycol. Ce complexe soluble dans l'eau a été réduit par du NaBH<sub>4</sub> pour former des nanoparticules. Cependant, en utilisant les mêmes conditions, les diamètres des nanoparticules obtenues varient de 18 nm à 28 nm en TEM selon les publications.<sup>83-85</sup> Badireddy *et al.* ont reproduit les conditions expérimentales de cette synthèse et ont obtenu des diamètres de nanoparticules en TEM variant de 3 et 400 nm.<sup>86</sup> Hernandez *et al.* obtiennent des nanoparticules de 3,3 nm dans les mêmes conditions que précédemment en modifiant l'agent de revêtement qui est ici du citrate.<sup>87</sup>

Mtungwa *et al.* ont étudié l'influence de la température et de l'agent de revêtement (oxyde de trioctylphosphine (TOPO) ou hexadécylamine ou acide oléique) sur la forme des nanoparticules et leur taille respectivement. En effet, les auteurs ont synthétisé dans l'eau des nanoparticules à partir de l'acétate de bismuth réduit par NaBH<sub>4</sub>. Les nanoparticules purifiées par centrifugation ont été redispersées dans une solution contenant l'agent de revêtement et la température a été augmentée soit à 190 °C ou à 230 °C. L'influence de la température a montré que les nanoparticules revêtues d'oxyde de trioctylphosphine à 190 °C étaient de formes sphériques avec un diamètre de 7 nm alors que les nanoparticules revêtues d'oxyde de trioctylphosphine à 230 °C formaient des nanotubes. Les différents agents de revêtement utilisés lors de cette synthèse ont impacté les diamètres des nanoparticules obtenues.<sup>88</sup>

Vera-Robles *et al.* ont synthétisé des nanoparticules greffées sur un phage (un phage est un virus infectant uniquement les bactéries) par réduction au NaBH<sub>4</sub>. Cette réaction est possible car le Bi(III) est complexé aux thiols présents sur le phage et forme un complexe Bi(III)-thiolate.<sup>89</sup>



Borovikova *et al.* ont comparé la stabilité colloïdale de nanoparticules revêtues de PVP, de  $\beta$ -cyclodextrine ou de polyacrylate. Les nanoparticules ont été synthétisées à partir du nitrate de bismuth réduit par le  $\text{NaBH}_4$  dans l'eau. Celles revêtues par la cyclodextrine n'ont montré une stabilité que de vingt-quatre heures. L'agent de revêtement PVP a permis de stabiliser les nanoparticules deux semaines en solution alors que le polyacrylate a stabilisé les nanoparticules au minimum deux mois.<sup>90</sup>

Hostler *et al.* ont synthétisé des nanoparticules revêtues d'acide nitrilotriacétique à partir de la réduction du  $\text{Bi}^{3+}$  avec le  $\text{NaBH}_4$  en présence d'ultrasons. Les auteurs ne donnent aucune information sur la nature chimique du précurseur.<sup>91</sup>

Qin *et al.* ont dissous le nitrate de bismuth dans l'acide nitrique puis le réducteur, l'éthylène glycol, est rajouté à la solution aqueuse. Après l'ajout du PVP, ce mélange est mis dans un autoclave à 150 °C pendant douze heures. Les auteurs ont montré que la taille des nanoparticules diminuait avec l'augmentation de la quantité de l'agent de revêtement.<sup>92</sup>

L'hydrazine a été utilisée par plusieurs auteurs pour obtenir des nanoparticules enrobées de différents polymères à partir du nitrate de bismuth. Le polysulfonate 4-styrène de sodium (PSS) a été utilisé comme agent de revêtement à 160 °C pendant six heures dans l'eau<sup>93</sup> ou dans un mélange eau/éthylène glycol<sup>94</sup> pour conduire à des diamètres de 80 nm ou entre 40 et 86 nm selon le solvant. Les polyéthylène glycols (PEG) de différentes longueurs de chaînes ont aussi permis d'accéder à des nanoparticules dont les diamètres sont compris entre 10 et 50 nm en utilisant un mélange eau/acide nitrique à 90 °C<sup>95</sup> et de 50 à 100 nm<sup>96</sup> en présence uniquement d'eau à 90 °C.

Reverberi *et al.* ont utilisé des réducteurs métalliques pour synthétiser des nanoparticules à partir de chlorure de bismuth en présence de zinc ou d'aluminium. En utilisant du zinc, les nanoparticules ont été moins polydisperses que celles obtenues avec l'aluminium. Différents agents de revêtement hydrophiles tels que le mannitol, la saponine et le maltodextrine ont été testés et des diamètres plus élevés (120 nm) ont été obtenus pour les nanoparticules enrobées de saponine.<sup>97</sup>

### 2.5.2 Synthèses *via* une réduction dans l'eau en termes de chimie verte

L'utilisation de l'eau est un avantage majeur en termes de nanochimie verte. Cependant, la solubilité des précurseurs de sel de bismuth reste un problème. En effet, Brown *et al.* ont montré que lorsque le pH est plus élevé que 9, le nitrate de bismuth se transforme en hydroxyde de bismuth ( $\text{Bi}(\text{OH})_3$ ).<sup>98</sup> Pour contourner ce problème, l'utilisation de complexants



hydrosolubles de bismuth a été exploré. Ainsi les complexes de bismuth de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)<sup>99</sup> ou l'acide tartrique<sup>100</sup> ou le citrate d'ammonium<sup>101</sup> ou l'acétate ont été utilisés. Une autre solution a été de réaliser la synthèse à pH acide.<sup>92,96,97</sup>

Plusieurs réactions se déroulent à température ambiante avec des agents réducteurs verts comme l'acide ascorbique.<sup>99</sup>

Comme déjà discuté dans les autres méthodes de synthèse, l'agent de revêtement permet de stabiliser les nanoparticules mais aussi d'éviter l'oxydation en milieu aqueux de la nanoparticule. Dans la littérature, nous avons identifié quatre agents de revêtement monomériques particulièrement intéressants : le citrate,<sup>87</sup> le tartrate<sup>102</sup>, l'oléate de sodium<sup>100,103</sup> et le BAL<sup>83,85,86</sup> permettant d'obtenir des nanoparticules hydrophiles ou hydrophobes.



## Introduction générale

Entrées	Sources de bismuth	Agents réducteurs	Agents de revêtement	Températures (°C)	Diamètres en TEM (nm)	Milieux réactionnels	Etapas de purification	Références
1	BiCl <sub>3</sub>	Hydrazine	SOA	80	25-40	Eau	Filtration et lavage	Materials Wang 2009 <sup>103</sup>
2	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Hydrazine	PSS	160	80	Eau	Centrifugation et lavage	Yang 2013 <sup>93</sup>
3	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> + acide tartrique + NaOH	NaH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub>	SOA	90	10–50	Eau	Filtration et lavage	Ma 2012 <sup>100</sup>
4	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> + Na <sub>2</sub> EDTA	Acide ascorbique	PVP	100	130-200	Eau (pH=10 /11)	Centrifugation et lavage	Fu 2005 <sup>99</sup>
5	[(NH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Bi(Cit) <sub>2</sub> ]	NaBH <sub>4</sub>	Amidon	25	10-20	Eau	Dialyse	Xia 2014 <sup>101</sup>
6	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	Dextran (75 kDa)	40	19,5 (DLS 130 nm)	Eau pH=9	Dialyse et centrifugation	Brown 2012 <sup>98</sup>
7	BiOClO <sub>4</sub>	Réduction radiolytique	Polyéthylèneimine or polyacrylamide- (10% à 70% de groupement carboxylique)	25	20	Eau	N.D.	Gutierrez 1996 <sup>104</sup>
8	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Copolymère P123	SDS ; CTAB P123 ; F127	30	50-500	HNO <sub>3</sub>	Centrifugation	Dai 2014 <sup>105</sup>
9	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	Cellulose	N.D.	2-10	Eau	Centrifugation	Jiao 2018 <sup>106</sup>
10	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	BAL	N.D.	53	Eau	N.D.	Rodriguez 2018 <sup>83</sup>
11	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	BAL	t.a	3-400	Eau	N.D.	Badireddy 2013 <sup>86</sup>
12	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	BAL	t.a	28	Eau	N.D.	Hernandez 2017 <sup>83</sup>
13	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	BAL	t.a	18	Eau	N.D.	Hernandez 2016 <sup>85</sup>
14	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	Citrate	t.a	3.3	Eau	N.D.	Hernandez 2012 <sup>87</sup>
15	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	BAL	t.a	53 nm (DLS)	Eau	N.D.	Hernandez 2015 <sup>84</sup>



## Introduction générale

Entrées	Sources de bismuth	Agents réducteurs	Agents de revêtement	Températures (°C)	Diamètres en TEM (nm)	Milieus réactionnels	Etapas de purification	Références
16	BiAc <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	TOPO Acide oléique Hexadécylamine	t.a	7 20 31	Eau	Centrifugation	Mntynga 2013 <sup>88</sup>
17	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	Phage	t.a	2.7	Eau	Centrifugation	Vera Nobles 2016 <sup>89</sup>
18	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Éthylène glycol	PVP	150	110-240	Eau (HNO <sub>3</sub> )	N.D.	Qin 2013 <sup>92</sup>
19	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NaBH <sub>4</sub>	PVP/ B-cyclodextrine Polyacrylate	N.D.	18 (XRD)	Eau	N.D.	Borovikova 2018 <sup>90</sup>
20	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Hydrazine	PEG 6000 PEG 20000	90	10 -50	Eau (HNO <sub>3</sub> )	Filtration	Ma 2015 <sup>96</sup>
21	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Hydrazine	PSS	160	80	Eau	Centrifugation lavage éthanol	Yang 2013 <sup>93</sup>
22	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Hydrazine	PEG 10000	90	50-100	Eau (HNO <sub>3</sub> )	Centrifugation	Zhang 2018 <sup>95</sup>
23	BiCl <sub>3</sub>	Aluminium Zinc	Mannitol maltodextrine Saponine	20	10-120	Eau + HCl	Lavage éthanol	Reverberi 2018 <sup>97</sup>
25	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Hydrazine	PSS	160	40-86	Eau/éthylène glycol	Lavage	Wang 2019 <sup>94</sup>
26	Bi(III)	NaBH <sub>4</sub>	Acide nitrilotriacétique	Irradiation ultrasons	18	Eau	N.D.	Hostler 2008 <sup>91</sup>

*Tableau 6 : Conditions expérimentales des synthèses réalisées par réduction dans l'eau (les lignes grisées ont été discutées dans la revue de 2018).*



### 2.6 Conclusion

Cette revue de la littérature a montré qu'une grande variété de solvants, d'agents réducteurs et d'agents de revêtement étaient utilisés pour synthétiser des nanoparticules de bismuth métallique. Nous avons pu aussi constater que certaines conditions réactionnelles n'étaient pas compatibles avec les principes de chimie verte appliqués à la nanochimie<sup>5</sup> et qu'aucune de ces synthèses ne satisfaisait simultanément les six principes de la nanochimie verte. Malgré tout, les points suivants nous ont semblé importants et marquants afin de rationaliser la conception d'une synthèse verte de nanoparticules de bismuth métallique.

- Dans certaines synthèses, la consommation d'énergie a été optimisée par l'utilisation de microondes<sup>41,42,44,79</sup> ou d'ultrasons<sup>62,71</sup>. Il a aussi été possible d'envisager des synthèses à température ambiante.
- Certains agents de revêtement (dextran<sup>98</sup> ou D-glucose<sup>107</sup>) ont pu être qualifiés de verts car biosourcés.
- L'utilisation de solvant vert comme l'eau et/ou de réducteurs non toxiques et biosourcés comme l'acide ascorbique<sup>79</sup> ou encore la lumière<sup>16,76</sup> ont permis d'obtenir une méthode de synthèse sûre et de s'affranchir de la production de déchets toxiques.
- Les méthodes de synthèse polyols ou par décomposition thermique ont utilisé un seul composé qui a joué le rôle de solvant, d'agent de revêtement et de réducteur ce qui a permis d'économiser le nombre d'atome et de limiter la quantité de déchets.
- L'utilisation d'un procédé en flux continu a permis d'améliorer la production de nanoparticules mais aussi de travailler avec un système de synthèse sécurisé.<sup>71</sup>

Les techniques de purification utilisées ont été soit des lavages soit des centrifugations qui consomment beaucoup d'énergie et de solvants. De plus, la centrifugation est une méthode de purification difficile à mettre en œuvre pour réaliser une montée en échelle.

En faisant le bilan de ces synthèses, nous avons pu constater que les rendements en nanoparticules n'ont jamais été évalués et que la quantité de déchets produite n'a pas été déterminée.

L'importance de l'agent de revêtement a été montré à la fois pour stabiliser les nanoparticules mais aussi pour les protéger de l'oxydation ce qui est important notamment pour les applications médicales.

Nous avons envisagé dans ce travail la synthèse de deux types de nanoparticules :

- Des nanoparticules hydrophiles stabilisées par exemple par du D-glucose<sup>107</sup> ou des PEG.<sup>95,96</sup>



- Des nanoparticules hydrophobes à incorporer dans des émulsions huile dans eau. La stabilité du système sera alors gérée par la composition de l'émulsion.

### 3 Incorporation des nanoparticules dans des émulsions

#### 3.1 Définition d'une émulsion

Une émulsion est une dispersion de gouttelettes d'une phase dans une autre. La phase dispersée est constituée par les gouttelettes et la phase continue est celle dans laquelle les gouttelettes diffusent. On parle d'émulsion eau dans huile (E/H) si la phase continue est une phase grasse, et d'émulsion huile dans eau (H/E) si la phase continue est constituée d'une solution aqueuse.

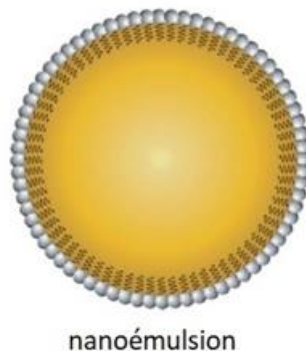


Figure 9: Une nanoémulsion.

Les nanoémulsions appelées communément émulsion, sont des émulsions métastables thermodynamiquement nécessitant un apport d'énergie pour les former et qui évoluent vers la séparation de phase (état d'énergie minimal du système). Cependant, elles peuvent être stabilisées cinétiquement si on ralentit ou inhibe les mécanismes physiques qui conduisent normalement à la séparation des phases non-miscibles. La compréhension de la physico-chimie de l'interface est importante pour analyser les facteurs qui gèrent la stabilisation cinétique des émulsions.<sup>108</sup>

#### 3.2 La physico-chimie de l'interface

Les émulsions sont caractérisées par une grande quantité d'interface entre les deux milieux non-miscibles. Ce phénomène provoque une augmentation de l'énergie libre totale du système qui ne peut pas être compensée par l'entropie. L'évolution cinétique de l'émulsion dépend alors fortement des propriétés de surface. Pour diminuer cette énergie libre, des molécules



amphiphiles sont utilisées comme des tensio-actifs, des polymères ou encore des protéines.<sup>109</sup> En effet, ces molécules comportent un résidu hydrophile et un résidu hydrophobe. Elles vont alors se placer à l'interface des liquides et diminuer la tension de surface. Ce comportement permet de stabiliser cinétiquement les émulsions.

### 3.2.1 Evolution cinétique des émulsions

Différentes forces colloïdales s'exercent sur les émulsions et leurs résultantes permettent d'expliquer les phénomènes de stabilisation et/ou déstabilisation des émulsions.

#### 3.2.1.1 Les forces colloïdales

Les gouttelettes peuvent subir deux types de forces : des forces déstabilisantes comme les forces de Van Der Waals ou des interactions de déplétion mais aussi des forces stabilisantes comme des interactions électrostatiques ou stériques ou électro-stériques (voir 1.3 de l'introduction).

##### 3.2.1.1.1 Les forces attractives de Van Der Waals

Les forces de Van der Waals correspondent à une interaction électrique d'intensité faible ayant lieu à courtes distances entre atomes et/ou molécules. La portée de ces interactions est de quelques nanomètres.<sup>110</sup> Par conséquent, ces forces provoquent le rapprochement de deux gouttelettes et peuvent déstabiliser l'émulsion.

##### 3.2.1.1.2 Les interactions de déplétion

L'interaction attractive de déplétion est due à la présence de deux populations de gouttes de rayons différents ( $b \gg a$ ) : par exemple des gouttelettes d'émulsion et des micelles de tensio-actifs. Les gouttes de rayon  $a$  exercent une pression osmotique sur les gouttes de rayon  $b$ . Tant que les grosses gouttes sont suffisamment éloignées les unes des autres, la pression est isotrope. Si les deux grosses gouttes de rayon  $b$  se rapprochent et atteignent une distance inférieure à deux fois le rayon de la gouttelette ( $2a$ ), une zone dite volume exclu se crée où les petites gouttelettes ne peuvent plus pénétrer. La pression n'est plus homogène dans le milieu ce qui provoque une floculation (voir infra, Figure 10).<sup>109</sup>



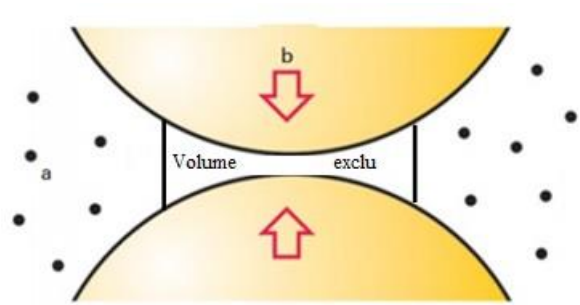


Figure 10 : Interactions de déplétion.

### 3.2.2 Les phénomènes d'évolution ou de destruction des émulsions

L'instabilité d'une émulsion conduisant à une séparation des deux phases distinctes est contrôlée par les forces colloïdales mais également par d'autres facteurs qui accélèrent ou ralentissent l'évolution cinétique de l'émulsion. Plusieurs phénomènes réversibles et irréversibles peuvent se produire au sein d'une émulsion qui sont résumés dans la figure 11.

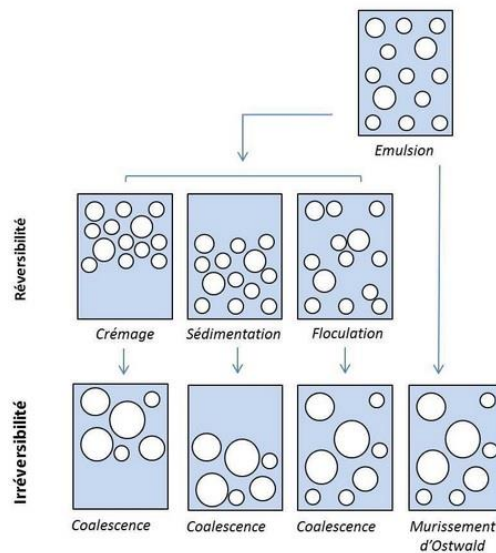


Figure 11: Phénomènes réversibles et irréversibles présents dans une émulsion.

#### 3.2.2.1 Le Mûrissement d'Ostwald

Le mûrissement d'Ostwald intervient dans des systèmes d'émulsions non homogènes en taille et dépend de la pression de Laplace. La pression de Laplace est la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la gouttelette. Cette pression dépend de la taille des gouttelettes. En effet, plus la taille de la gouttelette est petite, plus la pression de Laplace est élevée. Cette différence de pression entre les gouttelettes de tailles différentes induit un flux de matière des petites gouttelettes vers les plus grosses gouttelettes (Figure 12).<sup>109</sup>



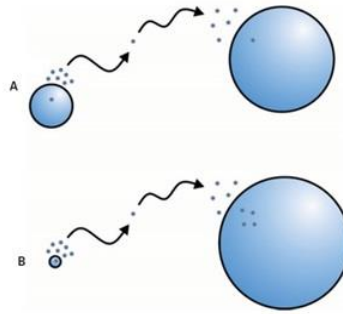


Figure 12 : Phénomène du mûrissement d'Ostwald.

Par conséquent, les petites gouttelettes se vident spontanément au profit des grosses gouttelettes. Ce phénomène irréversible se produit dès qu'il existe une solubilité partielle de la phase dispersée dans la phase continue. Pour y remédier, la présence d'une molécule apolaire (comme un alcane) dans l'huile permet d'induire une différence de potentiel chimique en faveur des petites gouttelettes en compensant la différence de pression de Laplace.<sup>109</sup>

### 3.2.2.2 La sédimentation et le crémage

Ces deux phénomènes sont provoqués par la pesanteur. En effet, une gouttelette est influencée par le champ de pesanteur terrestre qui impose une force vers le bas si la gouttelette est plus dense que la phase continue. En l'absence d'agitation, cet effet induit une inhomogénéité de l'émulsion. (Figure 13).<sup>109</sup>

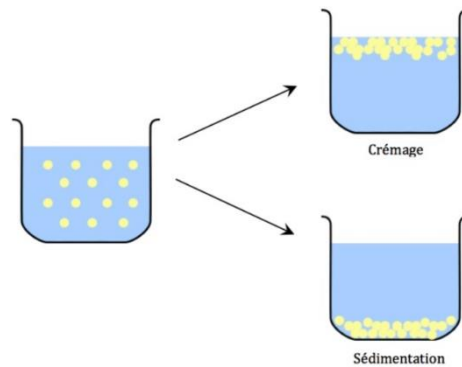


Figure 13 : Phénomènes de sédimentation et de crémage.

Ces phénomènes de sédimentation et de crémage sont réversibles et une redispersion est possible après agitation.<sup>109</sup>



### 3.2.2.3 La floculation

La floculation est la formation de grappe de gouttelettes appelée floccs. Ce phénomène se déroule lorsque les forces d'attraction sont plus fortes que l'agitation thermique. La floculation accélère le phénomène de coalescence (Figure 14).<sup>109</sup>

Plusieurs mécanismes de floculation existent comme par exemple le mécanisme de floculation par déplétion qui est induit par de petits objets dans la phase continue (par exemple des micelles de tensio-actifs).

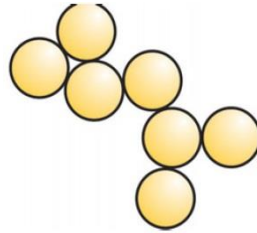


Figure 14 : Phénomène de floculation.

### 3.2.2.4 La coalescence

Si la floculation, la sédimentation ou le crémage sont en général des phénomènes réversibles, la coalescence est irréversible et constitue la dégradation ultime de l'émulsion. Les mécanismes induisant la coalescence sont encore débattus. Cependant, il y a un consensus sur le scénario général qui comporte trois étapes (Figure 15).<sup>109</sup>

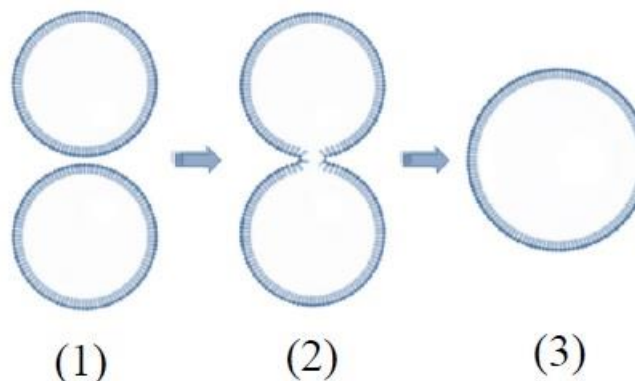


Figure 15 : Etapes importantes lors de la coalescence.

La première étape est le rapprochement de deux gouttelettes dû à différents phénomènes (crémage ou sédimentation ou floculation ou un simple mouvement brownien). Lors de ce rapprochement, un film mince apparaît entre les deux gouttelettes.<sup>109,111</sup> Lors de la deuxième étape, un canal se crée entre les gouttelettes et augmente jusqu'à la fusion des gouttelettes en une plus grosse (étape 3). Ce phénomène provoque la séparation des deux liquides en deux phases distinctes non miscibles.



## 4 Utilisation des nanoparticules pour la radiosensibilisation

Dans ce travail, les nanoparticules hydrophiles et celles incorporées dans des émulsions H/E ont été conçues notamment pour tester leur effet radiosensibilisateur pour la radiothérapie externe.

Avant de discuter le potentiel des nanoparticules en tant que radiosensibilisateur, nous allons d'abord décrire les principes physiques de la radiothérapie qui sont basés sur l'interaction des photons avec la matière.

### 4.1 La radiothérapie externe

La radiothérapie externe est une technique majeure employée pour le traitement des tumeurs cancéreuses. La radiothérapie utilise les rayonnements ionisants pour induire la destruction des cellules malignes. Ils sont de haute énergie et sont produits par des accélérateurs de particules ou des sources radioactives extérieures au patient (radiothérapie externe). Les rayonnements traversent les tissus (peau, muscle et autres organes...) afin de déposer leur énergie en profondeur, directement au niveau de la tumeur.

La sélection de la dose est donc cruciale en radiothérapie puisque les cellules saines sont aussi touchées par les rayonnements. Même si ces cellules saines ont souvent une résistance et une capacité de récupération supérieure aux cellules tumorales, il faut optimiser la dose délivrée pour

- Éviter des effets secondaires trop importants au niveau des cellules saines.
- Détruire les cellules cancéreuses.

### 4.2 Interaction des photons avec la matière

L'étude des interactions des photons avec la matière est primordiale pour comprendre les processus physiques à l'origine de l'efficacité de la radiothérapie. Trois types d'interactions photons / matière interviennent : l'effet photoélectrique, l'effet Compton et la matérialisation en paires.

#### 4.2.1 L'effet photoélectrique

L'effet photoélectrique apparaît dans une gamme d'énergie allant de 1 eV à 1 MeV. Cet effet est dû à l'interaction entre un photon incident caractérisé par une énergie donnée  $E = h\nu$  ( $h$  la constante de Planck,  $\nu$  la fréquence du rayonnement) et un électron du nuage électronique d'un atome (Figure 16). Un électron doit absorber une énergie au minimum



équivalente à celle qui le lie au noyau pour s'en détacher. L'excès d'énergie absorbée est quant à lui transformé en énergie cinétique de l'électron arraché (Figure 16). L'arrachement de cet électron dit électron secondaire induit la création d'une lacune dans le nuage électronique de l'atome. Cette lacune se comble *via* un déplacement en cascade d'électrons des couches les plus externes vers les couches internes. Ce phénomène s'accompagne de l'émission de photons X.

La position de l'électron secondaire arraché dépend de l'énergie du rayonnement incident. Des rayonnements de faible énergie arracheront des électrons en périphérie du nuage électronique.

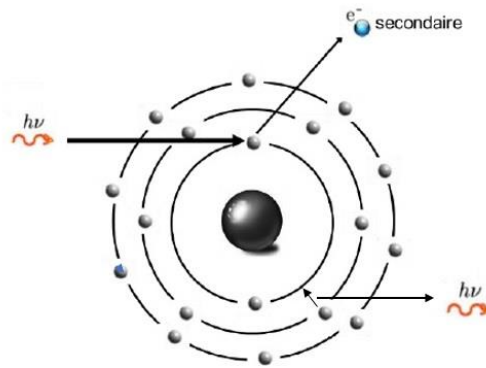


Figure 16 : Phénomène de l'effet photoélectronique.

### 4.2.2 L'effet Compton

L'effet Compton se manifeste dans une gamme d'énergies allant de 0.1 MeV et 10 MeV. Dans ce cas, le photon incident entre en collision avec un électron situé dans la couche externe de l'atome (Figure 17). L'électron est éjecté avec une énergie cinétique conséquente. Cependant, toute l'énergie du photon n'est pas cédée à l'électron. En conséquence, le photon est dévié et son énergie est moindre que le photon incident. Au total, ce phénomène induit l'émission d'un électron et d'un photon secondaire dont la somme des deux énergies vaut l'énergie du photon incident.



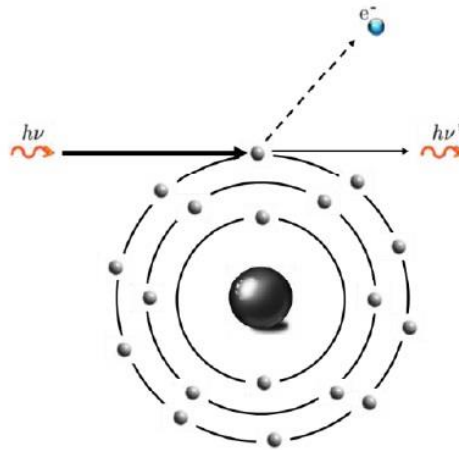


Figure 17 : Phénomène de l'effet Compton.

#### 4.2.3 La matérialisation en paires

Cet effet est présent pour des rayonnements de hautes énergies au-delà de 3 MeV. Le photon passe à proximité d'un noyau et se matérialise en une paire électron-trou. L'énergie incidente doit être égale ou supérieure à l'énergie de la paire électron-trou (Figure 18).

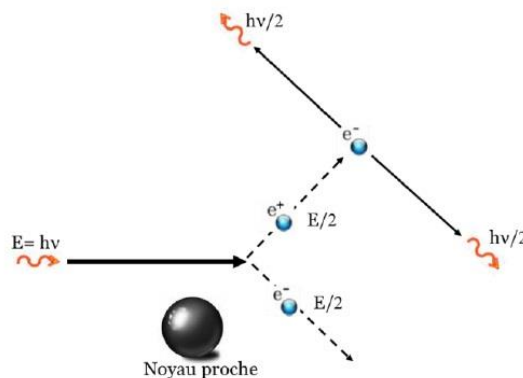


Figure 18 : Phénomène de la matérialisation en paires.

#### 4.2.4 Résumé des trois phénomènes

La figure 19 représente les différents domaines de prépondérance des trois effets discutés précédemment en fonction du numéro atomique  $Z$  du matériau et de l'énergie du rayonnement incident. Dans le cas de la radiothérapie clinique, les énergies utilisées vont de 1,25 MeV à quelques dizaines de MeV selon le tissu à irradier.<sup>112</sup> Dès lors, seuls les effets photoélectriques et Compton interviendront pour des nanoparticules de bismuth métallique ( $Z=83$ ).



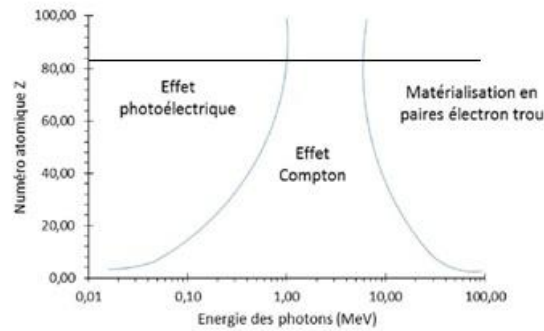


Figure 19 : Représentation des trois effets selon l'énergie du rayonnement et le nombre atomique de l'élément chimique utilisé. (La droite représente le numéro atomique du bismuth :  $Z=83$ ).

### 4.3 Utilisation de nanoparticules pour sensibiliser la radiothérapie externe

Une stratégie pour optimiser la dose à délivrer en radiothérapie externe est d'utiliser des radiosensibilisateurs. Ces radiosensibilisateurs vont augmenter localement les effets de l'irradiation grâce à l'émission des photons et des électrons secondaires par effets Compton et photoélectrique.<sup>113</sup>

Dans ce contexte, l'utilisation de nanoparticules issues d'éléments à numéro atomique  $Z$  élevé a été proposée. Les premières études *in vivo* sur les effets de radiosensibilisation à l'aide de nanoparticules d'or de 1,9 nm ont été réalisées par James Hainfeld en 2004.

#### 4.3.1 Étude pionnière de Hainfeld

Dans cette expérience, des cellules tumorales mammaires ont été injectées à des souris pour former un volume tumoral compris entre 50 à 90 mm<sup>3</sup>. Trois groupes de souris ont reçu des traitements contrôles (aucun traitement, injection de nanoparticules d'or seules, radiothérapie sans injection de nanoparticules) et un groupe a reçu le traitement combiné de l'injection de nanoparticules d'or et de la radiothérapie. Après 30 jours, la taille des tumeurs a été mesurée (Figure 20).<sup>114</sup>



## Introduction générale

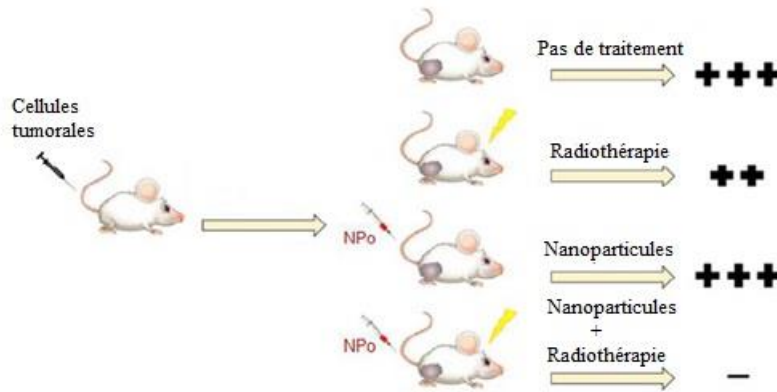


Figure 20 : Représentation de l'expérience de Hainfeld.<sup>114</sup>

Le volume des tumeurs des trois groupes contrôles a augmenté. Par contre, le volume tumoral des souris ayant reçues le traitement combiné de la radiothérapie et l'injection des nanoparticules d'or a diminué (90% des souris n'ont plus de tumeur visible).

Cette expérience a été à l'origine de nombreux travaux visant à développer des nanoparticules comme radiosensibilisateurs pour la radiothérapie externe.<sup>115</sup> A ce jour, deux types de nanoparticules font l'objet d'essais cliniques dans cette indication AGuIX® et NBTXR3®.

### 4.3.2 Exemples de radiosensibilisateurs nanométriques en essais cliniques (AGuIX®, NBTXR3®)

#### ➤ AGuIX®

AGuIX® est une nanoparticule développée depuis une dizaine d'année, d'abord à l'université Claude Bernard (Lyon 1) puis par la startup NhTherAguiX.<sup>112</sup>

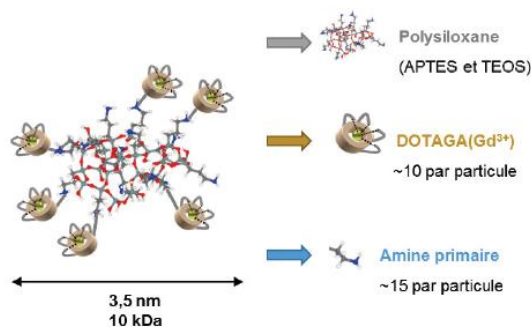


Figure 21 : Représentation du nanoobjet AGuIX®.

Comme illustré sur la figure 21, les nanoparticules AGuIX® ont un diamètre en TEM de 3,5 nm et un diamètre en DLS inférieure à 5 nm. Ces nanoparticules sont composées d'un squelette polysiloxane fonctionnalisé par une dizaine de ligands DOTAGA complexés par des



ions Gd(III) et des chaînes terminées par des fonctions amines pour fonctionnaliser éventuellement la nanoparticule.

La présence d'ion Gd(III) permet d'envisager une utilisation bimodale des nanoparticules AGuIX® comme radiosensibilisateur pour la radiothérapie et comme agent de contraste IRM pour suivre la localisation *in vivo* des nanoparticules.

Depuis 2016, les nanoparticules AGuIX®, injectées par voie intraveineuse, sont entrées en essais cliniques dans différentes indications radiothérapeutique (Figure 22).<sup>116</sup>

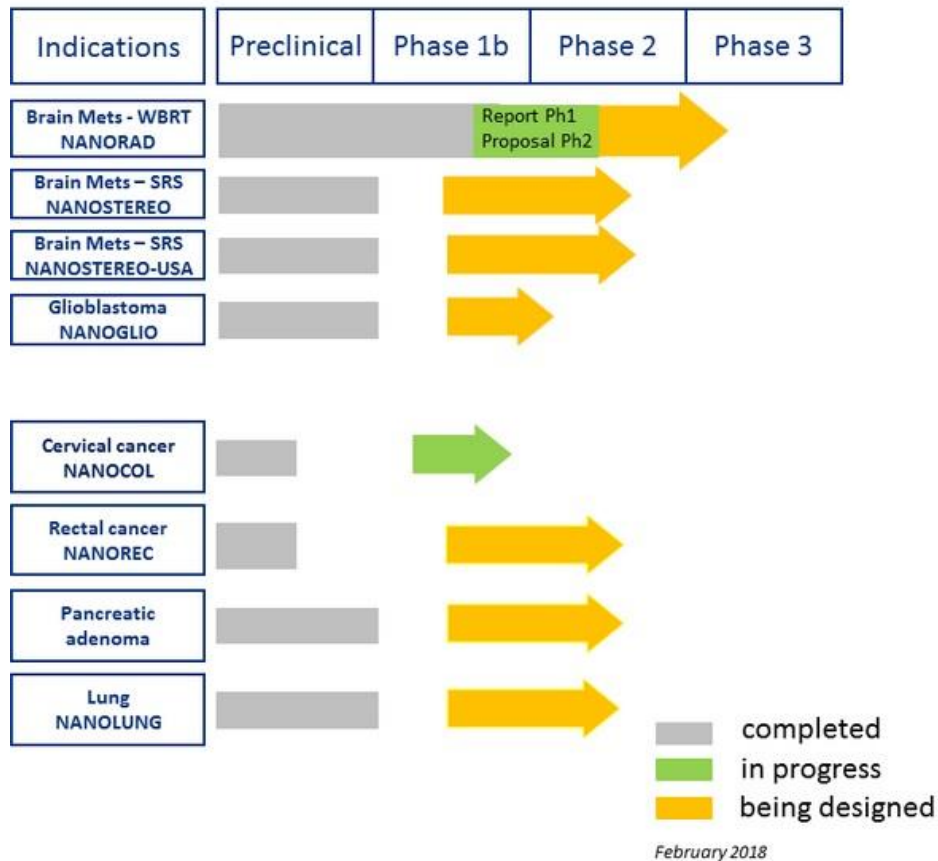


Figure 22 : Essais précliniques et cliniques des nanoparticules AGuIX® selon le type de tumeur.

### ➤ NBTXR3®

Hensify® (NBTXR3) produit par la firme Nanobiotix est une solution aqueuse de nanoparticules inorganiques d'oxyde d'hafnium (HfO<sub>2</sub>) dont le diamètre en TEM est de 50 nm.<sup>117</sup>

Ce produit est injecté par voie intratumorale mais est développé aussi sous forme de gel pour une utilisation en postopératoire. Plusieurs essais cliniques dans différents cancers sont actuellement en cours (Figure 23).<sup>117</sup>



## Introduction générale

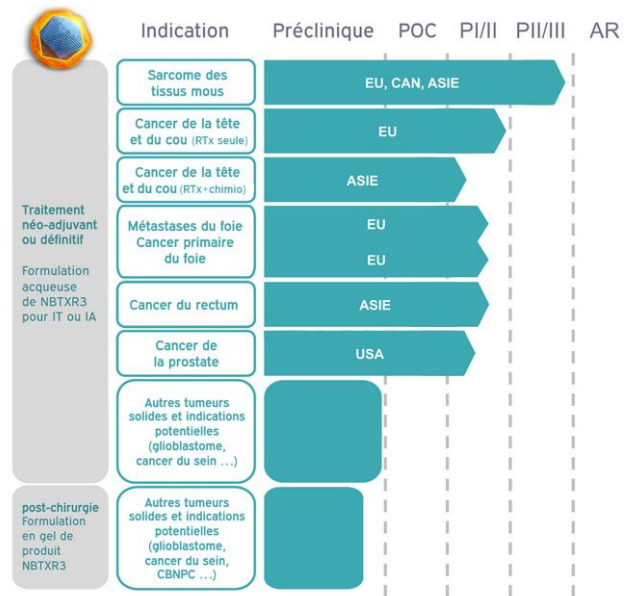


Figure 23 : Essais précliniques et cliniques des nanoparticules NBTXR3® dans différents cancers.

Le 4 avril 2019, la nanoparticule NBTXR3 a obtenu le marquage CE pour son utilisation dans le traitement des sarcomes des tissus mous localement avancés ce qui permet sa commercialisation dans les pays de l'UE.<sup>117</sup>

Les essais cliniques avancés sur ces deux nanoparticules et les preuves de concept associées montrent le grand intérêt des radiosensibilisateurs sous forme de nanoparticules.

### 4.3.2.1.1 L'intérêt du bismuth pour la radiosensibilisation

Nous avons investigué dans notre travail l'intérêt de nanoparticules de bismuth métallique comme radiosensibilisateurs. Le bismuth a été décrit comme un élément biocompatible ce qui encourage à l'utiliser dans des applications médicales.<sup>29,58,63,73</sup> Le bismuth ( $Z = 83$ ) est caractérisé par un numéro atomique plus élevé que l'hafnium ( $Z = 72$ ) et le gadolinium ( $Z = 64$ ) mais surtout la densité en atomes à  $Z$  élevé est beaucoup plus importante dans une nanoparticule de bismuth métallique en comparaison à NBTXR3® ou AGuIx®.

Ces deux caractéristiques pourraient conférer un avantage en termes d'efficacité de radiosensibilisation de nanoparticules de bismuth métallique. Quelques études publiées durant cette thèse ont décrit des preuves de concept précliniques quant à l'utilisation de nanoparticules de bismuth métallique pour sensibiliser la radiothérapie<sup>58,81,124-125</sup> ou pour d'autres applications théranostiques<sup>58,63,67,118</sup>.



### 5 Présentation du manuscrit

Le travail de cette thèse va être présenté en cinq chapitres. Le premier chapitre décrit l'optimisation de la synthèse de nanoparticules de bismuth métallique en procédé non continu en appliquant les principes de la nanochimie verte. Des optimisations au niveaux des réactifs, des conditions de chauffage et de la purification ont été réalisées et les nanoparticules obtenues ont été caractérisées par différentes techniques.

Dans le second chapitre, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de différentes synthèses en procédé continu. Deux synthèses ont été développées : la première sous irradiation microondes et l'autre sous chauffage thermique conventionnel. Les nanoparticules obtenues ont été caractérisées par différents techniques et des études de stabilité colloïdale et chimique sous différentes conditions ont été réalisées.

La surface de la nanoparticule a été modifiée dans le troisième chapitre par un échange de ligand afin d'améliorer la stabilité colloïdale en milieu physiologique. La première étape a consisté à identifier un agent de revêtement ayant une forte interaction avec la surface de la nanoparticule. Ensuite, une fonctionnalisation de l'agent de revêtement a été réalisée pour obtenir des nanoparticules hydrophiles ou hydrophobes.

La quatrième partie s'est intéressée à la formulation des nanoparticules dans des émulsions. Pour se faire, différents couples huile/tensio-actif et différentes techniques d'émulsification ont été mises en œuvre.

Le dernier chapitre décrit le protocole expérimental et les résultats préliminaires de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules de bismuth métallique.



# Chapitre 1 : Optimisation de la synthèse en procédé non continu











## 1 Optimisation de la synthèse des nanoparticules de bismuth métallique en procédé non continu

Dans ce chapitre, nous allons discuter des résultats concernant l'optimisation de la synthèse des nanoparticules de bismuth métallique en procédé non continu. Le but de cette optimisation est d'obtenir un protocole robuste et reproductible afin de concevoir ultérieurement un procédé en flux continu pour une montée en échelle. Cette optimisation a été menée en quatre parties comme illustré dans la figure 24.



Figure 24 : Etapes de l'optimisation de la synthèse verte en système non continu des nanoparticules de bismuth métallique.

L'optimisation de la synthèse a été effectuée en monitorant les deux paramètres suivants :

- Le taux de réduction du Bi(III) en Bi(0) par mesure du pH.
- Le diamètre des nanoparticules. Cette mesure a été effectuée par la diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour avoir rapidement accès à une information sur la taille (en comparaison à la TEM). Nous nous sommes basés sur les diamètres en DLS exprimés en nombre pour analyser les résultats.

### 1.1 Choix du solvant et du réducteur

Nous avons sélectionné l'eau en tant que solvant. En effet, l'eau est un solvant vert<sup>82</sup> et il est intéressant de s'affranchir de tout solvant organique dans la perspective d'une utilisation médicale des nanoparticules de bismuth (les résidus de solvants organiques peuvent poser des problèmes en termes de toxicologie).<sup>119</sup> Comme analysé dans l'introduction, peu de synthèses de nanoparticules de bismuth métallique sont décrites en milieu aqueux.<sup>13</sup>

Le choix de l'eau comme solvant impose d'utiliser à la fois un précurseur de Bi(III) et un réducteur solubles dans l'eau.

En conséquence, le choix du réducteur s'est fait suivant deux critères :



- Faible toxicité (ce qui a conduit à éliminer le  $\text{NaBH}_4$ , le borane morpholine, l'hydrazine, l'hydruide de sodium, le triéthyl-borohydrure de lithium).
- Bonne solubilité dans l'eau.

Nous nous sommes alors concentrés sur l'utilisation de réducteurs solubles dans l'eau comme l'acide citrique, l'acide ascorbique ou le D-glucose qui ont été utilisés dans la littérature pour la synthèse de nanoparticules métalliques en particulier pour la synthèse de nanoparticules d'or. Notre choix s'est arrêté sur le D-glucose parce que ce composé est non toxique, biosourcé et est donc parfaitement compatible avec une synthèse *via* un procédé vert. Dans la littérature décrivant la synthèse de nanoparticules de bismuth métallique qui est récapitulée dans l'introduction, le D-glucose n'a jamais été utilisé comme agent réducteur mais comme agent de revêtement afin de stabiliser les nanoparticules.<sup>65</sup>

Le pouvoir réducteur du D-glucose dépend du pH de la solution. En effet, comme le montre le diagramme de Pourbaix, son pouvoir réducteur est plus élevé à des pH basiques (Figure 25).

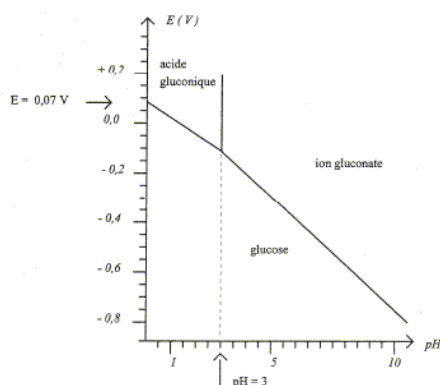


Figure 25: Diagramme de Pourbaix du D-glucose.

Ne connaissant pas les potentiels oxydo-réducteurs des différents sels de Bi(III) que nous voulions tester (comme expliqué dans l'introduction), le pH initial de nos réactions a été fixé à 14 afin de maximiser la capacité réductrice du D-glucose.

Pour bien expliquer la réaction d'oxydoréduction qui se produit, les deux demi-équations rédox ont été reportées ci-dessous. La demi-équation d'oxydation du D-glucose montre que le D-glucose se transforme en acide gluconique lors de son oxydation (Schéma 1, équation 2).<sup>120</sup> Par conséquent, la réaction chimique de réduction du sel de Bi(III) est la suivante (Schéma 1, équation 3) :



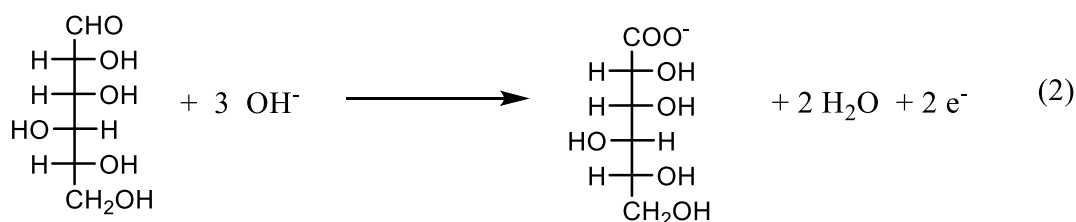
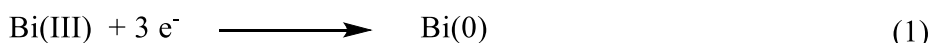


Schéma 1: équation d'oxydoréduction du sel de bismuth par le D-glucose.

Ces équations montrent que la réduction totale de Bi(III) en Bi(0) nécessite un rapport stœchiométrique de D-glucose / Bi(III) de 1,5 et s'accompagne d'une consommation de 4,5 ions hydroxydes. Par conséquent, une simple mesure du changement de pH pendant la réaction peut être utilisée pour évaluer la conversion de la réduction. Ce type de mesure du pH est très intéressant car il peut permettre d'envisager un suivi de conversion de la réduction en ligne, ce qui permet de respecter le cinquième principe (efficacité du matériel utilisé : voir introduction) de la nanochimie verte.<sup>6</sup>

Le pH final, correspondant à une réduction totale de Bi(III) en Bi(0) en fonction de la concentration de bismuth et du pH initial, est évalué à partir des équations suivantes (Figure 26).

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Dissociation de l'eau

$$[\text{OH}^-]_{\text{initiale}} = 10^{-14}/[\text{H}^+]_{\text{initiale}}$$

$$[\text{H}^+]_{\text{final}} = [\text{H}^+]_{\text{initiale}} - [\text{HO}^-]_{\text{consommé}}$$

Avec les trois équations au-dessus, on obtient cette formule pour calculer le pH théorique

$$\text{pH}_{\text{final}} = -\log \frac{10^{-14}}{\frac{10^{-14}}{10^{-\text{pH}_{\text{initiale}}}} - [\text{HO}^-]_{\text{consommé}}}$$

$[\text{HO}^-]_{\text{lconsommé}}$  Correspond à  $4.5 * [\text{Bi(III)}]$ , cela donne

$$\text{pH}_{\text{final}} = -\log \frac{10^{-14}}{\frac{10^{-14}}{10^{-\text{pH}_{\text{initiale}}}} - 4.5 * [\text{Bi(III)}]}$$

Figure 26: Démonstration de la formule du saut de pH.



Le graphe suivant montre les variations de pH attendues théoriquement pour une réduction totale du Bi(III) en Bi(0) en fonction du pH allant de 12,7 à 14 (Figure 27).

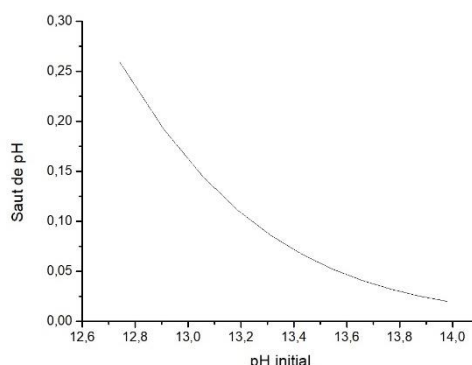


Figure 27 : Evolution du saut de pH selon le pH initial allant de 12,7 à 14.

Les données calculées sur la figure 27 montrent que le pH initial ne doit pas être choisi en dessous de 12,7 pour éviter une forte acidification lors de la synthèse. En effet, au départ si le pH initial est inférieure à 12,7, le pH de la solution à la fin de la réduction du Bi(III) sera d'environ de 5. Or à ce pH, les nanoparticules de bismuth se dégradent par dissolution. Par conséquent, la plage de pH utilisable dans notre synthèse a été fixée entre  $12,7 < \text{pH} < 14$  pour assurer un pH final basique permettant de gérer la stabilité des nanoparticules de bismuth. Comme mentionné ci-dessus, nos premières expériences ont été réalisées à partir d'un pH initial fixé à 14 pour bénéficier du pouvoir réducteur maximal du D-glucose. Le seul inconvénient est qu'à ce pH, le suivi de la réaction est plus difficile par pH-mètre car le saut de pH est plus faible (0,03).

### 1.2 Choix d'un précurseur Bi(III)

Dès que le système réducteur et le solvant ont été fixés, nous nous sommes intéressés au choix du précurseurs Bi(III).

Nous avons choisi de partir d'un précurseur avec un degré d'oxydation de III. Notre choix sur cet état d'oxydation du bismuth s'explique par l'apport énergétique plus faible nécessaire pour passer de Bi(III) à Bi(0) par rapport au passage de Bi(V) à Bi(0). En effet, le Bi(III) est observé comme intermédiaire dans la réduction du Bi(V) en Bi(0).<sup>41</sup> Le choix du Bi(III) par rapport au Bi(V) permettra donc théoriquement d'utiliser des conditions plus douces (réducteur moins puissant ou conditions de chauffage moins énergétiques).

Les caractéristiques du précurseur en termes de solubilité sont importantes. Dans la mesure où nous avons choisi l'eau comme solvant, le précurseur de Bi(III) doit être soluble dans l'eau



pour ne pas complexifier la cinétique de la réaction avec un processus hétérogène (source de difficultés potentielles en termes de reproductibilité) mais aussi pour envisager ultérieurement un procédé en flux continu (Chapitre 2).

La solubilité aqueuse a donc été étudiée par observation visuelle de différents sels de bismuth (III) : chlorure de bismuth, acétate de bismuth, nitrate de bismuth, citrate d'ammonium et de bismuth  $[(\text{NH}_3)_3\text{Bi}(\text{Cit})_2]$  et citrate de bismuth et de sodium (NaBiCit) dans une solution aqueuse (10 mM) à pH=14 (pH initial de nos réactions). Les résultats de ces observations de solubilité sont présentés dans le tableau 7.

Sels de Bi(III)	BiCl <sub>3</sub>	BiAc <sub>3</sub>	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Bi <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	$[(\text{NH}_3)_3\text{Bi}(\text{Cit})_2]$	NaBiCit
Solubilité dans une solution aqueuse à pH=14 à 10 mM	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui

Tableau 7: Solubilité des sels de Bi(III) à pH=14.

Les deux précurseurs solubles à pH=14 à 10 mM sont le citrate de bismuth et d'ammonium et le citrate de bismuth et de sodium. Le précurseur citrate de bismuth et de sodium a été sélectionné (Figure 28) par souci d'économie d'atome (absence de cation ammonium).

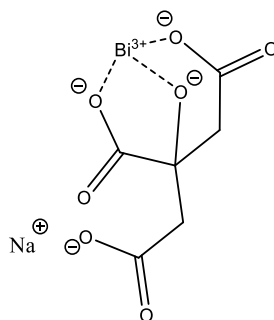


Figure 28: Citrate de bismuth et de sodium.

Le citrate de bismuth et de sodium est un précurseur qui convient parfaitement à une synthèse verte car il assure une économie d'atome parfaite (en absence de cation ammonium). En effet, le contre-ion citrate peut jouer le rôle d'agent de revêtement de la nanoparticule comme démontré pour les nanoparticules d'or.<sup>121</sup> De plus, le citrate peut être biosourcé à partir de la bactérie *Yarrowia Lipolytica*, ce qui répond aux critères de la nanochimie verte.<sup>122</sup>



### 1.3 Mode d'apport d'énergie

#### 1.3.1 Synthèse en chauffage thermique conventionnel

Dans un premier temps, la synthèse des nanoparticules a été réalisée en chauffage thermique conventionnel en faisant varier la température de la réaction (Schéma 2).

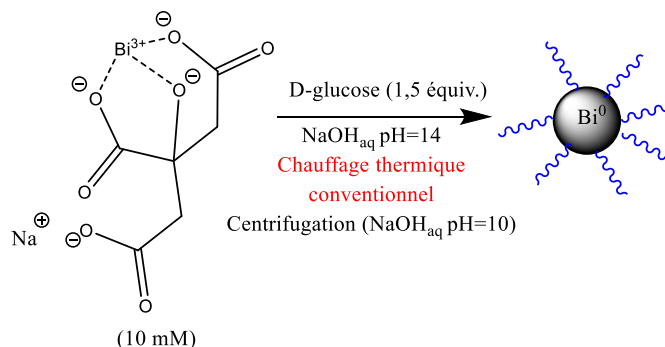


Schéma 2 : Synthèse de nanoparticules de bismuth par chauffage thermique conventionnel.

Le citrate de bismuth et de sodium (10 mM) est solubilisé à température ambiante dans la soude à pH=14. Le D-glucose est ensuite ajouté, la solution est chauffée thermiquement avec un contrôle du pH toutes les 30 minutes.

Ces expériences préliminaires nous ont montrés que les conditions réactionnelles sélectionnées ci-dessus nous permettaient d'obtenir des nanoparticules de bismuth en raison de l'apparition d'une coloration noire, d'un saut de pH et grâce au suivi par DLS (voir infra).

Le tableau 8 illustre le temps de réaction nécessaire, selon la température, pour obtenir un saut de pH complet correspondant à une réduction totale du  $\text{Bi(III)}$ .

Essais	Température de réaction (°C)	Temps (heure)	Saut de pH
1	80	3,5	Complet
2	120	2,5	Complet

Tableau 8: Conditions expérimentales en chauffage thermique conventionnel pour la synthèse de nanoparticules de bismuth.

Comme le montre le tableau 8, la réaction est significativement plus rapide à 120 °C. A la fin de la réaction, les nanoparticules sont purifiées par centrifugation. Au cours de la purification, le pH a été identifié comme un paramètre important qui jouait sur la stabilité des nanoparticules. Afin d'identifier la zone de pH assurant la meilleure stabilité des nanoparticules, la mesure du potentiel zêta en fonction du pH a été réalisée après purification par centrifugation (Figure 29).



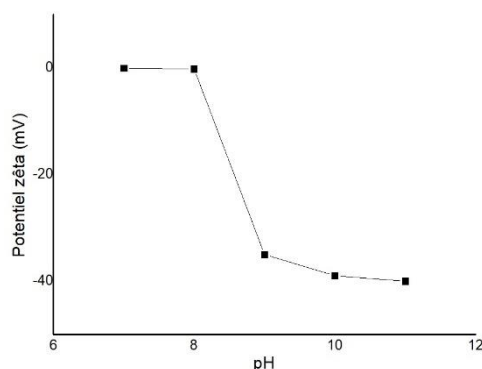


Figure 29: Potentiels zêta des nanoparticules de bismuth selon le pH de la solution.

Dans la littérature, il est référencé que lorsque les nanoparticules ont un potentiel zêta supérieur à + 30 mV ou inférieur à -30 mV, elles sont considérées comme stables.<sup>123</sup> En conséquence, les mesures du potentiel zêta aux différents pH montrent une zone de stabilité de nos nanoparticules de bismuth dans une gamme de pH comprise entre 9 et 11. Afin d'avoir des nanoparticules stables, le pH de la solution finale obtenu après la réduction a donc été abaissé de 13,6 à 10 avant la purification par centrifugation. Pour diminuer la basicité, deux acides ont été testés l'acide nitrique et l'acide chlorhydrique (HCl). Le second n'a pas été retenu en raison de son pouvoir floculant qui favorise une sédimentation rapide.<sup>124</sup> À l'issue de la purification, le diamètre des nanoparticules de bismuth obtenues sous un chauffage thermique conventionnel à 120 °C a été mesuré par DLS (Tableau 9).

Diamètres (nm) en nombre (proportions %)	Size Distribution by Number
94±22 (65%)	
222±89 (35%)	

Tableau 9: Données et graphe des diamètres (DLS) des nanoparticules obtenues en en chauffage thermique conventionnel.

Les nanoparticules de bismuth obtenues sont polydisperses et caractérisées par une distribution bimodale (Tableau 9). La déviation standard mentionnée dans le tableau ( $\pm xx$ ) et dans la suite du manuscrit correspond à l'écart-type de la distribution par rapport à la moyenne. Il sert à mesurer la dispersion d'un ensemble de données et plus il est faible, plus les valeurs sont regroupées autour de la moyenne.



Les réactifs et le solvant sélectionnés sont intéressants du point de la chimie verte mais les conditions de chauffage thermique ne sont pas idéales. La synthèse est longue et énergivore avec une température de réaction au-dessus du point d'ébullition de l'eau ce qui provoque une augmentation de la pression et nécessite l'utilisation d'un tube scellé. Ces conditions sont potentiellement dangereuses surtout dans le cadre d'une future montée en échelle.

L'utilisation de l'irradiation microondes comme mode de chauffage a donc été envisagée notamment pour sécuriser la synthèse et pour améliorer les conditions réactionnelles d'obtention des nanoparticules de bismuth.

### 1.3.2 Chauffage sous irradiation microondes

Comme explicité dans l'introduction, l'obtention de nanoparticules monodisperses nécessite que le mélange (transport de masse) et le chauffage (transport de chaleur) soient contrôlés de manière très précise afin que tous les nucléi se forment et se développent dans un environnement chimique homogène (notamment pression, température du mélange réactionnel et concentration des réactifs).

Pour respecter ces critères, un chauffage sous irradiation microondes a été choisi. Le but était d'avoir un chauffage du milieu réactionnel qui soit très homogène et très rapide et de fournir des conditions idéales de préparation de nanoparticules monodisperses.

#### 1.3.2.1 Utilisation de l'irradiation microondes à température fixe

Au laboratoire, l'appareil microonde (CEM Discover Labmate) peut être utilisé suivant deux modes distincts : le premier permet de fixer la température (la puissance varie pour stabiliser la température) et le second permet de fixer la puissance (la température augmente jusqu'à une température de consigne).

La température du microonde a été fixée à 80 °C, 100 °C ou à 120 °C pour comparer le chauffage sous irradiation microondes et le chauffage thermique conventionnel (Schéma 3). La purification des nanoparticules de bismuth obtenues dans ces essais a été réalisée par centrifugation.



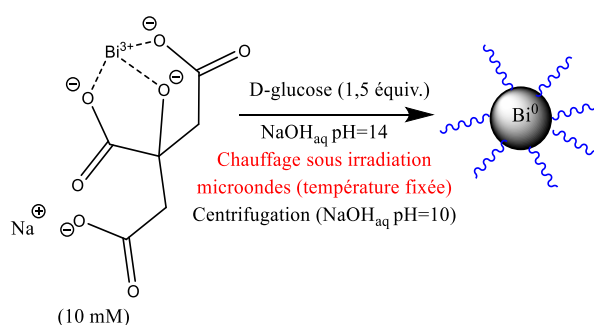


Schéma 3: Synthèse des nanoparticules de bismuth sous irradiation microondes à température fixe.

Mode de chauffage	Température (°C)	Temps de réaction	Saut de pH	Diamètres (nm) en nombre (proportions %)
Thermique conventionnel	120	2 h 30	Complet	94±22 (64%) 222±89 (35%)
Irradiation microondes	80	5 min	Incomplet	N.D.
	100	2 min	Complet	620±121 (100%)
	120	1 min	Complet	924±201 (62%) 283±46 (38%)

Tableau 10: Comparatif des diamètres des nanoparticules de bismuth synthétisées sous irradiation microondes en fixant la température et par chauffage thermique conventionnel.

De façon surprenante, les diamètres obtenus sous irradiation microondes à température fixe sont plus élevés que ceux obtenus par chauffage thermique conventionnel comme le montre le tableau 10. Nous avons alors décidé de travailler sous irradiation microonde en mode puissance fixe. On peut d'ailleurs noter que les quelques travaux utilisant l'irradiation microonde pour préparer des nanoparticules de bismuth utilisent tous ce mode puissance fixe sans d'ailleurs le justifier.<sup>41,44,79</sup>

### 1.3.2.2 Utilisation de l'irradiation microonde en mode puissance fixe

Après plusieurs essais préliminaires, les puissances de 100 W, 75 W et 50 W ont été sélectionnées avec une température de consigne de 120 °C (Schéma 4). Les temps de réaction ne sont pas fixés, ils sont directement corrélés à la puissance et à la température de consigne maximum. La purification des nanoparticules de bismuth obtenues dans ces essais a été réalisée par centrifugation.



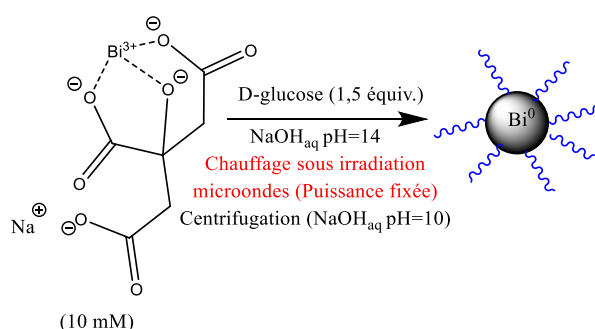


Schéma 4 : Synthèse de nanoparticules de bismuth sous irradiation microondes en mode puissance fixe.

Essais	Puissances fixées (W)	Temps	Températures de consigne (°C)	Saut de pH	Diamètres (nm) en nombre (proportions %)
1	100	2 min	120	Complet	757±158 (99.7%) 5414±650 (0.3%)
2	75	2 min 10	120	Complet	115±34 (82%) 315±87 (17%)
3	50	3 min 30	120	Complet	122±16 (15%) 196±39 (30%) 476±248 (55%)

Tableau 11: Diamètres des nanoparticules de bismuth obtenues sous irradiation microondes à différentes puissances fixées.

Comme le montre le tableau 11, selon la puissance utilisée lors de la synthèse, les diamètres varient considérablement. En effet, à une puissance de 100 W, les nanoparticules ont des diamètres de 750 nm et ne sont pas stables : elles s'agglomèrent et sédimentent très rapidement. A 75 W, les nanoparticules obtenues sont plus intéressantes, elles se répartissent en deux populations dont la majoritaire est centrée sur 115 nm. Par contre à 50 W, les nanoparticules sont plus polydisperses et caractérisées par une distribution en trois populations.

### 1.3.2.3 Comparaison du mode chauffage thermique conventionnel et sous irradiation microondes à une puissance fixe

Les deux résultats les plus intéressants de cette étude de comparaison des modes de chauffage sont résumés dans le tableau 12 :



Mode de chauffage	Conditions de synthèse	Diamètres (nm) en nombre (proportions %)
Thermique conventionnel	2 h 30 à 120 °C	94±22 (64%) 222±89 (35%)
Irradiation microondes	75 W pendant 2 min 10	115±34 (82%) 315±87 (17%)

Tableau 12: Comparatif des diamètres des nanoparticules de bismuth selon le mode de chauffage : thermique ou sous irradiation microondes en mode puissance fixe.

En conclusion, les synthèses par chauffage thermique conventionnel (120 °C, 2h 30) ou sous irradiation microondes à une puissance fixe de 75 W donnent des nanoparticules de bismuth avec des distributions de population bimodales du même ordre de grandeur. La synthèse sous irradiation microondes présente des avantages évidents en termes de rapidité et d'économie d'énergie (75 W, 2 min 10).

#### 1.4 Modification de la concentration du citrate de bismuth et de soude

Les concentrations en citrate de bismuth et en soude ont été fixées initialement à 0,01 M et 1 M respectivement (Tableau 13, entrée 1). Nous avons essayé d'augmenter les concentrations initiales en réactifs dans le but d'obtenir une plus grande productivité. Les conditions expérimentales sont illustrées dans le schéma 5.

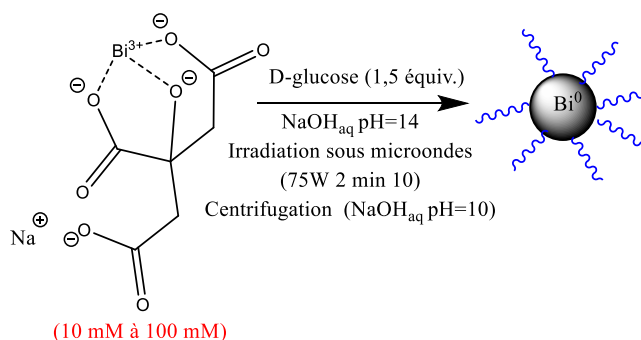


Schéma 5 : Synthèse de nanoparticules de bismuth en modifiant la concentration de citrate de bismuth.

Les résultats obtenus ont été réunis dans le tableau ci-dessous (Tableau 13).

Entrées	[BiCit], mM	[NaOH], M	Saut de pH	Diamètres (nm) en nombre
---------	-------------	-----------	------------	--------------------------



				(proportions %)
1 [Initiale]	10	1	Complet	115±34 (82%)
				315±87 (17%)
2	100	1	Incomplet	N.D.
3	100	5	Complet	N.D.

Tableau 13: Modification des concentrations en citrate de bismuth et en soude.

Avec une concentration en soude de 1 M et une concentration de citrate de bismuth et de sodium de 100 mM, la réduction n'est pas totale car le pH final théorique n'est pas atteint au bout de 2 minutes 10 (Tableau 13, entrée 2). En revanche, avec une concentration de soude plus élevée (5 M), une conversion totale est obtenue après 2 minutes 10 (Tableau 13, entrée 3). Cependant, les nanoparticules obtenues ne sont pas redispersables, elles forment un amas qui sédimente au fond du réacteur microonde. En conclusion, la concentration en citrate de bismuth et de sodium est maintenue à 10 mM.

### 1.5 Choix de la purification

L'optimisation des paramètres dans la synthèse des nanoparticules est certes importante mais leur purification l'est tout autant car elle peut induire une déstabilisation des nanoparticules et avoir un impact important en termes de nanochimie verte.

Dans la littérature traitant de la synthèse des nanoparticules de bismuth métallique, trois techniques de purification sont utilisées : la centrifugation, la dialyse et la sédimentation dans un solvant organique. La centrifugation est la méthode la plus couramment utilisée et décrite. La dialyse est basée sur la variation de concentration entre les impuretés à l'intérieur et à l'extérieur du boudin de dialyse. Des sédimentations de nanoparticules dans l'éthanol sont aussi référencés mais elles ont l'inconvénient d'introduire un solvant organique dont nous cherchons à nous affranchir.<sup>33</sup>

Au laboratoire, deux méthodes de purification ont été utilisées et comparées : la centrifugation et l'ultrafiltration (Uf). Cette comparaison a été réalisée sur le même lot de nanoparticules obtenues suivant les conditions du schéma 6.



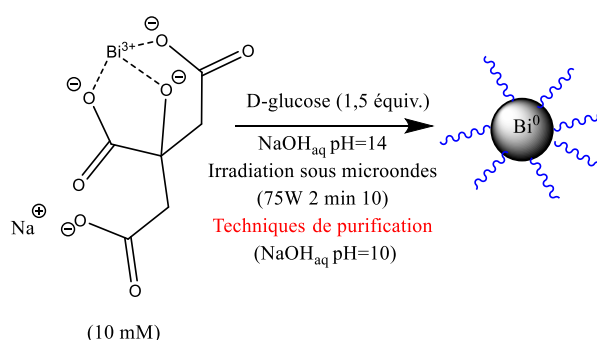


Schéma 6 : Synthèse de nanoparticules de bismuth utilisées pour comparer les techniques de purification (centrifugation et ultrafiltration).

L'élimination des espèces de faible poids moléculaire comme les sels, le gluconate et le citrate de sodium est suivie par la mesure de la conductimétrie du surnageant dans le cas de la centrifugation et du filtrat pour l'ultrafiltration. La figure 30 montre l'évolution de la conductimétrie selon les heures de l'ultrafiltration.

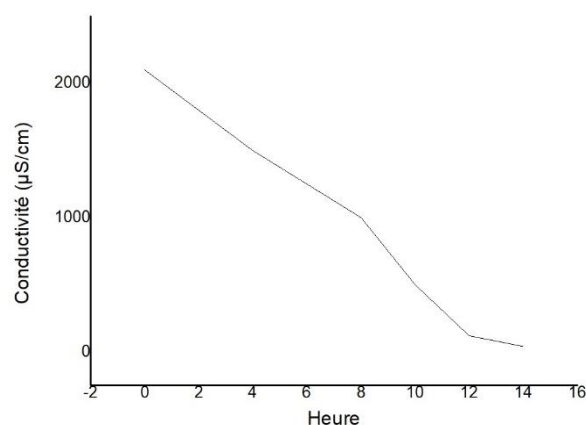


Figure 30: Evolution de la conductimétrie au cours l'ultrafiltration.

### 1.5.1 Centrifugation

Les nanoparticules sont centrifugées à pH=10 à 4000 tr/min en trois fois pour atteindre la conductivité de l'eau à pH=10 (40 µS/cm). Au total cela nécessite 1 heure 45 minutes de centrifugation.

Le tableau 14 montre que, suite à la purification par centrifugation, les nanoparticules sont polydisperses et caractérisées par deux populations. En effet, les nanoparticules se concentrent dans le culot du tube par la force centrifuge, ce qui peut provoquer une agglomération d'une partie des nanoparticules de bismuth.



Méthode de purification	Diamètres (nm) en nombre (proportions %)
Centrifugation	315±87 (17%)
	115±34 (82%)

Tableau 14: Diamètres des nanoparticules purifiées par centrifugation.

Il faut noter, qu'avec notre centrifugeuse, seules de petites quantités peuvent être purifiées et si l'on monte en échelle la dangerosité de cette technique en est accrue.

### 1.5.2 Ultrafiltration

Cette technique permet de purifier les nanoparticules par filtration sous pression. Les eaux de lavage sont éliminées en dehors de la cuve et les nanoparticules restent en dispersion dans la cuve (Figure 31).



Figure 31: Système d'ultrafiltration.

La durée totale de l'ultrafiltration reste longue (14 heures) pour obtenir une conductivité de 40  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (équivalente à une solution aqueuse de pH=10).

Méthode de purification	Temps de purification	Diamètres (nm) en nombre (Proportions %)
Centrifugation	1 h 45	315±87 (17%)
		115±34 (82%)
Ultrafiltration	14 h	115±31 (100%)

Tableau 15: Diamètres des nanoparticules de bismuth purifiées par centrifugation ou ultrafiltration.

De façon remarquable, l'ultrafiltration permet d'obtenir des nanoparticules monodisperses avec un diamètre moyen de 115 nm et permet sans doute de s'affranchir de l'agglomération induite par la centrifugation (Tableau 15).

En conséquence, l'ultrafiltration a été choisie comme technique de purification dans la suite de notre travail pour deux raisons :

- Elle permet d'obtenir des nanoparticules monodisperses.
- Elle est plus adaptée à une montée en échelle.



### 1.5.2.1 Sélection des filtres d'ultrafiltration

Une étude des différentes natures et porosités des filtres de l'ultrafiltration a été réalisée dans le but d'optimiser le temps de l'ultrafiltration.

Nature et diamètre du filtre (fournisseurs)	Diamètres (nm) en nombre (proportions %)	Temps de l'ultrafiltration (heure)
Cellulose régénérée 5 kDa (Merk®)	115±31 (100%)	14
Cellulose régénérée 30 kDa (Merk®)	Pas de diamètres mesurés	<2
Polyéthylène sulfone 5 kDa (Sodipro®)	195±86 (100%)	22

Tableau 16: Diamètres des nanoparticules de bismuth en faisant varier la nature et la porosité des filtres d'ultrafiltration.

La nature du filtre (cellulose régénérée 5 kDa ou polyéthylène sulfone 5 kDa) influence peu les diamètres des nanoparticules de bismuth obtenues (Tableau 16). Par contre, la sélection du seuil de filtration est importante. En effet, aucun diamètre de nanoparticules de bismuth n'a pu être mesuré avec un filtre 30 kDa car toutes les nanoparticules se sont adsorbées sur le filtre. Le filtre le plus intéressant dans ceux que nous avons testé est le filtre en cellulose régénéré 5 kDa (Merk®) en raison des temps d'ultrafiltration nécessaires pour obtenir une conductivité de 40  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (correspondante à une solution alcaline de pH=10).

### 1.6 Modification de la base

Trois bases LiOH, NaOH et KOH ont été testées pour étudier l'influence du contre ion sur le diamètre des nanoparticules de bismuth (Tableau 17). Les conditions expérimentales sont illustrées par le schéma 7.

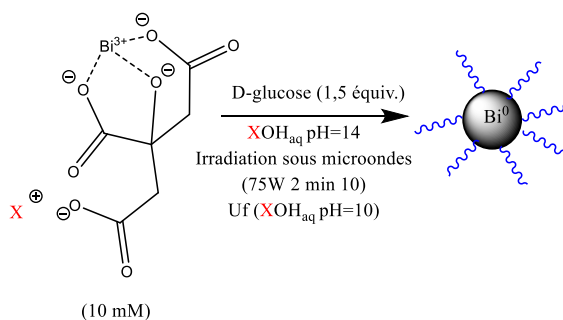


Schéma 7 : Synthèse de nanoparticules de bismuth en modifiant la base.



Base XO <sub>H</sub>	Diamètres (nm) en nombre (proportions %)
LiOH	106±87 (100%)
NaOH	115±31 (100%)
KOH	1694±866 (62%) 4945±718 (6%) 348±102 (32%)

Tableau 17: Diamètres des nanoparticules selon la base utilisée.

Le diamètre important des nanoparticules de bismuth obtenu avec KOH (>1 µm) peut s'expliquer par le pouvoir floculant accru du cation K<sup>+</sup>. Le pouvoir floculant d'un électrolyte est sa capacité à déstabiliser en un temps donné un colloïde. Il est connu dans la littérature que le pouvoir floculant est différent selon le cation utilisé (Figure 32).<sup>124</sup>

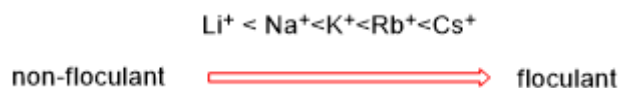


Figure 32: Pouvoir floculant des cations utilisés.

Aucune différence de diamètre ou de stabilité n'a par contre été observée avec de la lithine ou de la soude. Pour la suite de l'optimisation, la soude a été choisie parce que les ions Li<sup>+</sup> sont moins biocompatibles que les ions Na<sup>+</sup>.<sup>125</sup>

### 1.7 Reproductibilité

Après optimisation des différents paramètres (choix des réactifs, mode de chauffage et de purification), nous avons voulu nous assurer de la reproductibilité inter et intra expérimentateurs de notre synthèse (Schéma 8, Tableau 18).

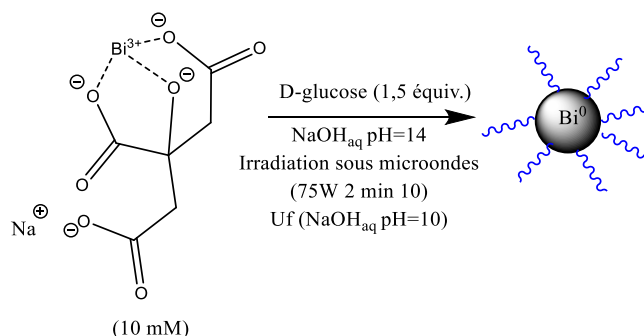


Schéma 8 : Synthèse de nanoparticules utilisée dans l'étude de reproductibilité.

Les résultats de l'étude de reproductibilité sont reportés dans le tableau 18. Chaque expérience a été effectuée plusieurs fois par deux expérimentateurs différents. Les moyennes de ces résultats sont présentées ci-dessous.



Expérimentateurs	Nombre d'essais	Diamètres (nm) en nombre (proportions %)
A	9	113±40 (100%)
B	3	127±30 (100%)

Tableau 18: Moyennes des diamètres des nanoparticules de bismuth synthétisées par deux opérateurs.

Tous les essais aboutissent à des résultats similaires, à savoir des nanoparticules de bismuth de diamètre moyen de 120 nm avec une distribution monomodale. En conséquence, ce protocole de synthèse est robuste et reproductible.

### 1.8 Stabilité des nanoparticules de bismuth en solution

La stabilité des nanoparticules de bismuth en solution aqueuse à une concentration de 1 mM a été étudiée par une évaluation du temps de sédimentation par observation visuelle. Les nanoparticules de bismuth issues de notre étude de reproductibilité sont stables 15 min à pH=10.

Pour tenter d'augmenter la stabilité, nous avons modifié (Tableau 19) :

- La formulation avec un excès de citrate. Après l'ajout du citrate, la solution est activée une minute sous irradiation microondes à 75 W (Schéma 9).
- Le pH initial de la réaction à la valeur de 13. Cette diminution du pH a été envisagée pour mieux contrôler le saut de pH (Figure 27) et préserver le matériel qui sera utilisé ultérieurement en procédé continu (voir chapitre 2).

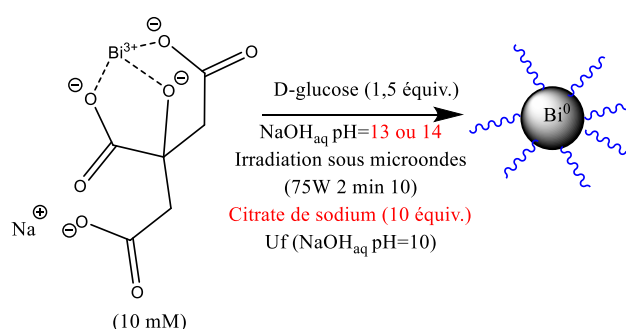


Schéma 9 : Formulation des nanoparticules avec 10 équivalents de citrate.



Entrées	pH initial	Citrate de sodium additionné en formulation (équiv.)	Temps de sédimentation (minutes)	Diamètres (nm) en nombre (proportions %)
1	14	0	15	113 ± 40 (100%)
2	14	10	45	113 ± 63 (100%)
3	13	0	60	72 ± 43 (100%)
4	13	10	180	96 ± 37 (100%)

Tableau 19 : Comparaison des stabilités et diamètres des nanoparticules de bismuth obtenues à pH=14 ou 13 et formulées ou non avec 10 équivalents de citrate de sodium.

La formulation avec un excès de citrate stabilise bien les nanoparticules de bismuth (Tableau 19, entrées 2 et 4). De façon remarquable, la modification du pH initial à 13 induit aussi une stabilisation des nanoparticules de bismuth (Tableau 19, entrées 3 et 4). L'effet est synergique puisque les nanoparticules de bismuth les plus stables sont celles synthétisées à pH=13 avec une formulation de dix équivalents de citrate de sodium (Tableau 19, entrée 4).

## 2 Caractérisations des nanoparticules obtenues suite à l'optimisation de la synthèse en procédé non continu

La caractérisation des nanoparticules a été réalisée à l'aide de plusieurs techniques complémentaires qui donnent des informations sur le diamètre et le revêtement des nanoparticules (le principe de chaque technique utilisée dans ce manuscrit est décrit en annexe 4).

La caractérisation exhaustive a été réalisée sur les nanoparticules de bismuth métallique issues de notre étude de reproductibilité (Tableau 18) et obtenues pour rappel dans les conditions illustrées dans le schéma 10.

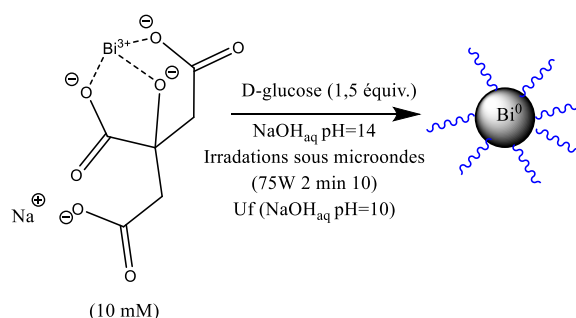


Schéma 10 : Synthèse des nanoparticules utilisées pour une caractérisation exhaustive.

### 2.1 Diamètres des nanoparticules

Deux techniques différentes utilisées dans ce travail permettent de donner des informations sur les diamètres des nanoparticules : la microscopie électronique en transmission (TEM) et la



diffusion dynamique de lumière (DLS). La taille TEM des nanoparticules est de  $11 \pm 1,5$  nm comme montre la figure 33.

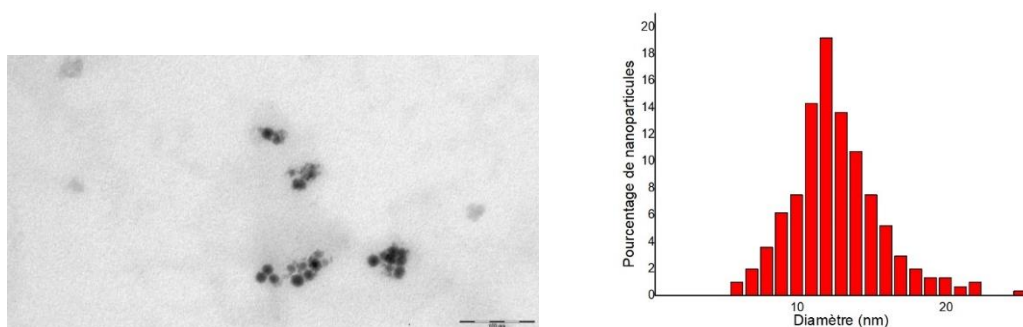


Figure 33: Photo et histogramme des diamètres TEM des nanoparticules de bismuth.

Par contre, la mesure DLS nous indique un diamètre de 113 nm. Cette différence entre la TEM et la DLS montre que lorsque les nanoparticules sont en solution, elles forment des agrégats stables d'environ 100 nm.

## 2.2 Techniques de caractérisation du cœur métallique de la nanoparticule par diffraction des rayons X (XRD)

Cette technique permet d'identifier la structure cristalline, d'obtenir les dimensions de la maille cristalline et une taille cristallographique des nanoparticules.<sup>126</sup>

Le spectre XRD (mettant en relation l'intensité du rayonnement X diffracté et l'angle où le rayonnement X a été diffracté) de nos nanoparticules est comparé avec le spectre théorique du bismuth métallique comme le montre la figure 34.

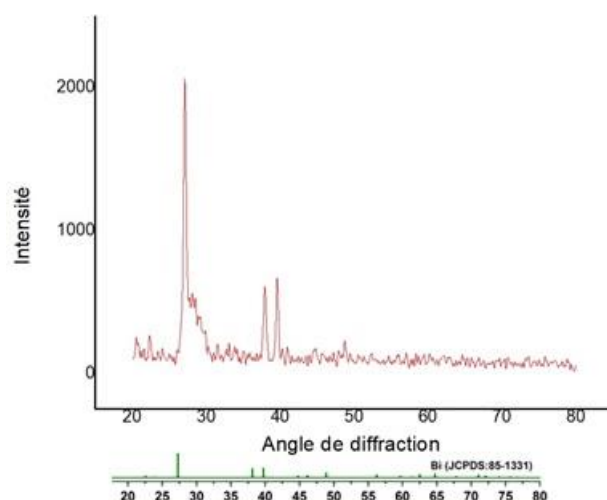


Figure 34: Spectre XRD des nanoparticules de bismuth métallique expérimental (au-dessus) et théorique (en-dessous).



Trois pics ressortent du spectre expérimental à  $27,5^\circ$  à  $38^\circ$  et  $39^\circ$ . Ces pics sont caractéristiques de la structure rhomboédrique du bismuth et leur présence permet de démontrer que le cœur des nanoparticules est bien du bismuth métallique.

Le diamètre cristallographique obtenu est 12,5 nm et est similaire au diamètre obtenu en TEM (11 nm).

### 2.3 Caractérisations de la surface des nanoparticules

Plusieurs techniques ont été utilisées pour caractériser la surface des nanoparticules. Ces techniques vont permettre de connaître la composition chimique qualitative de la surface des nanoparticules mais vont aussi permettre de mesurer les quantités d'agent de revêtement adsorbé sur les nanoparticules.

#### 2.3.1 Spectroscopie infrarouge

La figure 35 correspond aux spectres infrarouges de l'acide citrique et des nanoparticules.

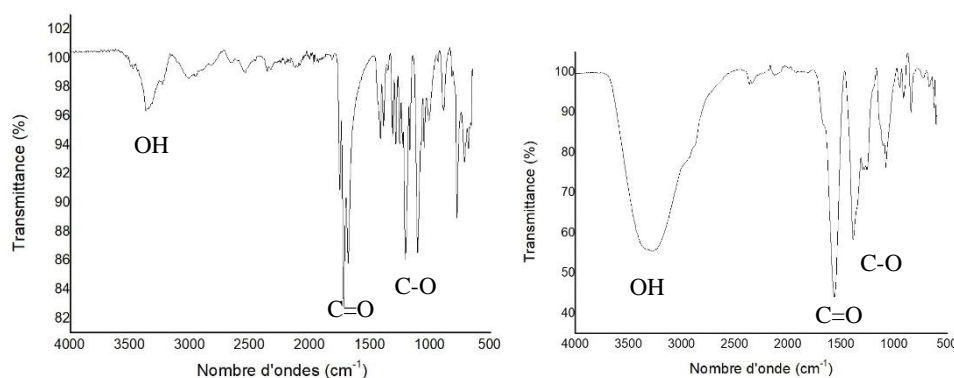


Figure 35: Spectres infrarouge de l'acide citrique (à gauche) et des nanoparticules de bismuth (à droite).

En comparant, les analyses infrarouges, une bande de vibration intense apparaît à  $3353\text{ cm}^{-1}$  relative aux groupements hydroxyles des acides carboxyliques et la présence d'eau. Des bandes à  $1554\text{ cm}^{-1}$  et à  $1380\text{ cm}^{-1}$  correspondent aux liaisons C=O et C-O respectivement. Compte tenu des similitudes entre les deux spectres infrarouges, l'acide citrique est bien présent à la surface des nanoparticules de bismuth.<sup>121</sup>



### 2.3.2 Analyse thermogravimétrie (TGA).

Cette technique permet de quantifier la quantité d'agent de revêtement présent sur la surface des nanoparticules.

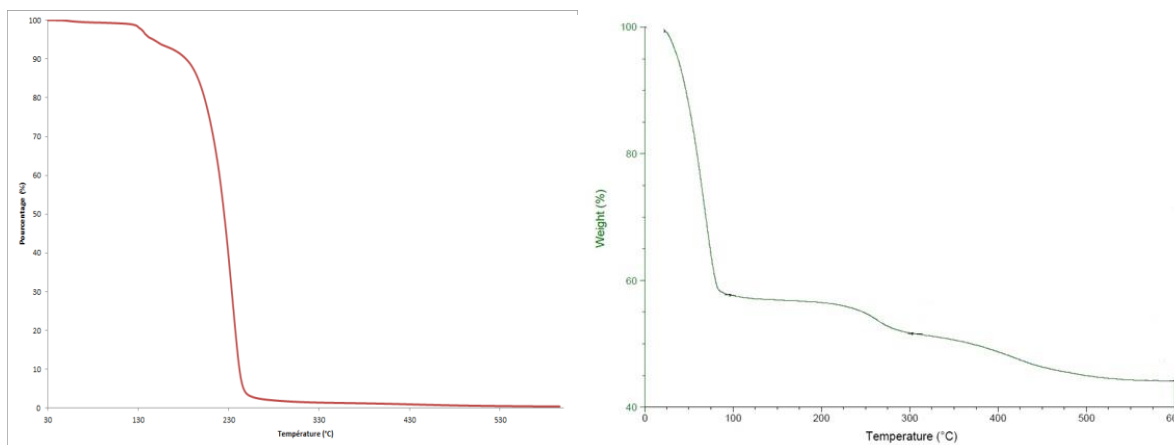


Figure 36: Spectre TGA de l'acide citrique (à gauche) et des nanoparticules de bismuth (à droite).

L'analyse TGA (Figure 36) montre trois pertes en masse, la première centrée sur 50 °C représente la perte d'eau (43%).<sup>121</sup> La deuxième perte de masse centrée sur 250 °C (6%) est caractéristique d'une perte de citrate comme montrée sur les nanoparticules d'or enrobées de citrate.<sup>121</sup> Enfin la perte de masse centrée sur 400 °C montre la présence d'une impureté non identifiée présente dans le précurseur citrate de bismuth et de sodium (Figure 37).

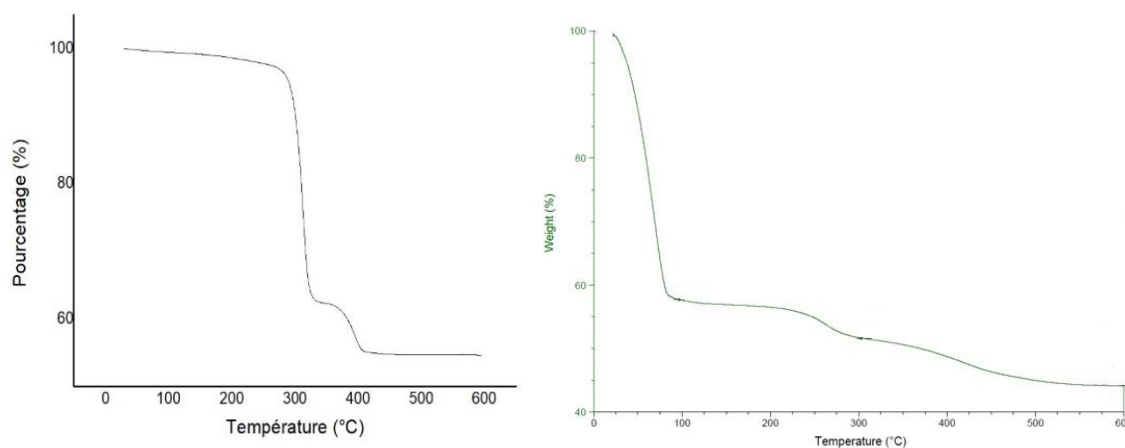


Figure 37 : TGA du citrate de bismuth et de sodium (à gauche) et des nanoparticules revêtues de citrate (à droite).

#### 2.3.2.1 Quantification du nombre de citrate sur la nanoparticule

Le nombre de molécules de citrate adsorbées par nanoparticule ( $n_{\text{ligand}}$ ) a été quantifié grâce à la thermogravimétrie en utilisant l'équation ci-dessous.



$$\frac{\text{Pourcentage massique de citrate (\%)}}{\text{Pourcentage massique de bismuth (\%)}} = \frac{n_{\text{ligand}} * M^{\text{ligand}}}{M^{\text{nanoparticule}}}$$

Où la masse moléculaire de la nanoparticule ( $M^{\text{nanoparticule}}$ ) a été calculé *via* l'équation suivante

$$M^{\text{nanoparticule}} = \rho * N_A * \frac{4}{3} * \pi * r_{\text{nanoparticule}}^3$$

Où  $N_A$  est le nombre d'Avogadro,  $\rho$  est la densité du bismuth (9790 kg/m<sup>3</sup>) et  $r$  est le rayon de la nanoparticule (5,5 nm estimé par TEM). Ce calcul permet d'aboutir à une valeur de nombre de molécules de citrate par nanoparticule ( $n_{\text{ligand}}$ ) de 2660 molécules. Si on rapporte ce nombre de citrate par nanoparticule à la surface de la nanoparticule en nm<sup>2</sup>, on obtient une densité surfacique de ligand de 7 citrates par nm<sup>2</sup>. Une estimation de cette densité a été effectuée par modélisation en évaluant la surface du citrate sur la nanoparticule. Le nombre de ligand varie entre 2 et 4 molécules par nm<sup>2</sup> selon le nombre d'acide carboxylique adsorbée à la surface (Figure 38). Une étude DOSY (Diffusion ordered spectroscopy) effectuée dans le chapitre suivant a démontré que le citrate n'a pas de fortes interactions avec la surface de la nanoparticule.

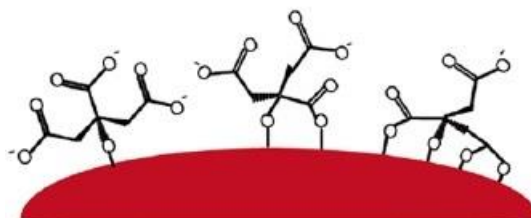


Figure 38: Modes de liaison possible du citrate adsorbé à la surface de la nanoparticule.

### 2.3.3 Spectrométrie de photon X (XPS)

La spectrométrie de photon X a permis de déterminer la composition surfacique des nanoparticules. L'analyse XPS de nos nanoparticules a montré que leur surface contenait du bismuth sous différentes formes : 75% d'oxyde de bismuth et 25% de bismuth métallique. Ce pourcentage a été calculé par rapport à l'air des pics de la figure 39.<sup>127</sup>



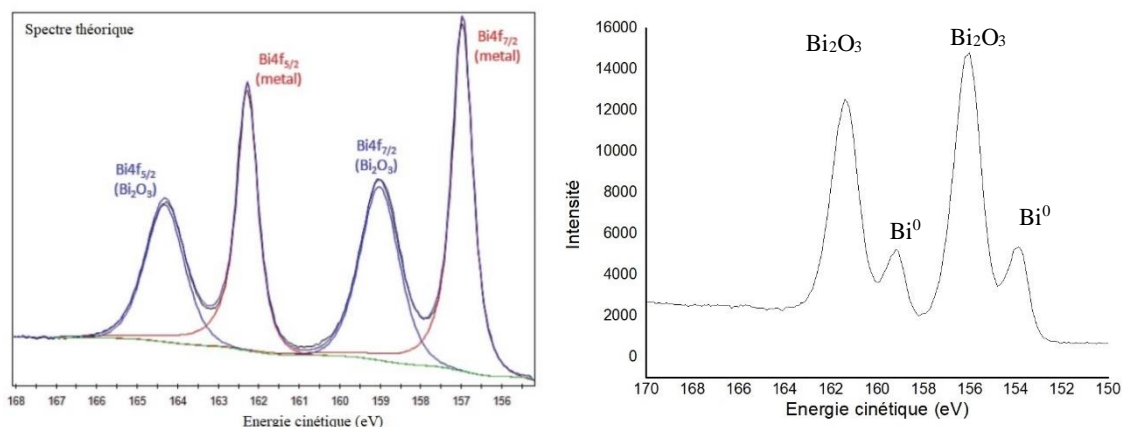


Figure 39: Spectre théorique de l'électron 4f du bismuth (à gauche) et le spectre expérimental de l'électron 4f du bismuth (à droite).

### 2.3.4 Spectroscopie UV-Visible

Le spectre UV-Visible des nanoparticules a été réalisé. La figure 40 montre que le spectre UV-Visible de nos nanoparticules est similaire à celui décrit dans la littérature et présente une bande plasmonique à 268 nm caractéristique des nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate.<sup>19</sup>

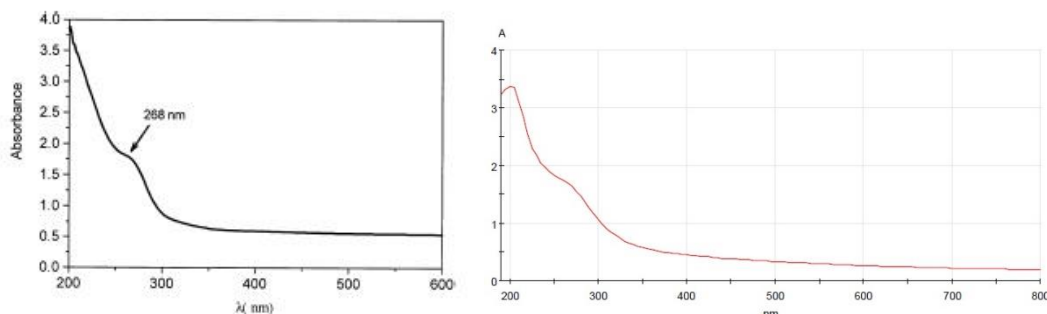


Figure 40: Spectre UV-Visible des nanoparticules par Fang et al.<sup>19</sup> (à gauche) et le spectre des nanoparticules synthétisées au laboratoire (à droite).

### 2.3.5 Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une nanoparticule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entourent quand elle est en suspension. La valeur du potentiel zêta permet de connaître la charge surfacique de la particule.

Le potentiel zêta de nos nanoparticules a été étudié en faisant varier le pH de la solution. Les pH acides induisent une dissolution de nos nanoparticules. Par conséquent, le potentiel zêta a été mesuré sur une gamme allant de pH=7 à pH=11 (Figure 41).



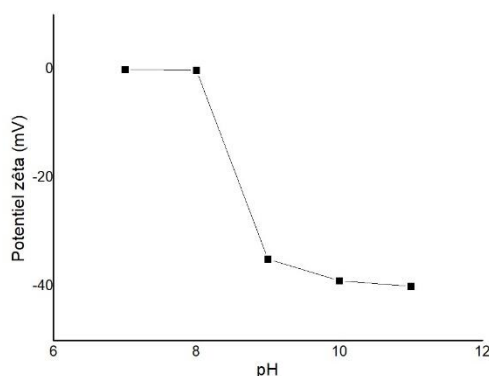


Figure 41: Mesures du potentiel zêta des nanoparticules enrobées de citrate.

Nous avons déjà commenté ce graphe en partie 1.3.1. Pour des pH proches de la neutralité le potentiel zêta est très proche de zéro, par conséquent, les nanoparticules ne sont pas stabilisées à ces pH.

#### 2.4 Rendement de formation des nanoparticules en bismuth et détermination de la concentration en nanoparticules

Nous avons évalué le rendement de formation des nanoparticules en bismuth. Pour cela, nous avons réalisé une dissolution oxydative des nanoparticules de bismuth métallique en ions Bi(III) dans une solution HCl 1 M sous irradiation microondes.<sup>128</sup> Les conditions expérimentales utilisées pour cette étape de dissolution sont illustrées dans le schéma 11.

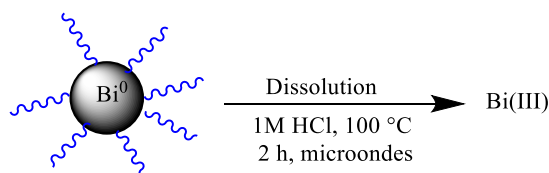


Schéma 11: Dissolution oxydative des nanoparticules de bismuth métallique.

Après cette étape de dissolution oxydative, le Bi(III) libéré a été quantifié par spectroscopie UV-Visible.

##### 2.4.1 Spectroscopie UV-Visible

Comme décrit par Faisal *et al.*, la molécule de dithizone (Figure 42) est utilisée pour complexer et ainsi doser le Bi(III) par spectroscopie UV-Visible dans une gamme de pH possible de 4 à 8.<sup>129</sup>



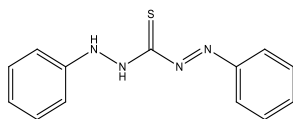


Figure 42: Molécule complexante de dithizone.

Un des problèmes de cette technique est la possibilité d'interférences avec le sodium (complexation du sodium par la dithizone). Pour que le dosage soit valide, la concentration de sodium doit être 100 fois inférieure à celles du bismuth.<sup>129</sup> Par conséquent, pour limiter la quantité de sodium, la mesure d'absorbance en UV-Visible est réalisé à pH=4 dans un tampon acétate.

Le dosage de bismuth mesuré par spectroscopie UV-Visible a par ailleurs été confirmé par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP) sur un lot de nanoparticules dissous (Tableau 20). La quantité de Bi(III) dosée a été rapportée à la quantité initiale de Bi(III) apportée sous forme de précurseur citrate de bismuth et de sodium pour déterminer le rendement de formation des nanoparticules.

Rendement en Bi(III) obtenu par dosage complexométrique en UV-Visible (%)	Rendement en Bi(III) obtenu par spectrométrie à plasma à couplage inductif (%)
94	95
98	97
96	98

Tableau 20: Comparaison des rendement en Bi(III) obtenus par spectroscopie UV-visible et ICP.

Comme le montre le tableau 20, le rendement de formation des nanoparticules en bismuth est quasi quantitatif ce qui est cohérent avec nos sauts de pH qui montraient une réduction totale du Bi(III) en Bi(0). Ce résultat démontre aussi l'efficacité de nos purifications par ultrafiltration puisque les pertes de bismuth sont très faibles.

### 2.4.2 Calcul de la concentration en nanoparticules dans les solutions finales

Le nombre de nanoparticules de bismuth N issu d'une solution 10 mM en précurseur est calculé à l'aide de l'équation suivante (en faisant l'hypothèse que les nanoparticules sont parfaitement sphériques).

$$N * \frac{4}{3} \pi r_{sph\grave{e}re}^3 * 0.524 = N_A * n \frac{4}{3} \pi r_{Bi}^3 * rdt$$



$r_{\text{sphère}}$  : rayon des nano sphères (5.5 nm en TEM)

0.524 : compacité d'une structure de type rhomboédrique

$N_A$  : nombre d'Avogadro

$n$  : nombre de moles d'atomes de bismuth introduit *via* le précurseur à 10 mM

$r_{\text{Bi}}$  : rayon atomique de bismuth (160 pm)

rdt : rendement estimé par spectroscopie UV-Visible et ICP

Le calcul nous donne un nombre de nanoparticule de bismuth  $N$  de  $1,36 \cdot 10^{15}$  pour 10 mM en précurseur. Ce calcul permet donc d'évaluer une concentration en nanoparticules de la solution finale de 45  $\mu\text{M}$  après l'ultrafiltration.

### 3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons optimisé la synthèse des nanoparticules de bismuth métallique en procédé non continu pour la rendre reproductible. Les choix des précurseurs, du solvant et du réducteur ont été dictés par les principes de la nanochimie verte. En effet, l'agent de revêtement et le réducteur doivent être non toxiques et biosourcés. En outre, ces composés sont solubles dans l'eau afin de faciliter le transfert avec un procédé continu.

L'utilisation du D-glucose comme réducteur permet de suivre la conversion du Bi(III) en Bi(0) en mesurant la diminution du pH provoquée par la réduction. Le suivi de la conversion par pH-métrie n'a pas été mis en évidence, à notre connaissance, dans la synthèse de nanoparticules.

Deux modes de chauffage ont été étudiés :

- Le chauffage thermique conventionnel : la réaction est réalisée dans un tube scellé à 120 °C pendant 2 h 30.
- L'irradiation sous microondes : la réaction est réalisée à 75 W durant 2 minutes 10

Les conditions microondes permettent de produire plus rapidement des nanoparticules de bismuth métallique monodisperses d'un diamètre DLS de l'ordre de 120 nm.

Après la synthèse, la purification est une étape cruciale car elle peut entraîner une déstabilisation des nanoparticules. La gamme de stabilité de nos nanoparticules s'étend de pH=9 à pH=11. En conséquence, l'ultrafiltration à pH=10 a été choisie comme technique de purification pour nos nanoparticules. De plus, cette technique ne pose pas de problème majeur dans la montée en échelle du procédé de synthèse.



Le dernier point de ce chapitre concerne la reproductibilité de cette synthèse qui a été validée en intra et inter opérateur. Ces résultats prouvent que la synthèse discutée dans ce chapitre est robuste et reproductible. Elle permet également d'obtenir des nanoparticules avec un cœur de bismuth métallique recouvert de citrate avec un rendement quasi quantitatif. Enfin, des tests de formulation ont été effectués en diminuant le pH et en augmentant la quantité de citrate pour faciliter le transfert de la synthèse vers un procédé continu.











## Chapitre 2 : du procédé non continu au procédé continu







## 1 Introduction

Nous avons montré dans le chapitre précédent qu'après optimisation, il était possible d'obtenir de façon reproductible des nanoparticules de bismuth métallique *via* un procédé non continu dont voici pour rappel les conditions de synthèse (Schéma 12).

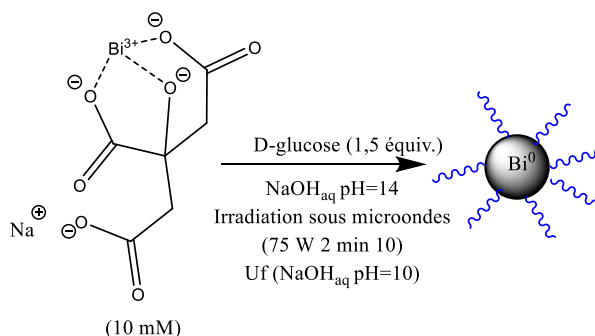


Schéma 12 : Conditions expérimentales utilisées en procédé non continu.

Néanmoins malgré les résultats présentés précédemment, ce procédé non continu reste peu productif. En effet, nous sommes capables de synthétiser au maximum 12 mg de nanoparticules de bismuth métallique par lot. Les principales limites en termes de productivité de ce procédé sont la dilution et le volume réactionnel du tube microonde qui limite la montée en échelle. Pour améliorer cette productivité, nous avons envisagé la synthèse de nanoparticules de bismuth métallique en flux continu.

### 1.1 Microfluidique et millifluidique : généralités

La synthèse de nanoparticules métallique en flux continu a été abordée par plusieurs équipes et a fait l'objet d'une revue récente.<sup>11</sup> Deux technologies de flux continu peuvent être distinguées pour ces synthèses : la microfluidique et la millifluidique. Néanmoins la distinction entre ces deux techniques reste ambiguë dans la littérature.

Ramashadi Makgwane *et al.* définissent la microfluidique par l'utilisation de réacteurs ayant des dimensions caractéristiques inférieures au millimètre (diamètres de canalisation entre 50 et 1000  $\mu\text{m}$ ) et un débit de l'ordre du microlitre.<sup>130</sup>

Lohse *et al.* définissent quant à eux, la millifluidique par l'utilisation de réacteurs ayant des dimensions caractéristiques supérieures au millimètre et des débits variant entre 1 et 100 mL/min. Des paramètres équivalents à ceux-là ont été utilisés dans le cadre de ce travail. En effet, le procédé en flux que nous avons mis au point utilise des débits supérieurs à 1 mL/min et un réacteur dont les dimensions caractéristiques sont supérieures au millimètre.<sup>131</sup>



D'après la littérature, le procédé en flux continu présente plusieurs avantages par rapport au procédé non continu pour la synthèse de nanoparticules métallique (Tableau 21).<sup>11</sup>

	Procédé	
	Non continu	Flux continu
Monodispersité	Large	Étroite
Qualité du mélange des réactifs	Bonne	Excellente
Ratio surface/volume du réacteur	Faible	Élevé
Qualité du transfert de masse et de chaleur	Modéré	Excellente
Montée en échelle	Modéré	Excellente
Reproductibilité	Modéré	Excellente

Tableau 21 : Comparaison du procédé non continu versus procédé en flux continu.

Le ratio surface/volume des réacteurs est très important en flux continu pour améliorer les échanges de chaleur et de matière. La qualité du mélange des réactifs et du transfert de masse ont aussi une influence considérable sur la monodispersité des nanoparticules obtenues, sur la reproductibilité des synthèses et sur la réduction des temps de réaction. Enfin l'un des principaux avantages de la synthèse en flux continu est de pouvoir envisager des montées en échelle.

Les travaux de Lohse *et al.* illustrent bien le potentiel d'amélioration de la synthèse en flux continu millifluidique par rapport au procédé non continu en termes de productivité et de caractéristiques physicochimiques des nanoparticules obtenues. Les conditions expérimentales utilisées par Lohse *et al.* sont résumées sur le schéma 13.

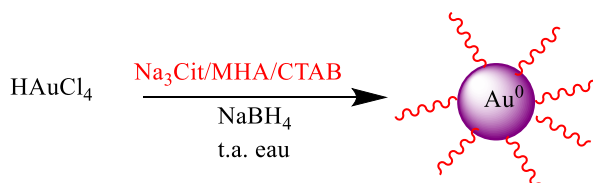


Schéma 13 : Synthèse de nanoparticules d'or décrites par Lohse *et al.*

Plusieurs avantages ont été mis en avant dans ce travail. Des nanoparticules d'or plus monodisperses revêtues d'acide 6-mercaptop hexanoïque (MHA) ou de bromure d'héxadécyl triméthyle ammonium (CTAB) ont été obtenues *via* la synthèse en flux continu.

Une montée en échelle associée à une reproductibilité *via* le procédé continu leur a permis de produire trois lots de 3,3 L de nanotubes d'or de diamètre identique au nanotubes synthétisés par un procédé non continu.<sup>2</sup>

Le dernier avantage de ce système est l'analyse en temps réel. En effet, il est possible de placer une cellule d'observation pour analyser les nanoparticules en spectroscopie UV-visible.



Ce suivi UV-visible permet d'étudier le mécanisme de formation des nanoparticules mais aussi d'avoir un contrôle qualité en temps réel.<sup>131</sup> La synthèse peut être arrêtée immédiatement si les nanoparticules n'ont pas les caractéristiques adéquates.

Ces données de la littérature nous ont donc incités à développer un procédé millifluidique afin d'obtenir des nanoparticules de bismuth métallique. Comme nous l'avons montré dans le chapitre 1, la synthèse en procédé non continu des nanoparticules a été plus efficace sous irradiation microondes qu'en chauffage thermique conventionnel. Nous avons donc cherché, dans un premier temps, à mettre au point une synthèse millifluidique activée par irradiation microondes. Pour mettre en place ce système expérimental, une étude bibliographique a été menée décrivant les synthèses de nanoparticules en flux continu sous irradiation microondes.

## 1.2 Procédé continu en millifluidique sous irradiation microondes

A notre connaissance, seuls cinq exemples de synthèse de nanoparticules métalliques en flux continu millifluidique sous irradiation microondes sont référencés dans la littérature. Ceci s'explique probablement par la difficulté de concevoir des appareils de millifluidique fonctionnant sous irradiation microondes. Néanmoins, comme discuté précédemment dans l'introduction générale, l'utilisation de l'irradiation microonde pour la synthèse des nanoparticules métalliques permet d'accélérer l'étape de nucléation et de mieux contrôler la séquence nucléation-croissance.<sup>9</sup>

Les différentes études décrivant la synthèse de nanoparticules métalliques en procédé continu sous irradiation microondes sont résumées dans le tableau 22.

Entrées	Précurseurs	T (°C)	Débit (mL/min)	Solvants	Réducteurs	Revêtements	Diamètres en TEM (nm)
1	AgNO <sub>3</sub>	160	0,167-6,67	Ethylène glycol		PVP	9-14
2	[Ag(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	100	600	Eau	CMC	PVP	0,7-2,8
3	Ag(Ac)	150	106-42	Ethylène glycol		PVP	20-160
4	PdCl <sub>2</sub>	198	1	Ethylène glycol		PVP	5,5-6,7
	RhCl <sub>3</sub>						3,4
	RuCl <sub>3</sub>						2
	H <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub>						3,6
5	HAuCl <sub>4</sub>	117	4-10	Eau	Na <sub>3</sub> Cit	Na <sub>3</sub> Cit	4-15

Tableau 22: Conditions expérimentales décrites dans la littérature pour la synthèse de nanoparticules métalliques en flux continu sous irradiation microondes.



Plusieurs dispositifs expérimentaux de synthèse de nanoparticules métalliques en flux continu sous irradiation microondes sont décrits. Le premier dispositif est constitué d'un tuyau traversant une cavité en aluminium où les ondes microondes sont générées. Un capteur de température a été installé dans la cavité pour la contrôler lors de la synthèse (Figure 43).

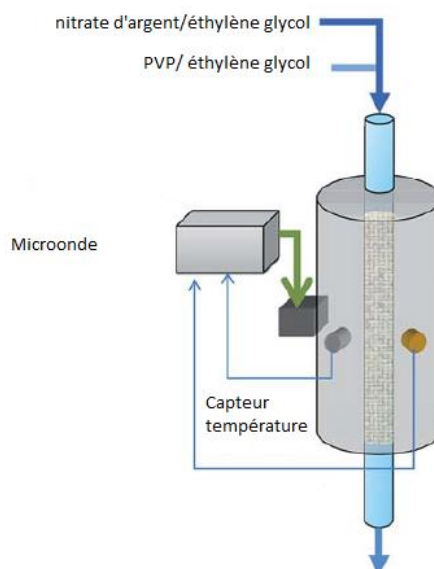


Figure 43: Dispositif expérimental décrit par Nishioka et al.<sup>132</sup>

Les réactifs ont été mélangés en amont puis ont été introduits dans la cavité en aluminium. La synthèse s'est déroulée en fixant une puissance de 3 W et une température de 160 °C pendant cinq heures.<sup>132</sup> La reproductibilité de la synthèse ainsi que la montée en échelle ont été testées sans observer de modification du diamètre des nanoparticules d'argent quelle que soit la concentration en réactif.

Le deuxième dispositif expérimental est constitué d'un tuyau alimenté par une pompe péristaltique qui traverse la cavité du microonde. À la sortie de la cavité, les nanoparticules ont été refroidies dans un bain de glace (Figure 44). Ce type de montage a permis de diminuer la polydispersité et d'obtenir des nanoparticules d'argent de 1,5 nm<sup>133</sup>. En utilisant le même montage, des nanoparticules d'argent de 20 à 160 nm de diamètre ont été obtenues.<sup>134</sup>

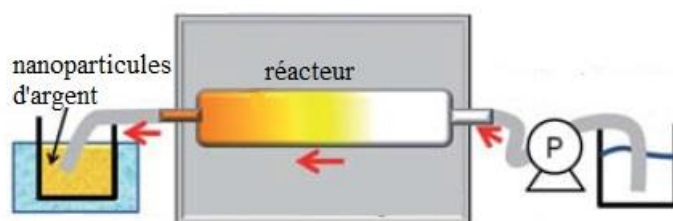


Figure 44: Dispositif expérimental décrit par Horikoshi et al.<sup>133</sup>



Avec un dispositif différent et non illustré dans la publication, des nanoparticules monométalliques et monodisperses de Pd, Rh, Ru et Pt ont aussi été synthétisées en flux continu à partir d'un montage simple en introduisant le tuyau dans un tube en verre qui a été placé dans la cavité du microondes.<sup>135</sup>

Un dernier dispositif expérimental a été utilisé pour synthétiser des nanoparticules d'or revêtues de citrate (Figure 45).

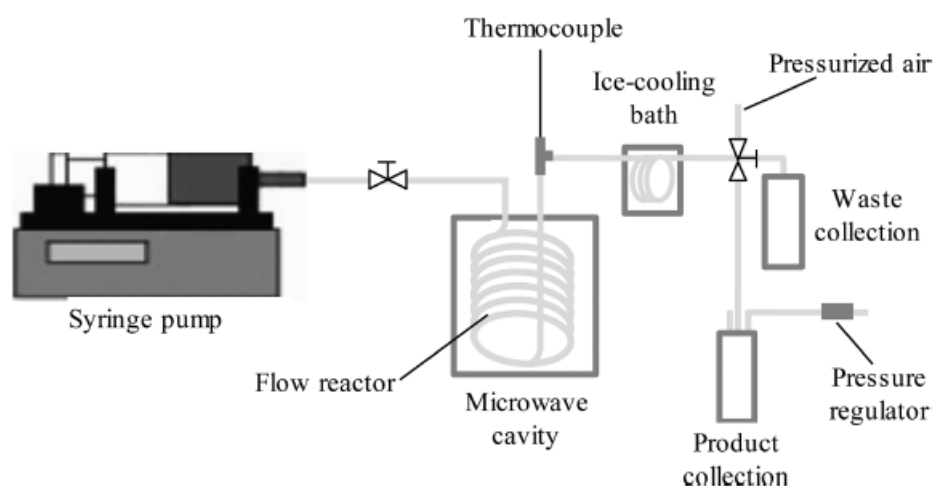


Figure 45 : Dispositif expérimental décrit par Bayazit et al.<sup>136</sup>

Ce dispositif est constitué d'un pousse seringue afin d'introduire les réactifs dans le réacteur. La température est mesurée par un thermocouple en sortie du microonde. Le milieu réactionnel a été refroidi dans un bain de glace en sortie du microondes puis a été collecté.<sup>136</sup> Tout le procédé est mis sous pression à l'aide d'un régulateur de pression. Grâce à ce montage, une synthèse robuste et reproductible de nanoparticules a été obtenue. Ce procédé en flux continu a permis d'obtenir des nanoparticules deux fois plus petites comparativement à un procédé non continu.<sup>136</sup>

### 1.3 Conclusion sur le flux continu sous irradiation microondes

La littérature présente des dispositifs expérimentaux de procédé continu sous irradiation microondes plus ou moins complexes. Il peut s'agir simplement d'un tuyau qui traverse la cavité du microonde ou d'un dispositif plus complexe intégrant un régulateur de pression et un thermocouple.

Les nanoparticules synthétisées en procédé continu sont souvent comparées avec les nanoparticules synthétisées en procédé non continu. Dans toutes les comparaisons décrites, les nanoparticules synthétisées en procédé continu sont plus monodisperses que celles synthétisées en procédé non continu.



## 2 Synthèse millifluidique de nanoparticules de bismuth métallique

L'étude de la synthèse des nanoparticules *via* un procédé en flux continu millifluidique a été effectuée en collaboration avec Virginie Cagan qui a réalisé un stage d'ingénieur au sein de notre laboratoire (Février à Novembre 2017).

### 2.1 Flux continu sous irradiation microondes

#### 2.1.1 Dispositif expérimental mis en œuvre

A partir du microonde existant du laboratoire (matériel CEM Discover Labmate muni d'une cavité de 300 mL), un réacteur en flux fonctionnant sous irradiation microondes a été conçu.

Pour ce faire, nous nous sommes inspirés des travaux de Garagalza *et al.* qui ont développé un système millifluidique sur ce même appareil CEM afin de synthétiser des copolymères acryliques.<sup>137</sup> L'intégralité du système (support et tubulure) a été entièrement usiné en téflon car ce matériau est transparent aux ondes microondes et les dimensions ont été adaptées à la cavité du microonde (Figure 46).

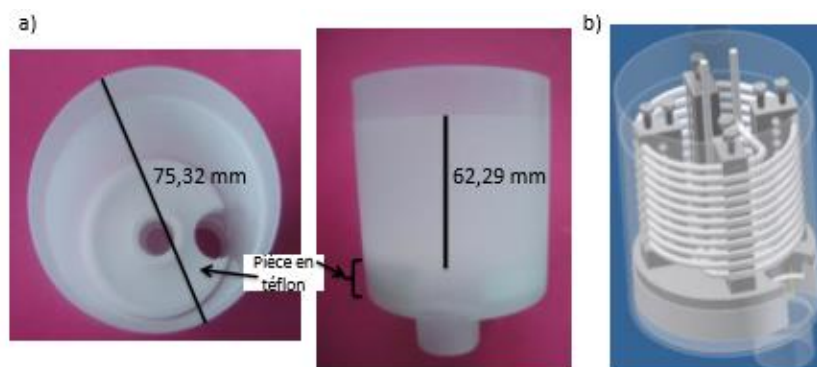


Figure 46: a) Dimensions de la pièce support cylindrique en téflon, b) dispositif de millifluidique avec la tubulure en téflon.

La tubulure en téflon est enroulée en plusieurs spires autour de la pièce support (Figure 47).



Nombre de spires : 8  
Longueur totale de la tubulure : 1,66 m  
Diamètre interne de la tubulure : 1,6 mm  
Volume interne total de la tubulure : 3,32 mL

Figure 47: Dispositif de flux continu et caractéristiques de la tubulure insérée dans la cavité microonde.



Afin de maximiser l'absorption des ondes microondes, le diamètre de la tubulure doit être inférieur à la profondeur de pénétration des ondes microondes dans l'eau (3,4 cm). A l'intérieur de la cavité du microonde, la longueur de la tubulure est de 1,66 m ce qui correspond à un volume de réacteur de 3,32 mL.

Le dispositif de flux continu sous irradiation microondes que nous avons utilisé au laboratoire est constitué de plusieurs parties (Figure 48). Les réactifs sont injectés *via* une pompe HPLC qui permet de réguler le débit de 0,5 à 3 mL/min (A) puis passent dans le réacteur (B) qui est inséré à l'intérieur de la cavité du microonde. Les paramètres du microonde sont pilotés par un ordinateur (C). Les nanoparticules formées sont collectées à la sortie de la tubulure dans un bécher (D).

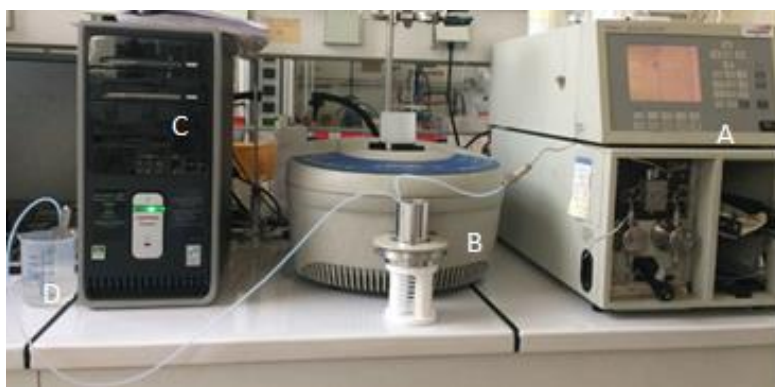


Figure 48: Dispositif complet de flux continu sous irradiation microondes.

Pour toutes nos synthèses sous irradiation microondes, le mode puissance fixe a été choisi car il permet de fixer la puissance pendant un temps déterminé.

### 2.1.1.1 Optimisation des conditions de flux continu

#### 2.1.1.1.1 Conditions initiales en procédé non continu

Pour passer d'un procédé non continu à un procédé en flux continu, nous nous sommes basés sur les conditions optimisées du procédé non continu décrites dans le chapitre 1 rappelées dans le schéma 14.

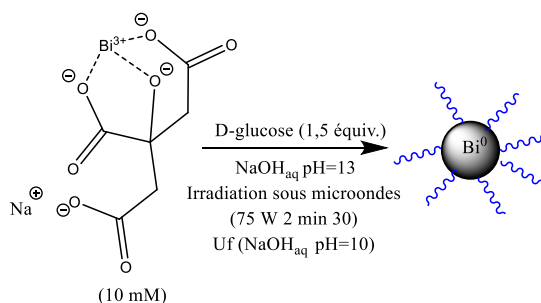


Schéma 14 : Conditions de synthèse en procédé non continu.



Le pH de la réaction a été fixé à pH=13 plutôt qu'à pH=14 afin de se placer dans des conditions moins agressives compte tenu de l'utilisation d'une pompe HPLC. De plus, comme vu dans le chapitre 1, les nanoparticules synthétisées à pH=13 ont une durée de stabilité colloïdale plus élevée que les nanoparticules synthétisées à pH=14. Après la synthèse, toutes les nanoparticules décrites dans ce chapitre ont été purifiées par ultrafiltration sur une membrane de 30 kDa. Une étude préliminaire a montré que les nanoparticules issues du flux continu pouvaient être ultrafiltrées à pH=7 sur des membranes de 30 kDa ceci était probablement due à une meilleure stabilité colloïdale (voir partie 2.2.7)

### 2.1.1.2 Optimisation des quantités de réducteur

Pour obtenir une solubilisation rapide (mélange de citrate de bismuth et de sodium et de D-glucose à pH=13), compte tenu de l'augmentation des quantités de réactifs pour le flux continu, dix équivalents de citrate supplémentaires ont été ajoutés. Cet ajustement de la quantité de citrate a également impliqué une adaptation de la quantité de D-glucose pour obtenir un saut de pH complet d'après des expériences préliminaires effectuées au laboratoire (Tableau 23).<sup>138</sup>

D-glucose (équiv.)	Saut de pH
1,5	Incomplet
2	Incomplet
3	Complet

Tableau 23: Saut de pH en fonction du nombre d'équivalents de D-glucose.

### 2.1.1.3 Obstruction de la tubulure

Lors des premiers essais en procédé continu, nous avons été confrontés à deux problèmes :

- Un encrassement de la tubulure pouvant induire un bouchage de la canalisation est apparu comme illustré dans la figure 49.
- Un emballement de la réaction dû à un phénomène de bullage dans la cavité microonde, générant un emballement du fluide qui est expulsé ou qui retourne en arrière avec un débit non constant et provoque, de ce fait, un temps de résidence irrégulier des réactifs dans le réacteur. L'apparition de ces flux erratiques est dû à la cavitation<sup>139</sup> ou à des points chaud dans notre système de flux continu sous irradiation microondes.<sup>140</sup>



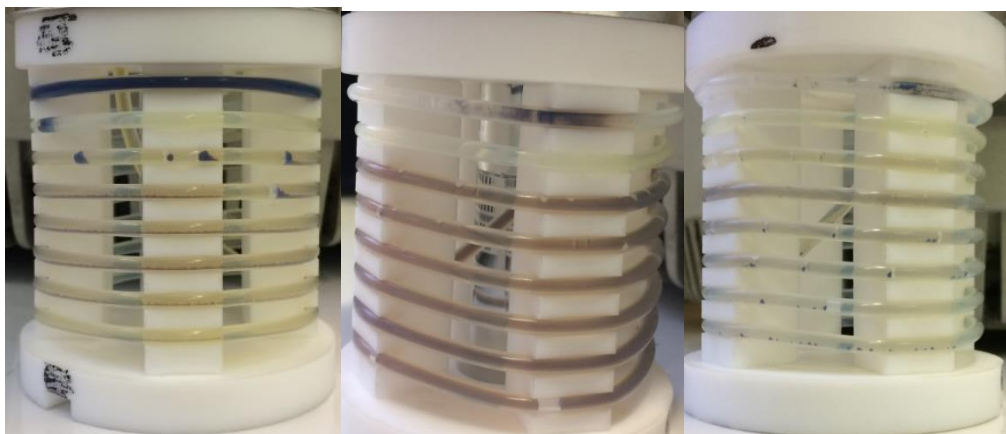


Figure 49: Divers encrassements observés lors de la synthèse des nanoparticules en flux continu sous irradiation microondes.

### 2.1.1.4 Limitation du phénomène d'encrassement

Afin de limiter l'encrassement de la canalisation (Figure 49), plusieurs paramètres ont été modifiés. Dans un premier temps, le D-glucose est solubilisé seul dans une solution aqueuse à  $\text{pH}=13$  pour observer son comportement dans nos conditions réactionnelles. A une puissance de 50 W et à un débit de 1 mL/min, la formation de bulles et l'emballement du fluide ont lieu mais, contrairement à ce qui est obtenu à 75 W, aucun encrassement de la canalisation n'est observé. Ce phénomène d'encrassement n'est donc pas dû à la formation éventuelle de caramel.

La concentration initiale en citrate de bismuth et de sodium a ensuite été étudiée. Au-dessus d'une concentration de 3 mM, de l'encrassement est observé. En dessous de cette concentration, des résidus insolubles se forment dans la tubulure (Figure 50).

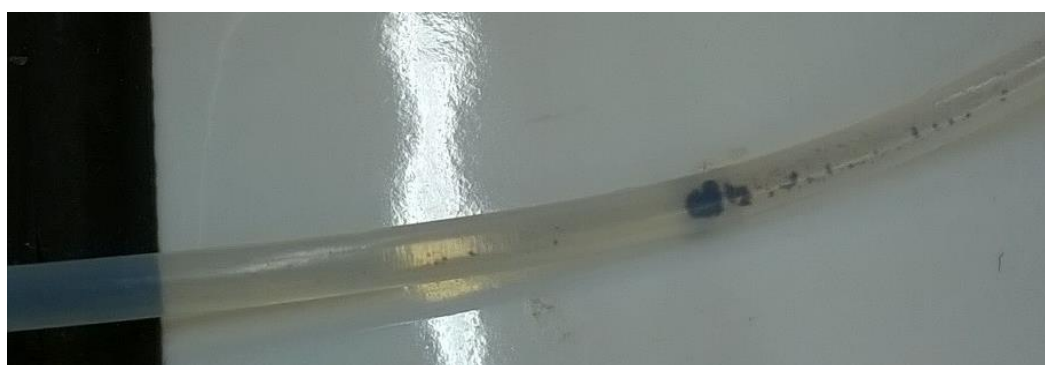


Figure 50: Résidus insolubles présent de la tubulure.

La concentration en citrate de bismuth et de sodium a donc été fixée à 3 mM pour toutes nos expériences ultérieures.



### 2.1.1.5 Régulation de la puissance et du débit

À la puissance initiale de 50 W, un emballement du fluide est observé. Pour éviter ce phénomène, la puissance est fixée à 25 W, le phénomène d'emballement n'est plus observé mais le débit de la solution n'est pas constant à la sortie du réacteur. Pour y remédier et avoir un débit identique à celui de la pompe HPLC, l'installation d'un régulateur de débit ou de pression a été envisagé. Pour des raisons de coûts et de disponibilité, nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'un régulateur de débit. Ce régulateur utilise une vanne à aiguille placée à la sortie de la canalisation (Figure 51).

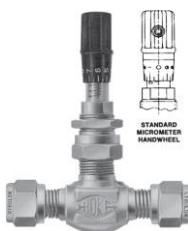


Figure 51: Vanne à aiguille (HOKE®) utilisée pour réguler le débit.

L'introduction de cette vanne a permis de supprimer définitivement le phénomène d'emballement et de réguler le débit de sortie pour qu'il soit identique au débit d'entrée imposé par la pompe HPLC.

Dès que la vanne de régulation a pu être installée, le débit a été optimisé. Pour des débits compris entre 1 mL/min et 2 mL/min, la modification du diamètre des nanoparticules a été étudiée à partir des conditions expérimentales suivantes (Schéma 15).

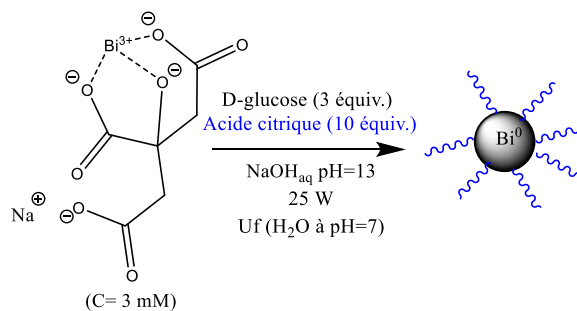


Schéma 15 : Conditions expérimentales utilisées en flux continu sous irradiation microondes.

Pour s'assurer de la réduction totale du Bi(III) en Bi(0), le saut de pH a été mesuré comme précédemment en procédé non continu.

L'influence du débit et du temps de résidence sur le diamètre des nanoparticules a été étudiée et présentée dans le tableau 24.

Entrées	Débits	Temps de	Diamètres (nm) en	Saut de pH	Encrassement
---------	--------	----------	-------------------	------------	--------------



		résidence	nombre (Proportions %)		
1	1,0 mL/min	3 min 30	64±30 (100%)	Complet	Oui
2	1,3 mL/min	2 min 55	44±16 (100%)	Complet	Non
3	1,5 mL/min	2 min 15	131±64 (71%) 46±8 (29%)	Complet	Non
4	2,0 mL/min	1 min 45	163±68 (67%) 39±8 (33%)	Incomplet	Non

Tableau 24: Influence du débit et du temps de résidence sur le diamètre des nanoparticules.

Lorsque le débit est fixé à 1,0 mL/min (Tableau 24, entrée 1), des nanoparticules d'environ 64±30 nm ont été obtenues mais cela s'accompagne d'un encrassement de la tubulure. Pour un débit supérieur à 1,5 mL/min (Tableau 24, entrée 3), des nanoparticules polydisperses, caractérisées par une distribution bimodale sont isolées. Pour un débit de 2,0 mL/min (Tableau 24, entrée 4), le saut de pH est incomplet. Le temps de résidence dans le réacteur est sans doute trop faible pour assurer une réduction totale du bismuth. Finalement, le débit optimal est atteint à 1,3 mL/min puisqu'il assure un saut de pH complet (0,07), n'induit pas d'encrassement et les nanoparticules obtenues sont monodisperses avec un diamètre de 44±16 nm (Tableau 24, entrée 2).

### 2.1.2 La reproductibilité

Afin de valider cette nouvelle méthode de synthèse, la reproductibilité de ces dernières conditions réactionnelles a été testée (Schéma 16).

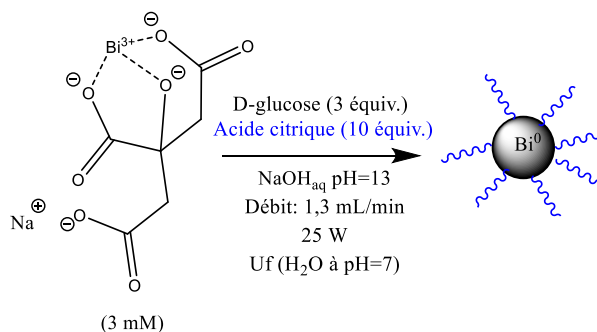


Schéma 16: Conditions de synthèse optimales du procédé en flux continu sous irradiation microondes

Les résultats de l'étude de reproductibilité ont été reportés dans le tableau 25. Les expériences ont été réalisées trois fois par deux expérimentateurs différents.

Expérimentateurs	Nombre	Diamètres (nm)	Diamètres (nm)	Saut de pH
------------------	--------	----------------	----------------	------------



	d'expériences	en nombre (Proportions %)	en intensité (Proportions %)	
A	3	38±19 (100%)	140±45 (100%)	Complet
B	3	52±21 (100%)	148±69 (100%)	Complet

Tableau 25: Etude de la reproductibilité des nanoparticules synthétisées en procédé flux continu sous irradiation microondes.

D'après les résultats présentés dans le tableau 25, la synthèse est reproductible et le saut de pH est identique pour chaque expérience (0,07). Par conséquent, ce protocole utilisant des conditions millifluidiques sous irradiation microondes est robuste et indépendant de l'expérimentateur.

### 2.1.3 Caractérisations des nanoparticules

Afin de caractériser les nanoparticules après leur purification par ultrafiltration à pH=7 sur un filtre de 30kDa, plusieurs techniques ont été mises en œuvre.

#### 2.1.3.1 Microscopie électronique en transmission

Les nanoparticules synthétisées en flux continu sous irradiation microondes ont été caractérisées par TEM (Figure 52).

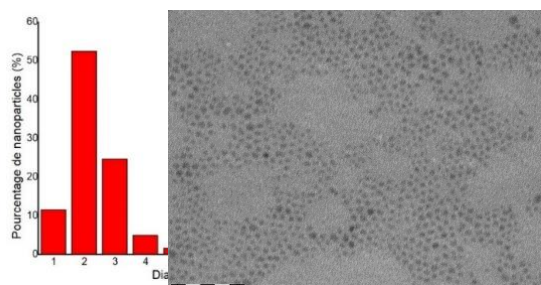


Figure 52: Image et histogramme des diamètres des nanoparticules de bismuth synthétisées en procédé continu sous irradiation microondes.

En TEM, les nanoparticules mesurent  $3 \pm 1$  nm mais, par contre, en DLS un diamètre en nombre de  $52 \pm 21$  nm est mesuré. Cette différence montre que les nanoparticules forment des agrégats stables en solution.

#### 2.1.3.2 Spectroscopie infrarouge

Les nanoparticules synthétisées en flux continu sous irradiation microondes ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge (Figure 53).



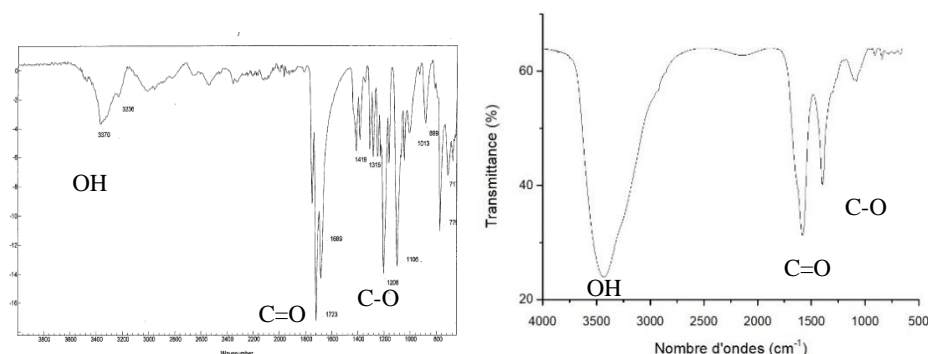


Figure 53: Spectre infrarouge de l'acide citrique (à gauche) et spectre infrarouge des nanoparticules revêtues de citrate synthétisées en procédé flux continu sous irradiation microondes (à droite).

En comparant, les analyses infrarouges, une bande de vibration intense apparaît à  $3315\text{ cm}^{-1}$  relative aux groupements hydroxyles des acides carboxyliques et la présence d'eau. Les bandes à  $1545\text{ cm}^{-1}$  et à  $1358\text{ cm}^{-1}$  correspondent à la liaison C=O et C-O respectivement. Compte tenu des similitudes entre les deux spectres infrarouges, l'acide citrique est bien présent à la surface des nanoparticules de bismuth.<sup>121</sup>

### 2.1.3.3 Analyse thermogravimétrique

Les nanoparticules synthétisées en flux continu sous irradiation microondes ont été caractérisées par TGA (Figure 54).

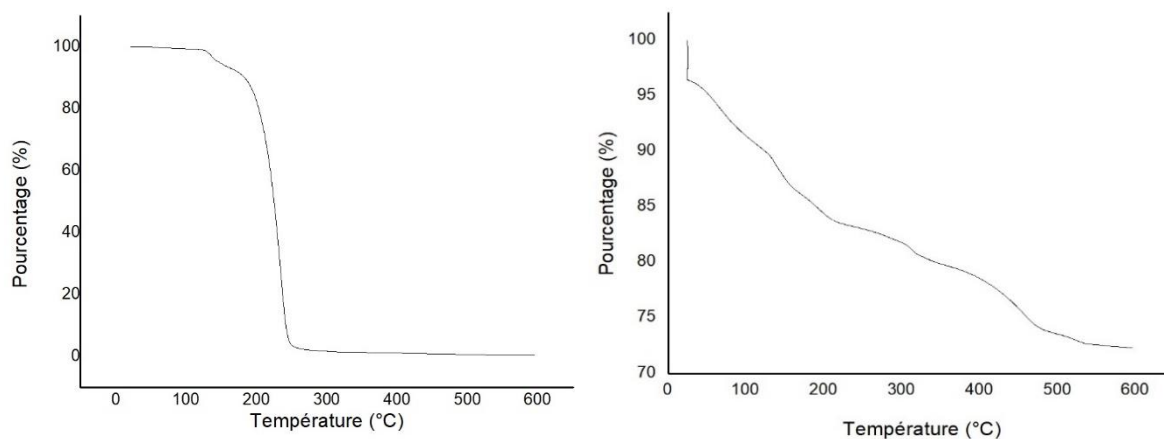


Figure 54 : TGA du citrate (à gauche) et des nanoparticules revêtues de citrate synthétisées en procédé continu sous irradiation microondes (à droite).

La TGA des nanoparticules montre trois pertes de masse. Une est centrée sur  $50\text{ °C}$  qui correspond à l'eau (15%),<sup>121</sup> l'autre centrée sur  $250\text{ °C}$  qui correspond au citrate (5%) par analogie aux nanoparticules d'or revêtues de citrate.<sup>121</sup> Enfin, la dernière perte de masse centrée sur  $400\text{ °C}$  correspond à une impureté provenant du précurseur de citrate de bismuth de sodium (Figure 55).



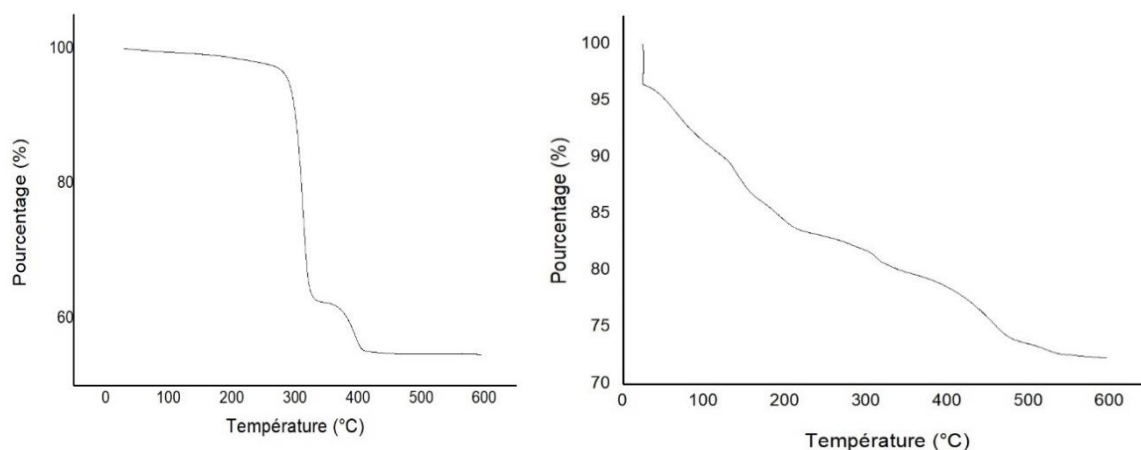


Figure 55 : TGA du citrate de bismuth et de sodium (à gauche) et des nanoparticules revêtues de citrate synthétisées en procédé continu sous irradiation microondes (à droite).

### 2.1.3.4 Quantification du nombre de citrate sur la nanoparticule

Le nombre de citrate par nanoparticule a été estimé grâce à la TGA avec la méthodologie décrite au chapitre 1. Le nombre de citrate présent sur la surface des nanoparticules a été évalué à trente citrates ce qui correspond à un citrate par  $\text{nm}^2$ . Une estimation a été effectuée par modélisation en évaluant la surface du citrate sur la nanoparticule (Figure 38). Le nombre de ligand varie entre deux et quatre molécules par  $\text{nm}^2$  selon le nombre d'acides carboxyliques adsorbés à la surface. Une étude DOSY effectuée démontre que le citrate n'a pas de forte interaction avec la surface de la nanoparticule.

### 2.1.3.5 Spectrométrie de photon X

L'analyse montre que la surface des nanoparticules synthétisées en procédé continu sous irradiation microondes contient essentiellement du bismuth oxydé (Figure 56)<sup>127</sup> et plus du tout de bismuth métallique contrairement aux nanoparticules obtenues en procédé non continu (voir chapitre 1).



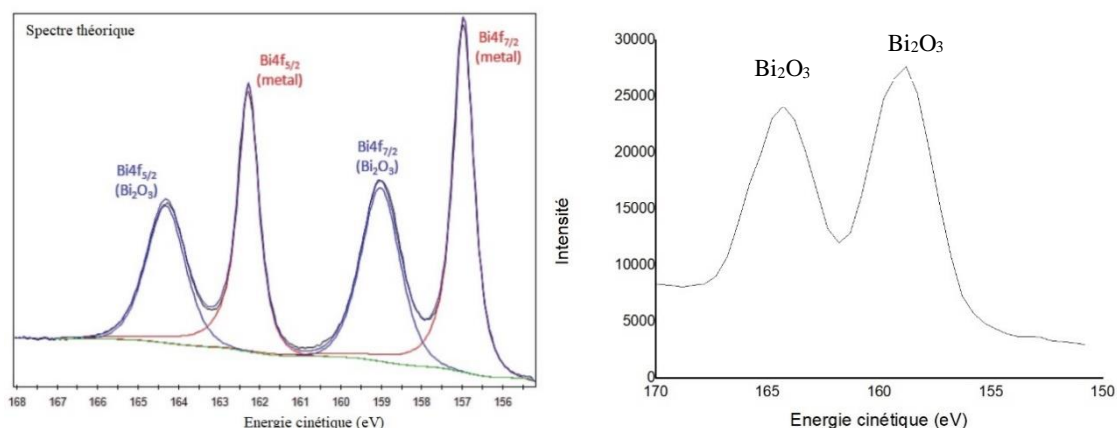


Figure 56: Spectre XPS théorique de l'électron 4f du bismuth (à gauche), spectre XPS expérimental de l'électron 4f du bismuth (à droite).

L'analyse XPS a permis d'identifier des liaisons C-C et O-C=O présentes à la surface de la nanoparticule et correspondant à la molécule de citrate adsorbée en surface (Figure 57).<sup>127</sup>

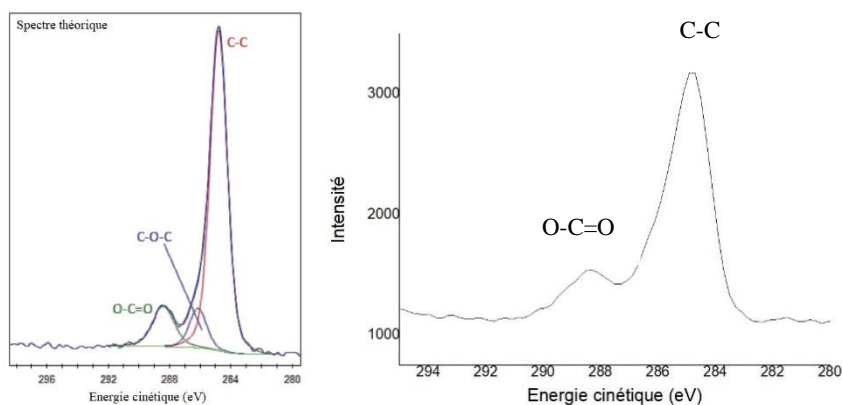


Figure 57: Spectre XPS théorique de l'électron 1s du carbone (à gauche), spectre XPS expérimental de l'électron 1s du carbone (à droite).

#### 2.1.3.6 Spectroscopie UV – visible

Les nanoparticules synthétisées en procédé continu sous irradiation microondes ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible (Figure 58).



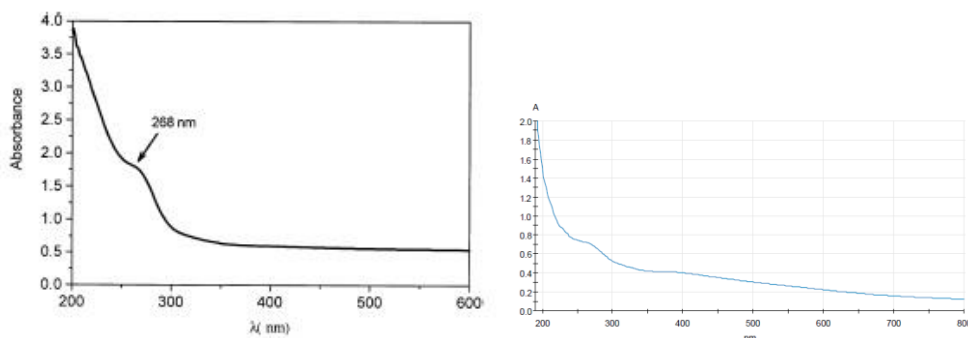


Figure 58: Spectre UV-Visible des nanoparticules synthétisées par Fang *et al.* (à gauche),<sup>19</sup> spectre UV-Visible des nanoparticules revêtues de citrate synthétisées en flux continu sous irradiation microondes (à droite).

Les nanoparticules absorbent dans tout le domaine spectral de 200 à 800 nm. Le spectre des nanoparticules de bismuth métallique synthétisées est identique à celui décrit dans la littérature par Fang *et al.*<sup>19</sup> Le pic à 268 nm correspond spécifiquement aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate.<sup>19</sup>

### 2.1.3.7 Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta à pH=7 des nanoparticules revêtues de citrate synthétisées en flux continu sous irradiation microondes est de  $-45$  mV. De ce fait, les nanoparticules sont considérées comme stables à pH=7.

### 2.1.4 Rendement de formation et concentration en nanoparticules

#### 2.1.4.1 Rendement de formation des nanoparticules en bismuth

Le rendement de formation des nanoparticules a été évalué selon le protocole décrit dans le chapitre 1 par la dissolution oxydative des nanoparticules puis le dosage des ions Bi(III) par la dithizone en spectroscopie UV-Visible. La concentration de bismuth présente dans l'échantillon est calculée à partir de la mesure d'absorbance retranscrite sur la courbe d'étalonnage (voir chapitre 1). La quantité de Bi(III) dosée a été rapportée à la quantité initiale de Bi(III) présente dans le précurseur citrate de bismuth et de sodium pour quantifier le rendement de formation des nanoparticules de bismuth. Le rendement de formation des nanoparticules de bismuth est de 75% pour les nanoparticules synthétisées en flux continu sous irradiation microondes. Ce résultat indique que l'augmentation de la quantité de D-glucose permet d'obtenir un saut de pH complet et un rendement de formation de nanoparticules correct.



#### 2.1.4.2 Calcul de la concentration en nanoparticules

Le nombre de nanoparticules de bismuth a été estimé grâce au dosage du Bi(III) par spectroscopie UV-Visible en utilisant les calculs présentés en chapitre 1. Ce calcul nous donne un nombre de nanoparticule de bismuth de  $3,14 \cdot 10^{17}$  pour 3 mM de précurseur et une concentration en nanoparticules de bismuth de  $6,5 \mu\text{M}$  dans la solution finale après ultrafiltration.

#### 2.1.5 Comparaison des deux procédés non continus et continus

Le tableau 26 permet de comparer les caractéristiques des nanoparticules de bismuth métallique obtenues en procédé continu et non continu sous irradiation microondes.

	Procédé continu	Procédé non continu	
pH de la réaction	13	13	14
Diamètre DLS	$52 \pm 19 \text{ nm}$	$72 \pm 43$	$113 \pm 40 \text{ nm}$
Diamètre TEM	$3 \pm 1,3 \text{ nm}$	$3 \pm 1$	$11 \pm 1,5 \text{ nm}$
Spectroscopie infrarouge	Revêtement citrate	Revêtement citrate	Revêtement citrate
Nombre de ligand par $\text{nm}^2$ (TGA)	1	2	7
XPS	100 % $\text{Bi}_2\text{O}_3$	25% $\text{Bi}^0$ 75% $\text{Bi}_2\text{O}_3$	25% $\text{Bi}^0$ 75% $\text{Bi}_2\text{O}_3$
Spectroscopie UV-Visible	Revêtement citrate	Revêtement citrate	Revêtement citrate
Productivité	96 mg/h	40 mg/h	48 mg/h
Rendement	75%	N.D.	96%

Tableau 26: Comparaison des caractéristiques des nanoparticules de bismuth métallique obtenues par procédé continu et non continu

Les nanoparticules obtenues par le procédé non continu sont constituées d'un mélange d'oxyde de bismuth et de bismuth métallique à leur surface alors que les nanoparticules en flux continu ont une couche complète d'oxyde de bismuth à leur surface. A pH=13, les diamètres en DLS et en TEM sont plus faibles que ceux à pH=14. La productivité des nanoparticules est augmentée grâce au procédé continu, cette caractéristique concorde avec les avantages du flux continu expliqués dans l'introduction de ce chapitre. La perte de rendement en flux est sans doute due à la première fraction de synthèse qui n'est pas collectée.



### 2.2 Flux sous chauffage thermique conventionnel

Les conditions du procédé en flux sous irradiation microondes nous ont donné des résultats intéressants et reproductibles. Cependant, le processus d'emballement reste délicat à gérer et nécessite un réglage très précis de la vanne régulatrice de débit. En partant du principe que cet emballement est dû au phénomène de cavitation induit par les ondes microondes,<sup>141</sup> nous avons décidé d'explorer des conditions en flux sous chauffage thermique conventionnel. Certes les résultats du procédé non continu sous chauffage thermique conventionnel étaient nettement moins intéressants que ceux sous irradiation microondes notamment en termes de temps de réaction et de polydispersité mais d'autres avantages existent. En effet, nous avons émis l'hypothèse que les échanges de chaleur optimisés grâce à la millifluidique pouvaient favoriser l'obtention de nanoparticules monodisperses sous chauffage thermique conventionnel. De plus, le même dispositif expérimental qu'en chauffage sous irradiation microondes a été utilisé en immergeant simplement le dispositif usiné au laboratoire dans un bain marie (Figure 59).

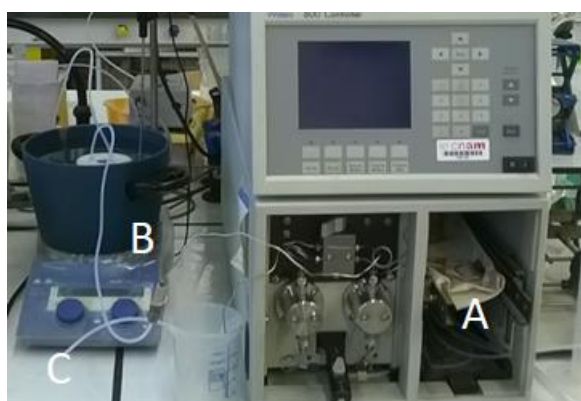
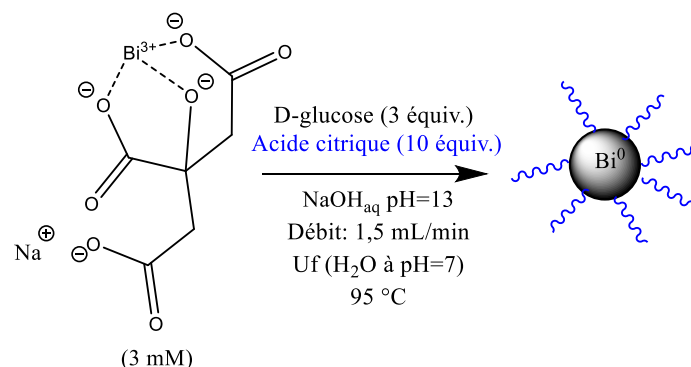


Figure 59: Dispositif expérimental du flux continu sous chauffage thermique conventionnel (A) la pompe, (B) le réacteur immergé dans le bain marie, (C) le bécher de récupération avec la vanne régulatrice de débit.

#### 2.2.1 Optimisation de la température

Les conditions expérimentales identiques à celles utilisées en flux sous irradiation microondes ont été reprises et nous avons optimisé la température jusqu'à obtenir la formation de nanoparticules (schéma 17).





*Schéma 17 : Conditions de synthèse des nanoparticules en procédé continu sous chauffage thermique conventionnel.*

La température a été modulée de 40°C à 95°C et un changement de couleur de la solution de limpide à noire a été observé à partir de 95°C. A cette température et avec un débit de 1,5 mL/min, des nanoparticules monodisperses de 55±18 nm ont été synthétisées.

Dans ces conditions réactionnelles, le saut de pH mesuré est plus important par rapport à celui attendu en théorie (la réduction totale du Bi(III) nécessite un saut de pH de 0,07). Notre hypothèse pour expliquer ce saut de pH se base sur une acidification excessive qui pourrait être due aux excès de réactifs utilisés de citrate et de D-glucose. Pour rappel, ces quantités de réactifs avaient été optimisés pour obtenir une solubilisation rapide.

### 2.2.2 Optimisation de la quantité des réactifs

La quantité de citrate a été modifiée de 0 à 10 équivalents (Tableau 27). Le meilleur résultat a permis de synthétiser des nanoparticules monodisperses d'environ 50 nm avec dix équivalents de citrate et trois équivalents de glucose (Tableau 27, entrée 3). Les expériences suivantes seront donc toujours réalisées avec l'ajout de dix équivalents de citrate.

Entrées	Citrate (équiv.)	Solubilisation des réactifs	Diamètres (nm) en nombre (Proportions %)	Saut de pH
1	0	Lente	244±40 (16%) 697±257 (84%)	Complet
2	5	Lente	105±54(50%)	
3	10	Rapide	55±25 (100%)	

*Tableau 27: Optimisation de la quantité de citrate ajoutée pour synthétiser les nanoparticules.*

Afin d'obtenir un saut de pH complet correspondant à une réduction totale de Bi(III), nous avons cherché à minimiser la quantité de D-glucose.



Entrées	D-glucose (équiv.)	Diamètres en nombre (nm) (Proportions %)	Présence d'insoluble	Saut de pH
1	1,5	105±54 (50%)	Oui	Incomplet
2	2	147±45 (27%) 627±125 (73%)	Oui	Incomplet
3	2,5	111±65 (96%)	Oui	Incomplet
4	3	55±25 (100%)	Non	Complet
5	3,5	56±27 (100%)	Non	Complet

Tableau 28: Optimisation de la quantité de D-glucose.

Comme le montre le tableau 28, au minimum trois équivalents de D-glucose sont nécessaires pour atteindre un saut de pH complet et d'éviter conjointement la formation d'insolubles déjà observés précédemment (Figure 50). Cette augmentation de D-glucose a permis aussi une diminution du diamètre des nanoparticules (Tableau 28, entrée 4). Un essai à 3,5 équivalents de D-glucose n'a pas montré d'amélioration, nous avons donc fixé la quantité de D-glucose à trois équivalents.

Pour comprendre l'origine du saut de pH plus important par rapport à la théorie (réduction totale du Bi(III)), les réactivités du citrate de sodium ou du D-glucose ont été étudiées seuls dans nos conditions réactionnelles de flux (débit, stœchiométrie, température) sous chauffage thermique conventionnel (Schéma 18).

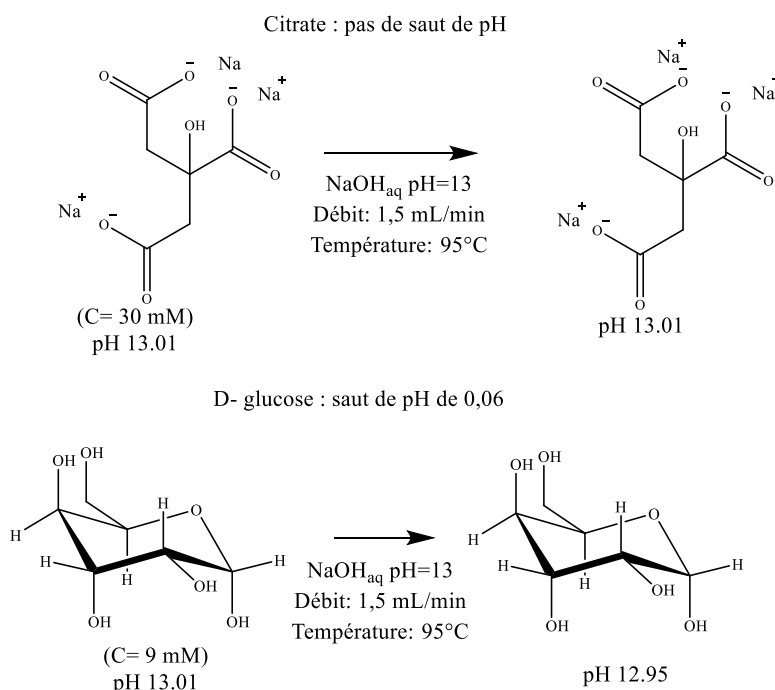


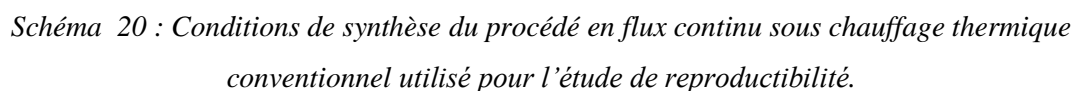
Schéma 18: Réaction menées pour expliquer la variation de pH.

Un saut de pH est observé en présence de D-glucose seul ce qui explique que la stœchiométrie de 1,5 équivalents de D-glucose ne permettent pas de réduire tout le Bi(III) (à l'inverse de ce





Afin de valider cette nouvelle méthode de synthèse, la reproductibilité de ces dernières conditions réactionnelles a été testée (Schéma 20).



L'étude de reproductibilité a été effectuée plusieurs fois par deux expérimentateurs différents (Tableau 29).

Tableau 29: Reproductibilité de la synthèse de nanoparticules en flux continu sous chauffage thermique conventionnel.

119

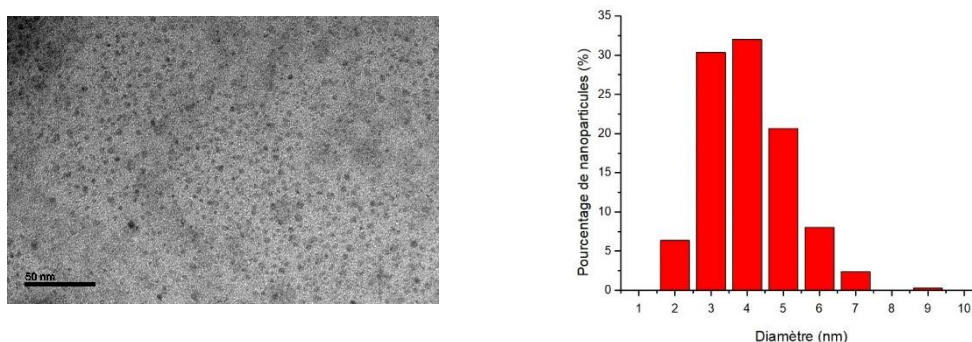


### 2.2.4 Caractérisations

Afin de caractériser les nanoparticules après purification par ultrafiltration sur un filtre de 30 kDa plusieurs techniques ont été mise en œuvre.

#### 2.2.4.1 Microscopie électronique en transmission

Les nanoparticules synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel ont été caractérisées par TEM (Figure 60).



*Figure 60: Images et histogramme des diamètres des nanoparticules de bismuth revêtues de citrate synthétisées par flux continu sous chauffage conventionnel thermique.*

En TEM, les nanoparticules mesurent  $3 \pm 0,5$  nm mais, par contre, en DLS un diamètre en nombre de  $55 \pm 25$  nm est observé. Cette différence montre que les nanoparticules forment des agrégats stables en solution.

#### 2.2.4.2 Spectroscopie infrarouge

Les nanoparticules synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge (Figure 61).



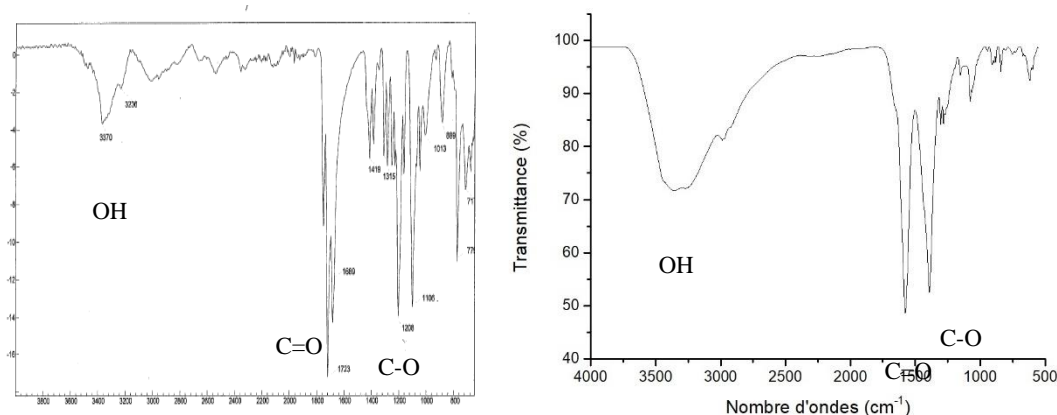


Figure 61: Spectre infrarouge de l'acide citrique (à gauche) et spectre infrarouge des nanoparticules revêtues de citrate synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel (à droite).

En comparant, les analyses infrarouges, une bande de vibration intense apparaît à  $3309\text{ cm}^{-1}$  relative aux groupements hydroxyles des acides carboxyliques et la présence d'eau. Les bandes à  $1558\text{ cm}^{-1}$  et à  $1362\text{ cm}^{-1}$  correspondent à la liaison C=O et C-O respectivement. Compte tenu des similitudes entre les deux spectres infrarouges, l'acide citrique est bien présent à la surface des nanoparticules de bismuth.<sup>121</sup>

### 2.2.4.3 Analyse thermogravimétrie

Les nanoparticules synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel ont été caractérisées par TGA (Figure 62).

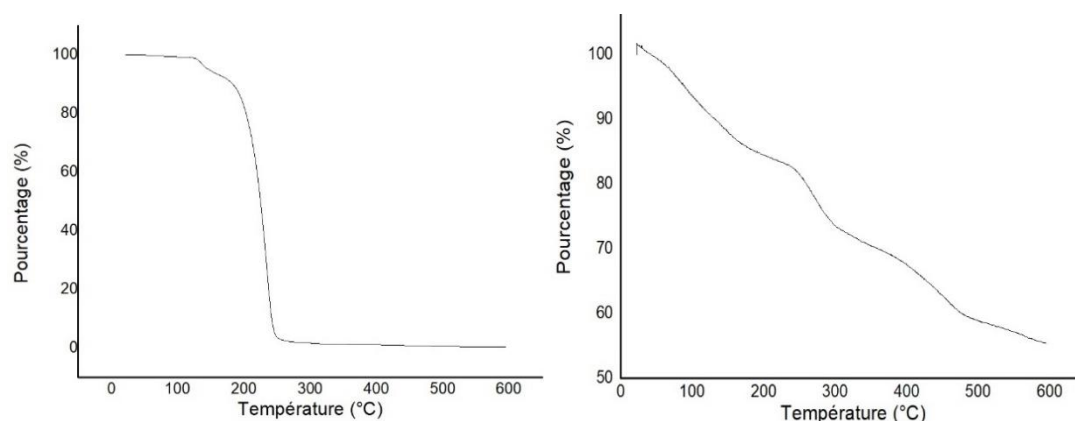


Figure 62 : TGA du citrate (à gauche) et des nanoparticules revêtues de citrate synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel (à droite).

La TGA montre trois pertes de masse, une est centrée sur  $50\text{ °C}$  qui correspond à l'eau (25%) et l'autre centrée sur  $250\text{ °C}$  correspond au citrate (12%) par analogie aux nanoparticules d'or revêtues de citrate.<sup>121</sup> Enfin, la perte de masse centrée à  $400\text{ °C}$  correspond à une impureté provenant du précurseur de citrate de bismuth et de sodium (Figure 63).



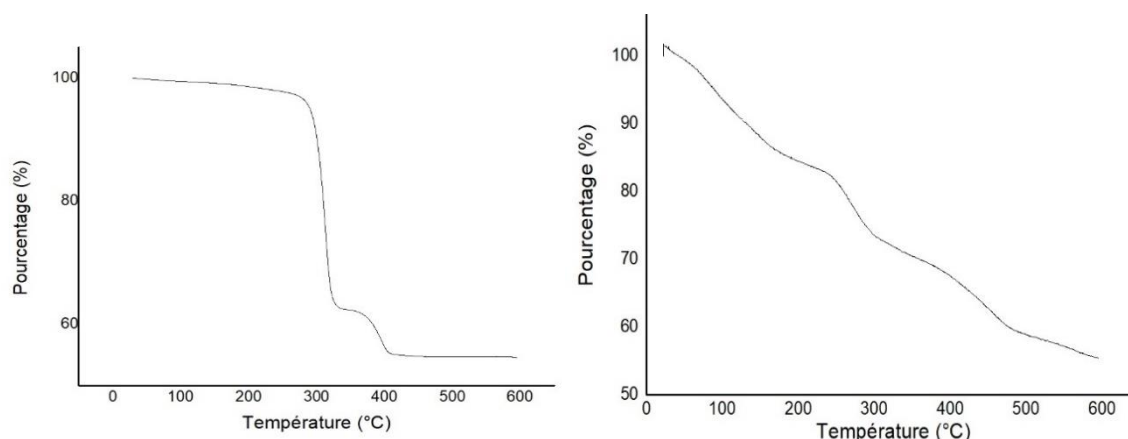


Figure 63 : TGA du citrate de bismuth et de sodium (à gauche) et des nanoparticules revêtues de citrate synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel (à droite).

#### 2.2.4.4 Quantification du nombre de citrate sur la nanoparticule

Le nombre de citrate par nanoparticule a aussi été estimé grâce à la TGA avec la méthodologie décrite au chapitre 1. Le nombre de citrate présent sur une nanoparticule a été évalué à quatre-vingt-six ce qui correspond à trois citrates par  $\text{nm}^2$ . Une estimation a été effectuée par modélisation en évaluant la surface du citrate sur la nanoparticule (Figure 38). Le nombre de ligand varie entre deux et quatre molécules par  $\text{nm}^2$  selon le nombre d'acides carboxyliques adsorbés à la surface. Une étude DOSY effectuée démontre que le citrate n'a pas de forte interaction avec la surface de la nanoparticule.

#### 2.2.4.5 Spectrométrie de photon X

L'analyse montre que la surface des nanoparticules synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel contient essentiellement du bismuth oxydé (Figure 64)<sup>127</sup> et plus du tout de bismuth métallique contrairement aux nanoparticules obtenues en procédé non continu (voir chapitre 1).



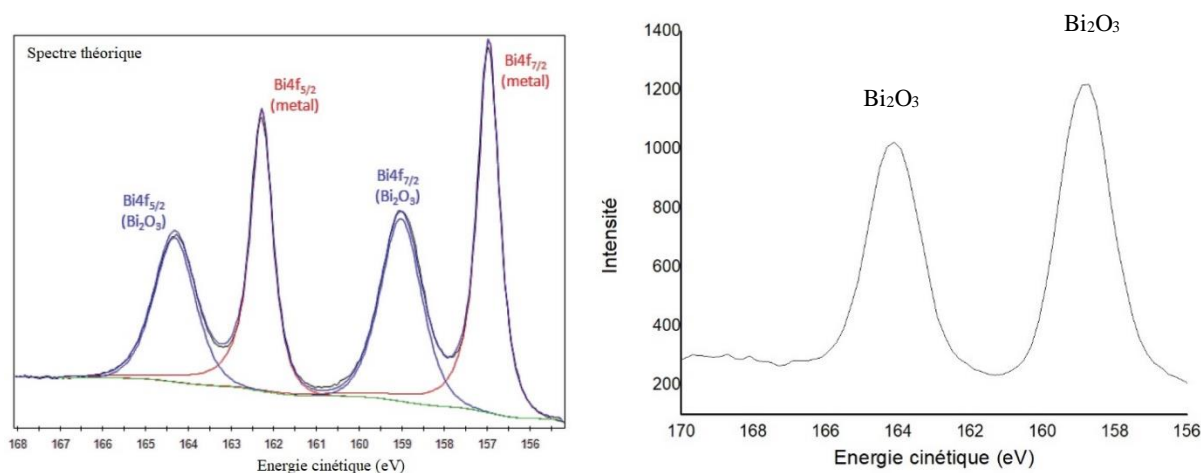


Figure 64: Spectre XPS théorique de l'électron 4f du bismuth (à gauche), spectre XPS expérimental de l'électron 4f du bismuth (à droite).

L'analyse XPS a permis d'identifier des liaisons C-C et O-C=O présentes à la surface de la nanoparticule correspondant à la molécule de citrate (Figure 65).<sup>127</sup>

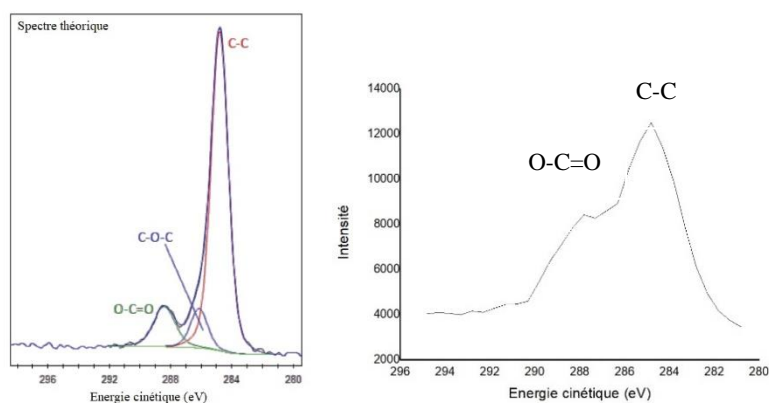


Figure 65: Spectre XPS théorique de l'électron 1s du carbone (à gauche), spectre XPS expérimental de l'électron 1s du carbone (à droite).

#### 2.2.4.6 Spectroscopie UV-Visible

Les nanoparticules synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible (Figure 66).



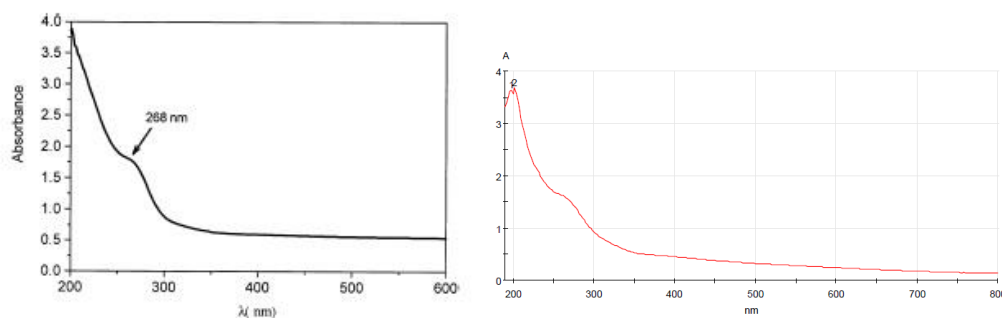


Figure 66: Spectre UV-Visible des nanoparticules synthétisées par Fang et al. (à gauche)<sup>19</sup> et spectre UV-Visible des nanoparticules synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel (à droite).

Les nanoparticules absorbent dans tout le domaine spectral de 200 à 800 nm. Le spectre des nanoparticules de bismuth métallique synthétisées est identique à celui décrit dans la littérature par Fang et al.<sup>19</sup> Le pic à 268 nm correspond spécifiquement aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate.<sup>19</sup>

#### 2.2.4.7 Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta à pH=7 des nanoparticules revêtues de citrate synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel est de -47 mV. De ce fait, les nanoparticules sont considérées comme stables à pH=7.

#### 2.2.4.8 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Un spectre RMN du proton des nanoparticules a été effectué et comparé avec les réactifs. Le spectre en bleu correspond aux nanoparticules tandis que le spectre en rouge correspond au citrate (Figure 67). La comparaison des deux spectres montre que le citrate est bien présent dans la solution des nanoparticules.

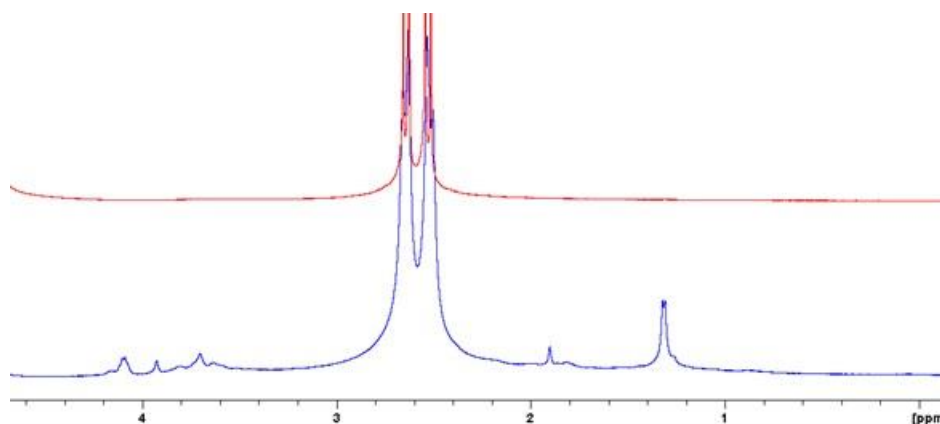


Figure 67: Comparaison des spectres RMN du citrate et des nanoparticules



En regardant plus en détail, le spectre RMN des nanoparticules, d'autres signaux sont observés et peuvent être apparentés aux signaux de l'acide gluconique entre 3,4 et 4,2 ppm et à l'isopropanol entre 3,9 et 4 ppm et à 1,2 ppm. A cause de la mauvaise résolution du spectre, nous n'avons pas pu identifier spécifiquement les signaux propres à l'acide gluconique ou à l'isopropanol (Figure 68).

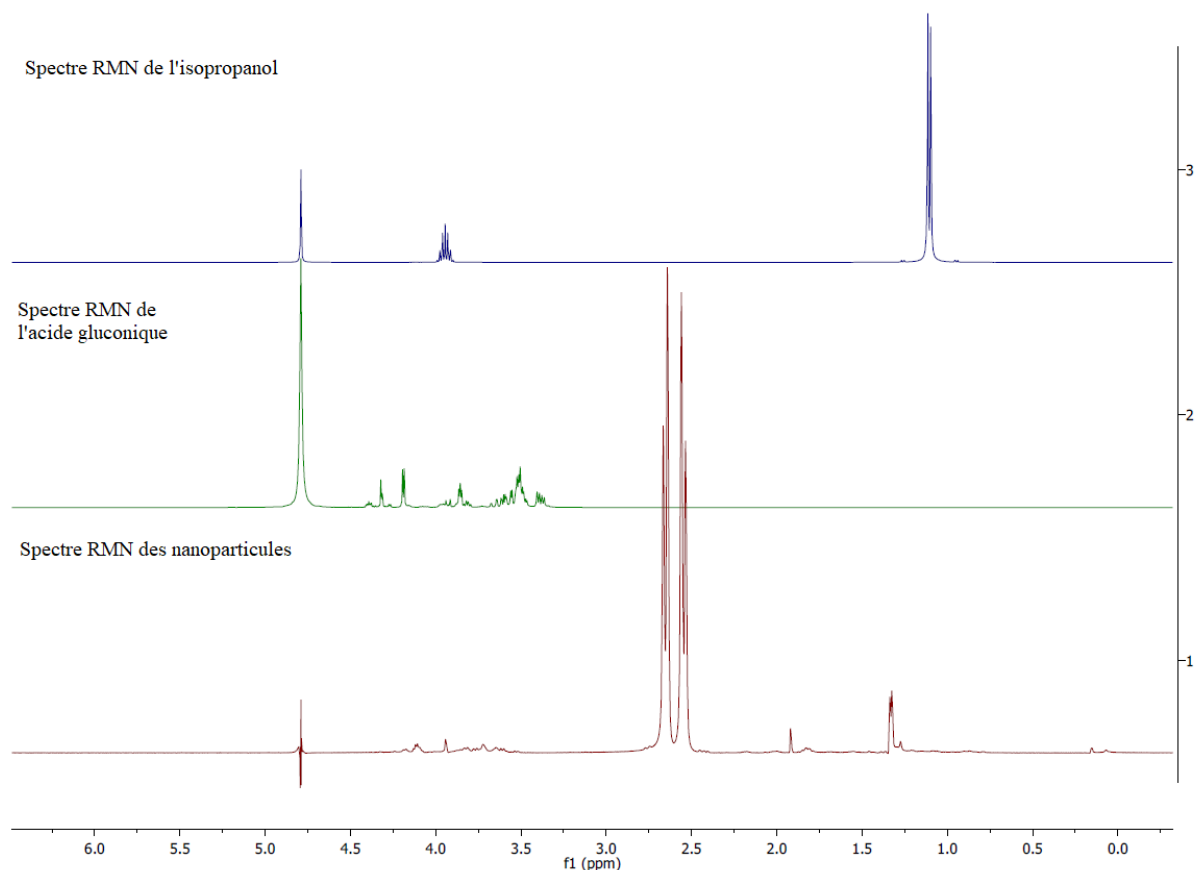


Figure 68: Comparaison des spectres RMN de l'isopropanol, de l'acide gluconique et des nanoparticules

La présence de l'isopropanol peut être justifiée car il est utilisé dans le protocole de nettoyage de la pompe HPLC. Selon la durée des rinçages de la pompe, la concentration de ce composé varie dans les spectres RMN. Cependant, nous n'avons jamais réussi à nous en affranchir totalement quelque soit les protocoles de rinçage mis en œuvre.

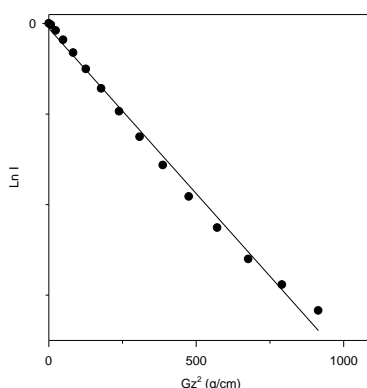
#### 2.2.4.9 Détermination du coefficient de diffusion par DOSY :

Cette technique permet de mesurer le coefficient de diffusion translationnelle des molécules. Ce coefficient dépend des paramètres physico-chimiques tels que la taille, la forme de la molécule mais aussi de la viscosité du solvant et de la température de la solution. La mesure du coefficient de diffusion par DOSY repose sur l'utilisation de gradients de champ pulsés. Le



résultat obtenu est donné par un graphe représentant le logarithme népérien de l'intensité du signal du proton sélectionné en fonction du gradient de champ magnétique. La pente de la régression linéaire est proportionnelle au coefficient de diffusion du proton sélectionné.

Le coefficient de diffusion du citrate à 2,6 ppm en présence de nanoparticules montre une évolution linéaire de la décroissance du logarithme népérien de l'intensité du signal selon le gradient du champ magnétique. La pente de la régression linéaire donne le coefficient de diffusion moyen qui est de  $4.6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  alors que le coefficient de diffusion moyen du citrate en absence de nanoparticules est de  $5.25 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  (Figure 69).



*Figure 69 : Evolution du logarithme népérien du signal du citrate à 2,6 ppm en présence des nanoparticules en fonction du gradient de champ magnétique.*

Le coefficient de diffusion du citrate obtenu en présence de nanoparticules étant du même ordre de grandeur que celui du citrate en absence de nanoparticules, cela reflète une faible interaction du citrate avec la surface de la nanoparticule.

Les autres signaux apparentés à l'acide gluconique aux alentours de 4 ppm donnent aussi une évolution linéaire de la décroissance du logarithme népérien du signal. Le coefficient de diffusion moyen est mesuré à  $8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  correspondant à une petite molécule non adsorbée à la surface de la nanoparticule.

Le signal de l'isopropanol à 1,2 ppm montre par contre une évolution non linéaire de la décroissance du logarithme népérien du signal en fonction du gradient de champ magnétique. La perte de la linéarité indique la contribution de deux coefficients de diffusion. En effet, un des deux coefficients de diffusion ( $1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ) correspondrait à une molécule ayant une forte interaction avec la surface de la nanoparticule. Ce résultat signifie donc qu'une partie de l'isopropanol présent en solution est adsorbée à la surface de la nanoparticule de bismuth métallique ce qui est cohérent avec les difficultés rencontrées pour s'en affranchir (Figure 70).



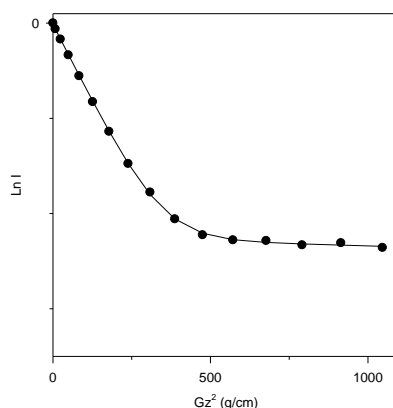


Figure 70 : Evolution du logarithme népérien du signal de l'isopropanol en fonction du gradient de champ magnétique.

## 2.2.5 Rendement de formation et concentration en nanoparticules

### 2.2.5.1 Rendement de formation des nanoparticules en bismuth

Le rendement de formation des nanoparticules a été évalué selon le protocole décrit dans le chapitre 1 par la dissolution oxydative des nanoparticules puis le dosage des ions Bi(III) par la dithizone à l'aide de la spectroscopie UV-Visible. La concentration de bismuth présente dans l'échantillon est calculée à partir de la mesure d'absorbance retranscrite sur la courbe d'étalonnage (voir chapitre 1). La quantité de Bi(III) dosée a été rapportée à la quantité initiale de Bi(III) présente dans le précurseur citrate de bismuth et de sodium pour quantifier le rendement de formation des nanoparticules de bismuth. Le rendement de formation des nanoparticules de bismuth est de 83% pour les nanoparticules synthétisées en flux continu sous chauffage thermique conventionnel. Ce résultat indique que l'augmentation de la quantité de D-glucose permet d'obtenir un saut de pH complet et un rendement de formation des nanoparticules correct.

### 2.2.5.2 Calcul de la concentration en nanoparticules

Le nombre de nanoparticules de bismuth a été estimé grâce au dosage du Bi(III) par spectroscopie UV-Visible en utilisant les calculs présentés en chapitre 1. Ce calcul nous donne un nombre de nanoparticule de bismuth de  $3,47 \cdot 10^{17}$  pour 3,0 mM de précurseur et une concentration en nanoparticules de bismuth de 7,2  $\mu$ M dans la solution finale après ultrafiltration.



### 2.2.6 Stabilité des nanoparticules dans différentes conditions

Les caractéristiques des nanoparticules de bismuth métallique obtenues en procédé continu sous irradiation microondes et sous chauffage thermique conventionnel sont comparées (Tableau 30).

	Flux continu sous irradiation microondes	Flux continu sous chauffage thermique conventionnel.
Diamètre DLS	52±19 nm	55±25 nm
Diamètre TEM	3±1,3 nm	3± 0,6 nm
Spectroscopie infrarouge	Revêtement citrate	Revêtement citrate
TGA	1 citrate /nm <sup>2</sup>	3 citrates/nm <sup>2</sup>
XPS	100 % Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	100 % Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Spectroscopie UV-Visible	Revêtement citrate	Revêtement citrate
Productivité	96 mg/h	110 mg/h
Rendement	75%	83%

Tableau 30 : Comparaison des caractéristiques des nanoparticules de bismuth métallique obtenues par flux continu sous irradiation microondes et sous chauffage thermique conventionnel.

Les nanoparticules synthétisées par les différents procédés continus ont à leur surface une couche d'oxyde de bismuth (Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Le flux continu sous chauffage thermique conventionnel a plusieurs avantages par rapport au flux continu sous irradiation microondes. En effet, pour des diamètres en DLS et TEM similaires, les nanoparticules obtenues en flux continu, utilisant le chauffage thermique conventionnel, contiennent plus de citrates à leur surface. La productivité a pu aussi être améliorée en augmentant le débit sans induire de phénomène d'emballement.

### 2.2.7 Stabilité des nanoparticules dans différentes conditions

#### 2.2.7.1 Stabilité chimique des nanoparticules en solution à différents pH

Dans la littérature, la dégradation des nanoparticules est souvent étudiée. En effet, Velasco-Arias *et al.* ont montré, par une étude en spectroscopie UV-Visible, une dégradation par dissolution chimique des nanoparticules de bismuth dans le DMSO.<sup>80</sup> La stabilité de nos nanoparticules en solution aqueuse ou en poudre a été évaluée afin d'envisager leur étude dans différentes applications biomédicale.



- Stabilité à pH=7

Tout d'abord, la stabilité des nanoparticules à pH=7 a été étudiée en spectroscopie UV-Visible à une longueur d'onde de 700 nm (Figure 71).

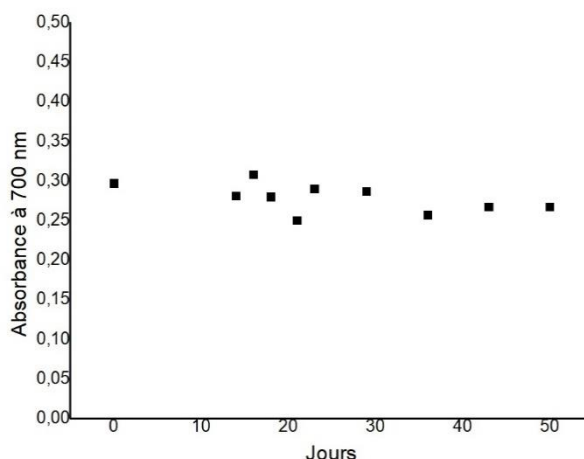


Figure 71: Stabilité des nanoparticules de bismuth métallique à pH=7 en fonction du temps

Aucune dégradation n'est observée en spectroscopie UV-Visible sur 50 jours au pH physiologique du sang.

- Stabilité à pH=5

La dégradation des nanoparticules a été étudiée par spectroscopie UV-Visible à pH=5. Ce pH a été choisi car il reflète l'acidité des lysosomes (Figure 72).<sup>142</sup> Dans la littérature, une dégradation des nanoparticules de bismuth à pH acide a été déjà reportée.<sup>24</sup>

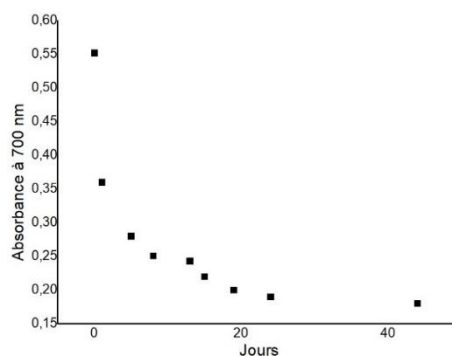


Figure 72: Stabilité des nanoparticules de bismuth métallique à pH=5 en fonction du temps.

A pH=5, l'absorbance diminue de 55% en 8 jours démontrant une dégradation des nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate.



- Sous atmosphère oxydante

Nous nous sommes demandés si cette dégradation ne provenait pas d'une oxydation surfacique de nos nanoparticules de bismuth métallique aboutissant à la dissolution progressive d'espèces Bi(III). La dégradation des nanoparticules sous atmosphère d'oxygène à pH= 7 a alors été étudiée par spectroscopie UV-Visible (Figure 73).

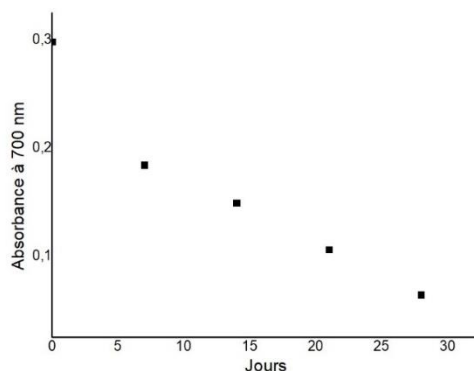


Figure 73: Dégradation des nanoparticules de bismuth métallique sous atmosphère d'oxygène.

Après 15 jours, l'absorbance a diminué de 50% ce qui prouve que les nanoparticules revêtues de citrate se dégradent sous atmosphère d'oxygène.

### 2.2.7.2 Stabilité colloïdale des nanoparticules

#### 2.2.7.2.1 En solution

Une étude de la stabilité des nanoparticules en solution à pH=7 a été réalisée *via* la mesure de leur diamètre hydrodynamique en DLS dans le temps. Les nanoparticules de bismuth métallique sont stables 20 jours à pH=7 avec un diamètre compris entre 40 et 70 nm sur cette durée (Figure 74).

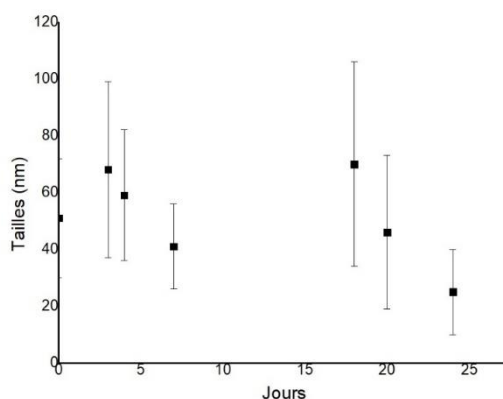


Figure 74: Suivi des diamètres des nanoparticules de bismuth métallique en fonction du temps à pH=7.



Le suivi des diamètres des nanoparticules en DLS est cohérent avec l'étude de stabilité en spectroscopie UV-Visible. Les nanoparticules sont stables en solution à pH=7 pendant une durée minimum de 20 jours. Cependant, dans une solution de 9 g/L de NaCl (150 mM), les nanoparticules ne sont pas stables car elles sédimentent après 10 minutes dans le sérum physiologique.

La stabilité à 37 °C des nanoparticules à pH=7 a aussi été étudiée par turbiscan sur vingt-quatre heures. Cette technique permet d'observer l'évolution de la turbidité d'une solution de nanoparticules à différentes hauteurs de tube en fonction du temps (Figure 75). Chaque couleur de courbe représente une mesure à un temps donné de 0 à 24 heures. L'abscisse de cette courbe représente la hauteur de l'échantillon à laquelle est mesurée la turbidité tandis que l'ordonnée représente la transmission du faisceau incident.

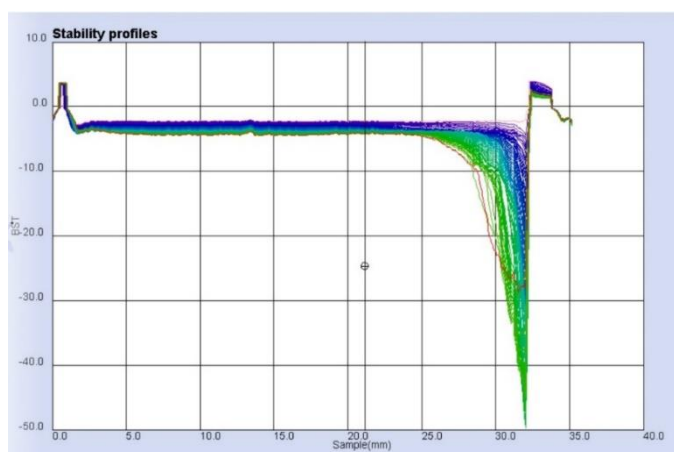


Figure 75: Stabilité des nanoparticules revêtues de citrate étudiée par turbiscan à pH=7

La courbe à t=0 est en rose et la dernière mesure à t= 24 h est en rouge. La différence de turbidité est faible entre les deux courbes, un phénomène de clarification est faiblement observé au-dessus du tube, par conséquent, la solution est considérée comme stable.<sup>143</sup> Les nanoparticules de bismuth sont ainsi stables au moins vingt-quatre heures à 37 °C à pH=7.

### 2.2.7.2.2 Sous forme de poudre après lyophilisation

Les nanoparticules de bismuth métallique ont été lyophilisées sans adjonction de cryoprotecteur. Le diamètre des nanoparticules a été contrôlé avant et après lyophilisation puis après un stockage d'un mois en poudre à température ambiante. Aucune évolution du diamètre n'a été constatée après lyophilisation et après stockage (Tableau 31).



	Avant lyophilisation	Après lyophilisation	Après stockage 1 mois en poudre
Diamètres (nm) en nombre (Proportions %)	55±25 (100%)	41±18 (100%)	44±17 (100%)

Tableau 31: Diamètres des nanoparticules avant/après lyophilisation et après 1 mois de stockage sous forme de poudre.

### 2.2.7.3 Stérilisation des nanoparticules de bismuth métallique

La stérilisation des nanoparticules a été réalisée dans le but de préparer des solutions injectables. Deux types de stérilisation ont été faites : la première est une stérilisation à l'aide d'un filtre 0,22 µm et la seconde est une stérilisation par la chaleur.

#### 2.2.7.3.1 Stérilisation par filtration

Cette méthode consiste à filtrer les nanoparticules à l'aide d'un filtre de 0,22 µm.

	Diamètres (nm) en nombre (Proportions %)
Avant la filtration	55±25 (100%)
Après la filtration	37±14 (100%)

Tableau 32: Diamètres des nanoparticules avant et après stérilisation à 0,22 µm

D'après les mesures de DLS réalisées, la stérilisation par filtration n'influence pas le diamètre des nanoparticules (Tableau 32). Nous n'avons cependant pas vérifié la stérilité des solutions obtenues après cette filtration.

#### 2.2.7.3.2 Stérilisation par la chaleur

La stérilisation par la chaleur a été réalisé en partenariat avec la société Pharmaphysic en utilisant un autoclave FEDEGARI modèle FOM/B fonctionnant en surpression.

Pour cette étude, trois formulations à deux concentrations en bismuth (4 mM et 2 mM) ont été réalisées. Un même lot de nanoparticules obtenues en flux continu sous chauffage thermique conventionnel puis ultrafiltrées a été utilisé.

- La première formulation est une solution de nanoparticules diluée avec de l'eau déminéralisée (pH=5-6).
- La seconde formulation est ajustée à pH=7 à l'aide de NaOH puis 300 mM de mannitol sont ajoutés pour obtenir une osmolarité similaire à celle du sang.
- La troisième formulation est ajustée à pH=7 à l'aide d'un tampon citrate à 2 mM et 300 mM de mannitol sont ajoutés pour obtenir une osmolarité similaire à celle du sang.



## Chapitre 2 : Du procédé non continu au procédé continu

- La quatrième formulation est ajustée à pH=7 à l'aide d'un tampon citrate à 4 mM et 300 mM de mannitol sont additionnés pour obtenir une osmolarité similaire à celle du sang.

Avant stérilisation, les nanoparticules sont caractérisées par leur diamètre en DLS et leur potentiel zêta, tandis que les solutions formulées sont caractérisées en plus par leur pH et leur osmolarité. (Tableau 33).

Concentrations en bismuth	Formulations	Diamètres (nm) en nombre (Proportions %)	Potentiels zêta (mV)	pH	Osmolarité (mOsm/kg)
4mM	Eau distillée	55±25 (100%)	-41	6,60	63
	Mannitol 300 mM	75±22 (100%)	-40	7,08	345
	Tampon citrate 2mM & Mannitol 300 mM	28±10 (100%)	-39	7,10	278
	Tampon citrate 4mM & Mannitol 300 mM	Dégradation chimique des nanoparticules			
2mM	Eau distillée	55±25 (100%)	-41	6,60	62
	Mannitol 300 mM	80±40 (100%)	-40	6,95	356
	Tampon citrate 2mM & Mannitol 300 mM	Dégradation chimique des nanoparticules			

Tableau 33: Caractéristiques des formules avant stérilisation.

La quatrième formulation conduit systématiquement à une dissolution des nanoparticules. On peut faire l'hypothèse qu'un large excès de citrate induit une « digestion progressive » (digestive ripening) comme décrit dans la littérature.<sup>144</sup>

Après stérilisation à 121°C pendant 15 min dans un autoclave, une observation visuelle des solutions est faite puis ces formulations sont caractérisées comme précédemment (Tableau 34).



Concentrations en bismuth	Milieu	Diamètres (nm) en nombre (Proportions %)	Potentiels zêta (mV)	pH	Osmolarité (mOsm/kg)	Observation visuelle après la stérilisation
4mM	Eau distillée	1967±477 (100%)	ND	6,77	N.D.	Précipité noir
	Mannitol 300 mM	1557±288 (100%)	ND	7,71	N.D.	Trouble blanc
	Tampon citrate 2mM & mannitol 300 mM	16±4 (100%)	-28	7,01	255	Limpide
2mM	Eau distillée	1145±160 (100%)	ND	7,71	N.D.	Trouble blanc
	Mannitol 300 mM	756±103 (33%) 1550±326 (67%)	ND	7,38	N.D.	Trouble blanc

Tableau 34: Caractéristiques des formules après stérilisation.

La solution de 4 mM en nanoparticules formulée avec du tampon citrate 2 mM et du mannitol 300 mM est la seule qui ne subit pas de dégradation chimique ou de perte de stabilité colloïdale pendant la stérilisation. C'est donc la seule solution où l'osmolalité est mesurée. En outre, la stérilisation ne modifie pas la stabilité des nanoparticules dans le temps pour cette formule comme le montre le tableau 35.

Formule pH=7, tampon citrate 2 mM, 300 mM de mannitol	Diamètres (nm) en nombre (Proportions %)	Durée de stabilité colloïdale
Avant stérilisation	28±10 (100%)	20 jours
Après stérilisation	16±4 (100%)	20 jours

Tableau 35: Stabilité des nanoparticules avant et après la stérilisation.

Néanmoins le diamètre des nanoparticules a diminué à 16±4 nm après la stérilisation. On ne retrouve pas de Bi(III) en solution par dosage colorimétrie ce qui semble exclure un phénomène de digestion progressive à la chaleur.

### 3 Conclusion

En se basant sur la littérature, plusieurs synthèses de nanoparticules en flux continu ont été développées afin d'améliorer la production de nanoparticules. La première synthèse a été développée en flux continu sous irradiation microondes. A cette fin, un réacteur en téflon a été usiné au laboratoire et celui-ci a été inséré dans un microonde. La solution est injectée à l'aide



d'une pompe HPLC. Ce procédé a permis d'augmenter la productivité de nanoparticules d'un facteur deux par rapport au procédé non continu. Cependant, à cause de phénomènes d'emballement du fluide délicats à maîtriser, nous avons décidé de réaliser un deuxième système en flux continu utilisant un chauffage thermique conventionnel. Le réacteur en téflon a été immergé dans de l'eau à 95 °C afin de produire les nanoparticules à un débit de 1,5 mL/min. Ce second procédé est plus performant car il permet de produire une plus grosse quantité de nanoparticules d'un diamètre DLS de 50 nm grâce à l'augmentation du débit.

Différentes caractérisations, RMN, DOSY, infrarouge ont confirmé que les nanoparticules sont revêtues de citrate. L'analyse DOSY montre que la force d'interaction du citrate avec la surface de la nanoparticule est faible. A notre connaissance, la littérature n'a jamais référencé des caractérisations aussi poussées pour ce type de nanoparticules de bismuth métallique.

Les nanoparticules peuvent être filtrées sur un filtre stérilisant de 0,22 µm.

Pour finir, des études de stabilité colloïdale ont été effectuées. Les nanoparticules sont stables dans une solution d'eau à pH=7 pendant 20 jours. Par contre la stabilité dans une solution de NaCl à 9 g/L (150 mM) s'est révélée médiocre (10 minutes). Cela nous a incité à mener une étude d'échange de ligands sur les nanoparticules afin d'améliorer leur stabilité colloïdale dans le sérum physiologique. Cette étude sera discutée dans le chapitre suivant.











# Chapitre 3 : Fonctionnalisation des nanoparticules







## 1 Préambule

Dans le chapitre précédent, nous avons montré qu'après optimisation, des nanoparticules de bismuth métallique pouvaient être obtenues de manière reproductible *via* deux procédés l'un en mode non continu sous irradiation microondes et l'autre en mode continu sous chauffage conventionnel. Ces deux voies de synthèses sont rappelées ci-dessous (Schéma 21).

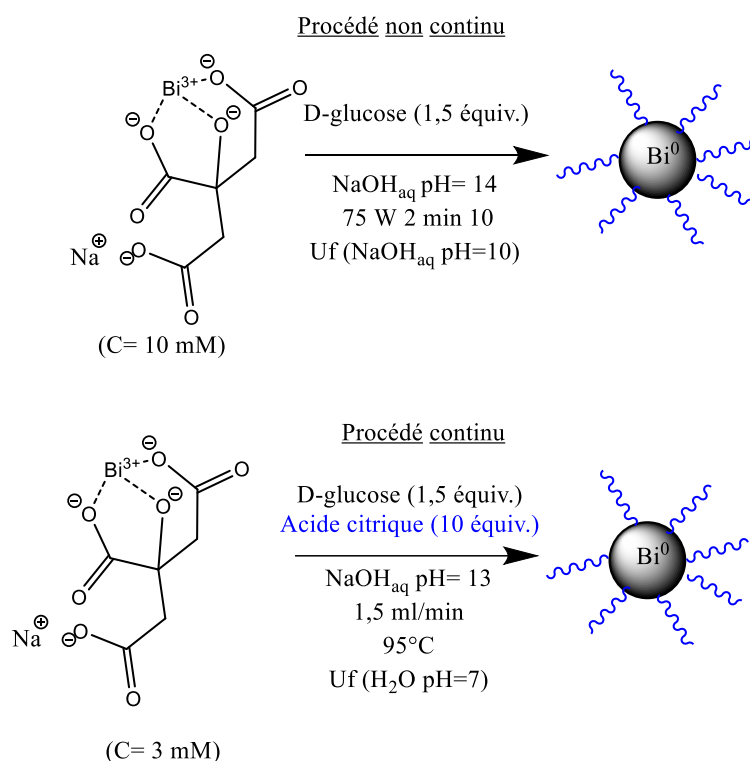


Schéma 21: Procédés de synthèse non continu et continu des nanoparticules.

Comme décrit dans le chapitre précédent, la stabilité des nanoparticules obtenues dépend du procédé. Dans le tableau 36, nous présentons les données de diamètres DLS et de stabilité visuelle obtenues à pH=7.

Procédés de synthèse	Diamètres (nm) en nombre à pH=7 (Proportions %)	Stabilité visuelle dans l'eau à pH =7	Stabilité visuelle dans une solution de 9 g/L de NaCl (150 mM)
Non continu	350±120 (100%)	15 min	< 5 min
Continu	55±25 (100%)	>1 mois	10 min

Tableau 36: Stabilité des nanoparticules synthétisées en système non continu et continu.

Aucune de ces nanoparticules ne sont stables plus de dix minutes dans une solution physiologique de 9 g/L de NaCl (150 mM) ce qui constitue une limite évidente pour envisager leurs applications biomédicales.



En parallèle une étude RMN DOSY a été réalisée pour caractériser l'interaction entre l'agent de revêtement et la surface de la nanoparticule (Chapitre 2). Cette analyse a montré un échange rapide entre le citrate adsorbé et celui en solution. Le citrate est donc un ligand en interaction faible avec la surface. Cette interaction faible explique sans doute le manque de stabilité des nanoparticules malgré les quatre sites de coordination possibles du citrate sur la nanoparticule.<sup>145</sup>

Compte tenu de la reproductibilité des synthèses de nanoparticules à revêtement citrate, nous avons choisi ces nanoparticules pour modifier leur surface *via* un échange de ligand afin de mieux stabiliser les nanoparticules résultantes dans des milieux physiologiques. Dans cette stratégie, la faible adsorption du citrate devient un avantage puisqu'elle va favoriser l'échange par un ligand ayant potentiellement une interaction plus forte avec la surface de la nanoparticule que le citrate. Nous avons fait le choix délibéré d'identifier un ligand monomérique et non pas polymérique pour mettre en œuvre cet échange afin de mieux contrôler la polydispersité et la fonctionnalisation ultérieure des nanoparticules. Cette stratégie d'échange de ligand a aussi été mise en œuvre pour accéder à des nanoparticules hydrophobes et fluorophiles dans le but de les incorporer dans des émulsions.

## 2 Stabilisation des nanoparticules dans le sérum physiologique

### 2.1 Stratégies de synthèse adoptées

La première partie de ce travail a consisté à rechercher un agent de revêtement (ligand) monomérique ayant une forte affinité pour la surface des nanoparticules et pouvant s'échanger avec le citrate. Ce travail a été laborieux car la littérature ne donne aucune information quant aux fonctions organiques ayant une forte affinité avec la surface des nanoparticules de bismuth. De plus, la stabilité colloïdale en milieu aqueux des nanoparticules de bismuth métallique est rarement discutée dans les articles. Les différents agents de revêtement décrits pour stabiliser les nanoparticules de bismuth métallique sont regroupées dans le tableau 37.



Ligands monomériques	Solvants de synthèse	Modes de synthèse
Citrate <sup>44</sup>	Diéthylène glycol	Polyol
Acétone <sup>146</sup>	Éthylène glycol	
Éthanol <sup>51</sup>	Éthanol absolu/éthylène glycol	
Éthylène glycol <sup>54</sup>	Éthylène glycol	
Glycérol <sup>38</sup>	Glycérol	
SOA <sup>100,103</sup>	Eau	Réduction dans l’eau
BAL <sup>83,86,147,86</sup>		
Citrate <sup>87</sup>		
TOPO <sup>88</sup>		
Acide tartrique <sup>102</sup>		
Manitol		
Saponine <sup>97</sup>		
Acide nitrilotriacétique <sup>91</sup>		
Dodécanthiol <sup>63,72,73,76,64</sup>	Octadécène/ THF	Réduction dans un solvant organique
TOP <sup>74,75</sup>	Dioctyl éther	
tBuONa <sup>78</sup>	THF	
D-Glucose <sup>65–67,71</sup>	1,2-propanediol	
Citrate <sup>80</sup>	DMSO	
Acide oléique <sup>64,81</sup>	Oléamine/heptane	
Octyne <sup>60</sup>	THF	
Acide ascorbique <sup>62</sup>	Éthylène glycol	
Acide Oléique <sup>25,33</sup>	Héxadécylamine	Décomposition thermique
Na(N(SiMe <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sup>34</sup>	THF + DIPB	
Dodécanthiol <sup>29,35</sup>	Dodécanethiol	
(C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> S) <sub>2</sub> <sup>30</sup>	Pas de solvant	
Oxyde de graphène <sup>23</sup>	DMSO	
Oléamine <sup>16</sup>	Heptane	Microréacteur
AOT <sup>22</sup>	Eau	
Acide tartrique <sup>17</sup>		

Tableau 37: Ligands monomériques décrits comme stabilisants des nanoparticules de bismuth métallique.

Nous avons voulu aussi sélectionner un ligand monomérique bifonctionnel en vue de le coupler soit : (Schéma 22) :

- à des chaînes hydrophiles améliorant la dispersion aqueuse et/ou la furtivité et/ou la stabilité (par exemple des PEG).<sup>148</sup>
- à des chaînes hydrophobes (C<sub>n</sub>) ou fluorophiles (F<sub>n</sub>) dans l'optique d'incorporer les nanoparticules dans des émulsions d'huile dans l'eau.



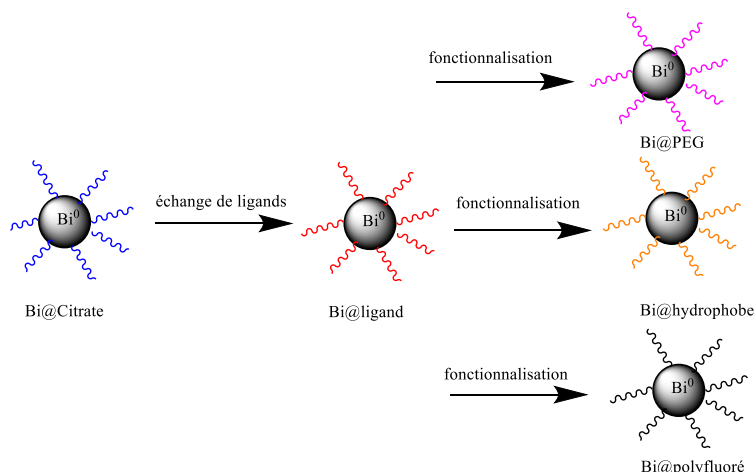


Schéma 22: Stratégie élaborée au laboratoire.

Le ligand le plus adéquat recherché doit donc satisfaire aux cahiers des charges suivant :

- Monomérique et fortement adsorbé sur la surface des nanoparticules de bismuth pour les stabiliser.
- Bifonctionnel.
- Biocompatible.
- Echangeable dans des conditions opératoires respectant les critères de la chimie verte.

### 2.2 Échanges de ligands

A notre connaissance, seulement quelques échanges de ligands ont été décrits sur des nanoparticules de bismuth métallique (Schéma 23 et 24).

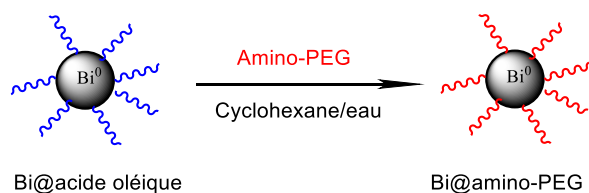


Schéma 23 : Echange de ligands sur des nanoparticules de bismuth décrit par Bi et al.

Dans le travail de Bi *et al.*, l'acide oléique adsorbé à la surface de la nanoparticule est échangé par un amino-polyéthylène glycol. Les auteurs décrivent très succinctement cet échange et le démontre qualitativement par spectroscopie infrarouge mais ils ne justifient pas le choix du groupement amine qui est probablement impliquée dans l'adsorption surfacique. Le mélange de solvants biphasique permet d'effectuer l'échange en réaction interfaciale car les nanoparticules revêtues d'acide oléique sont solubles dans le cyclohexane et le PEG dans l'eau.<sup>25</sup>



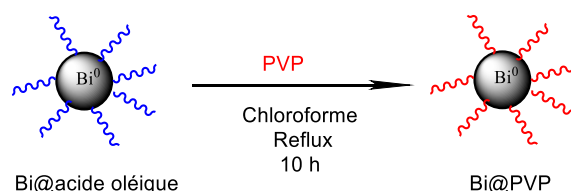


Schéma 24 : Echange de ligand sur des nanoparticules de bismuth décrit par Winter *et al.*

Winter *et al.* ont effectué un échange de ligand entre l'acide oléique et le PVP dans le chloroforme à reflux pendant dix heures afin de disperser les nanoparticules en phase aqueuse. Là encore, les conditions expérimentales sont décrites succinctement et la démonstration qualitative de l'échange est apportée par les analyses en spectroscopie infrarouge.

## 2.2.1 Étude préliminaire sur le choix de l'agent de revêtement

Ce travail préliminaire a été effectué sur cinquante ligands différents mono ou polyfonctionnels décrits dans la littérature pour stabiliser notamment des nanoparticules d'or<sup>149</sup> et d'oxyde de fer.<sup>150</sup> Pour des raisons chronologiques, cette étude a été menée sur les nanoparticules de citrate obtenues en procédé non continu.

Afin de réaliser cet échange dans des conditions vertes, le ligand (5 équivalents) a été mis en présence de nanoparticules de citrate à pH=10. Cette solution basique a ensuite été irradiée sous microondes à 75 W pendant une minute. Les nouvelles nanoparticules obtenues ont été purifiées par centrifugation (Schéma 25).

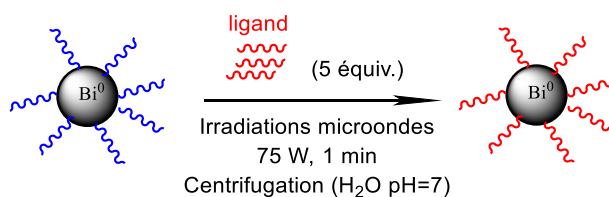
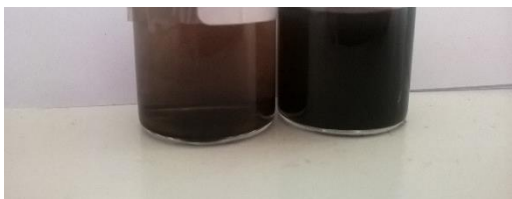


Schéma 25 : Echange de ligands sous irradiation microondes (en bleu le citrate et en rouge le ligand d'échange).

Pour confirmer l'échange de ligand, plusieurs paramètres ont été comparés comme la stabilité colloïdale, le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta des nanoparticules. La stabilité colloïdale est à la fois déterminée visuellement à pH=7 (Figure 76) et en mesurant le potentiel zêta à ce même pH. Comme indiqué précédemment (Chapitre 1), la littérature mentionne qu'un potentiel zêta inférieur à -30 mV ou supérieur à +30 mV caractérise une nanoparticule stable.<sup>123,151</sup>





*Figure 76: Lot de nanoparticules instables visuellement (présence d'un précipité) à gauche et lot de nanoparticules stables visuellement à droite à pH=7.*

Ces analyses ont été menées sur tous les ligands testés (voir annexe 3). Cependant, nous avons choisi de ne présenter que les six ligands ayant donné les meilleurs résultats en termes de stabilité visuelle à pH=7 en comparaison à la nanoparticule citrate de départ (Tableau 38).

Ligands (à pH=7)	Diamètres (nm) en nombre à pH=7	Potentiels zêta à pH=7	Stabilité à pH=7
------------------	---------------------------------	------------------------	------------------



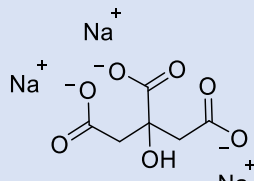
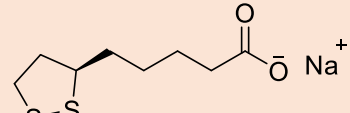
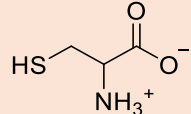
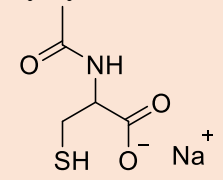
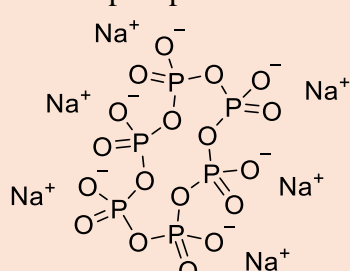
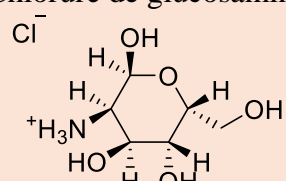
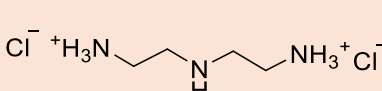
	(Proportions %)	(mV)	
Citrate de sodium (nanoparticules de départ) 	350±120 (100%)	-5	<5 minutes
(R)-Lipoate de sodium 	342±107 (72%) 4429±910 (1%) 136±19 (27%)	-35	2 heures
Cystéine 	67±15 (95%) 263±125 (5%)	-33	1 heure
N-Acétylcystéine de sodium 	52±11 (60%) 150±70 (40%)	-26	30 minutes
Hexamétaphosphate de sodium 	86±16 (63%) 292±66 (30%) 790±147 (7%)	-35	45 minutes
Chlorure de glucosamine 	197±51 (25%) 681±143 (12%) 73±10 (63%)	-38	30 minutes
Chlorure de diéthylènetriamine 	303±163 (100%)	-35	45 minutes

Tableau 38 : Résultats de l'étude préliminaire des échanges de ligands à partir de nanoparticules revêtues de citrate synthétisées en procédé non continu.

Les nanoparticules les plus stables obtenues à l'issue de cet échange sont revêtues de (R)-lipoate de sodium. Cet agent de revêtement a souvent été utilisé pour stabiliser des



nanoparticules d'or en raison de l'affinité du soufre pour l'or.<sup>145,148</sup> Cette étude nous a donc permis de sélectionner l'acide (*R*)-lipoïque sur cinquante ligands car il satisfait notre cahier des charges détaillé ci-dessous (Figure 77).

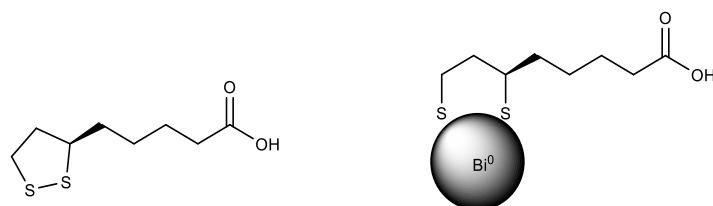


Figure 77 : Acide (*R*)-lipoïque et représentation schématique de son adsorption à la surface des nanoparticules de bismuth

- Forte adsorption à la surface du bismuth

L'acide (*R*)-lipoïque est un ligand monomérique bifonctionnel constitué d'un cycle 1,2-dithiolane et d'un acide carboxylique. Par analogie aux travaux décrits sur les nanoparticules d'or, on suppose que l'adsorption de l'acide lipoïque sur la surface des nanoparticules de bismuth métallique se fait *via* les fonctions thiols et non pas carboxylates (Figure 78).<sup>152</sup>

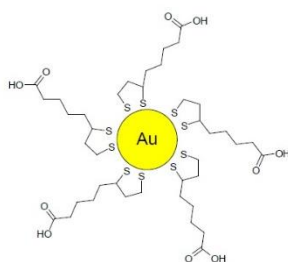


Figure 78 : Représentation d'une nanoparticule d'or revêtue d'acide lipoïque

Dans le cas des nanoparticules d'or, il a été montré que l'hétérocycle n'a pas besoin d'être ouvert par réduction en acide (*R*)-6,8-dimercaptooctanoïque pour s'adsorber à la surface des nanoparticules d'or.<sup>149</sup> Ce point sera à vérifier pour nos nanoparticules (voir § 2.2.2. 1).

- Bifonctionnel pour la fonctionnalisation des nanoparticules.

Si le mode d'adsorption de l'acide (*R*)-lipoïque est bien celui proposé sur les figures 77 et 78, alors l'acide carboxylique peut permettre la fonctionnalisation des nanoparticules. Dans la littérature, des nanoparticules d'or revêtues d'acide (*R*)-lipoïque fonctionnalisées par du polyéthylène glycol ont ainsi été stabilisées dans une solution de 400 mM de NaCl.<sup>145,153</sup>

- Biocompatible



L'acide (*R*)-lipoïque peut être synthétisé par une souche d'*E.coli* génétiquement modifiée.<sup>154</sup> Aucune toxicité de l'acide (*R*)-Lipoïque n'a été observé après administration par voie orale ou intraveineuse à une dose de 600 mg par jour délivrée pendant 6 mois.<sup>155,156</sup>

L'acide (*R*)-lipoïque est avant tout un antioxydant qui a été décrit comme piègeur de radicaux libres provenant d'espèces réactives de l'oxygène, dans la chélation des ions métalliques et dans la régénération d'antioxydants, tels que la vitamine E, la vitamine C et le glutathion.<sup>157</sup> Il est commercialisé en tant que complément alimentaire et est aussi étudié en clinique dans des pathologies telles que la polyneuropathie diabétique, des pathologies inflammatoires et neuro-dégénératives ainsi que dans la prévention de maladies vasculaires.<sup>157</sup>

- Echange de ligand entre le citrate et le (*R*)-lipoate de sodium

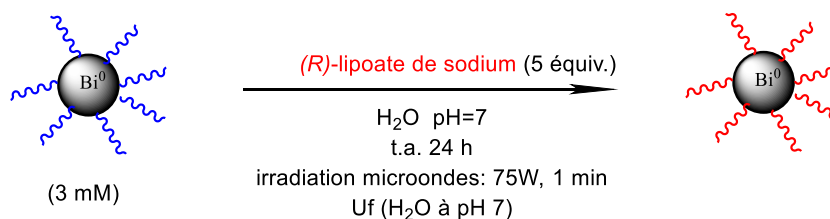
Les conditions expérimentales de l'échange de ligand que nous avons mises en œuvre respectent les critères de la chimie verte car elles ne nécessitent pas l'utilisation de solvants organiques.

### 2.2.2 Echange de ligand entre le citrate et le (*R*)-lipoate de sodium

Maintenant que le ligand a été sélectionné suivant nos différents critères, l'objectif est d'optimiser les conditions d'échange.

#### 2.2.2.1 Etude et optimisation des conditions d'échange

A partir des nanoparticules obtenues par procédé continu (Chapitre 2), l'échange de ligand a été étudié avec ou sans chauffage sous irradiation microondes (Schéma 26).



*Schéma 26: Echange du citrate avec le (*R*)-lipoate de sodium.*

Cet échange est suivi en mesurant le diamètre et le potentiel zêta des nanoparticules (Tableau 39).

Agents de revêtement	Diamètres en nombre (nm) (Proportions %)	Potentiels zêta à pH=7 (mV)
----------------------	---------------------------------------------	-----------------------------



Citrate	55±25 (100%)	-47
(R)-lipoate de sodium	Microondes : 82±28 (100%)	-43
	t.a. : 55±14 (100%)	-20

Tableau 39 : Comparaison des diamètres et du potentiel zêta des nanoparticules revêtues de citrate et de (R)-lipoate.

Ces premiers résultats montrent que les conditions d'échange à température ambiante durant vingt-quatre heures permettent d'obtenir la plus importante variation du potentiel zêta ce qui assure que l'échange a bien eu lieu. De plus d'un point de vue énergétique, les conditions à température ambiante sont plus vertes que par chauffage sous irradiation microondes. Ces conditions pour la suite du travail ont donc été sélectionnées.

L'échange a pu être aussi confirmé par une mesure en spectroscopie UV-Visible. En effet, la plupart des nanoparticules métalliques sont caractérisées par un plasmon de surface dont la bande d'absorption est dans la gamme UV-Visible.<sup>158</sup> Le plasmon est dû à la structure métallique des nanoparticules qui contiennent des électrons libres délocalisés dans tout le volume du matériau. Ces électrons libres interagissent avec la lumière à une certaine longueur d'onde. Ce phénomène est retranscrit par une bande d'absorption en spectroscopie UV-Visible définie comme la bande plasmonique. Celle-ci dépend de la forme et du diamètre de la nanoparticule mais aussi de l'agent de revêtement greffé à sa surface. Grâce à la spectroscopie UV-Visible, il a aussi été possible de suivre l'évolution de l'échange. En effet, il a été montré que deux agents de revêtements distincts adsorbés sur la nanoparticule peuvent déplacer la bande plasmonique de plusieurs façons :<sup>159</sup>

- Soit les deux bandes plasmoniques créées par les deux agents de revêtement sont moyennées et ne donnent qu'une seule bande plasmonique intermédiaire.
- Soit deux bandes plasmoniques distinctes sont obtenues pour chaque agent de revêtement.

Dans notre cas, le deuxième phénomène est observé sur nos nanoparticules ce qui nous a permis de suivre plus facilement l'échange complet de ligand (Figure 79).

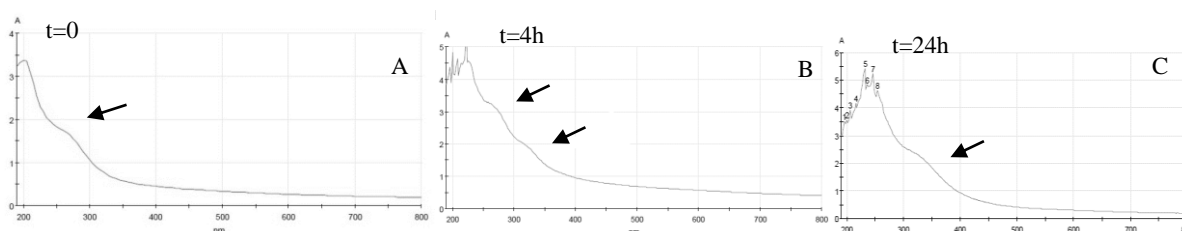


Figure 79: Suivi par spectroscopie UV-Visible de l'échange du citrate avec le (R)-lipoate de sodium.



Au départ de la réaction, la bande à 268 nm correspond spécifiquement aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate (Figure 79A).<sup>19</sup> Après quatre heures de réaction, deux bandes plasmoniques sont observées, l'une est caractéristique du revêtement citrate (268 nm) à la surface et l'autre est caractéristique d'un revêtement par une molécule contenant des thiols (330 nm) à la surface des nanoparticules (Figure 79B). Après vingt-quatre heures de réaction, une seule bande plasmonique à 330 nm est observée correspondant aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de (*R*)-lipoate de sodium (Figure 79C).<sup>86</sup>

L'optimisation a ensuite consisté à étudier la quantité de (*R*)-lipoate de sodium nécessaire pour revêtir totalement les nanoparticules. Bien que nous ayons montré la capacité du (*R*)-lipoate de sodium à s'échanger avec le citrate sous sa forme oxydée cyclique, le revêtement (*R*)-lipoate a aussi été testé sous sa forme réduite par analogie avec des travaux réalisés sur les nanoparticules d'or.<sup>149</sup> (Schéma 27, Tableau 40)

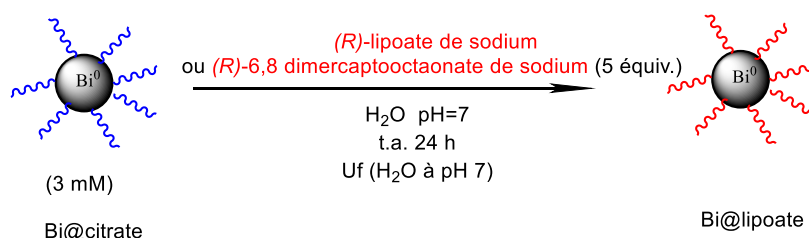


Schéma 27 : Echange de ligand entre le citrate (en bleu) et le (*R*)-lipoate de sodium sous sa forme réduite ou oxydée (en rouge).

Équivalents de ligand	( <i>R</i> )-lipoate de sodium	Diamètres (nm) en nombre (Proportions %)	Potentiels zêta (mV)
20	( <i>R</i> )-lipoate (Forme oxydée)	Dissolution chimique des nanoparticules	
10	( <i>R</i> )-6,8-dimercaptooctanoate (Forme réduite)	Dissolution chimique des nanoparticules	
10	( <i>R</i> )-lipoate (Forme oxydée)	58± 26 (100%)	-20
5	( <i>R</i> )-lipoate	50±16 (100%)	-20



	(Forme oxydée)		
3	( <i>R</i> )-lipoate (Forme oxydée)	$39 \pm 8$ (100%)	-20

Tableau 40 : Optimisation de la quantité (*R*)-lipoate de sodium.

L'utilisation de vingt équivalents de la forme oxydée ou dix équivalents de la forme réduite du (*R*)-lipoate de sodium ont conduit à la dissolution des nanoparticules. Ce phénomène de digestion progressive (digestive ripening), décrit dans la littérature, s'explique par un décapage de la surface provoqué par l'agent de revêtement se complexant aux atomes de surface des nanoparticules (Figure 80).<sup>144</sup> Cet effet confirme que le ligand (*R*)-lipoate de sodium s'adsorbe fortement sur la surface des nanoparticules de bismuth.

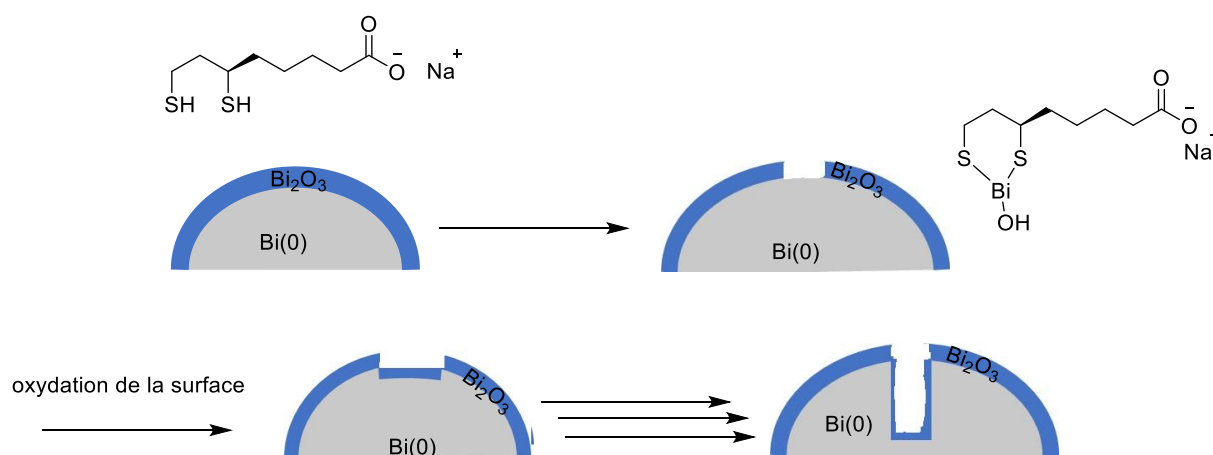


Figure 80: phénomène de décapage

Nos résultats montrent qu'il n'est pas nécessaire de réduire le (*R*)-lipoate afin qu'il s'adsorbe sur la surface. Pour expliquer ce résultat, nous faisons l'hypothèse d'une réaction d'oxydo-réduction surfacique puisque nos nanoparticules revêtues de citrate contiennent une couche d'oxyde de bismuth présente à leur surface d'après nos résultats de XPS (Figure 81). Ce mécanisme a été proposé pour les nanoparticules d'or.<sup>145</sup>

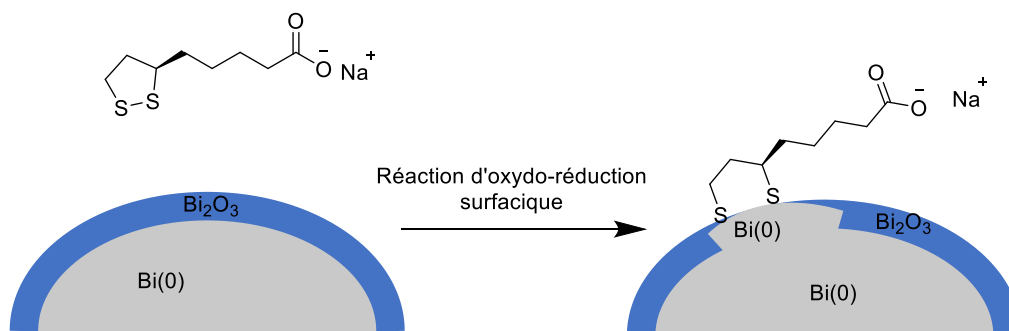


Figure 81: Hypothèse de la réaction d'oxydo-réduction surfacique entre la couche d'oxyde de bismuth à la surface de la nanoparticule et le (*R*)-lipoate de sodium.



### 2.2.2.2 Étude de reproductibilité

La reproductibilité des conditions d'échange de ligand dans les conditions vertes a été testée (Schéma 28).

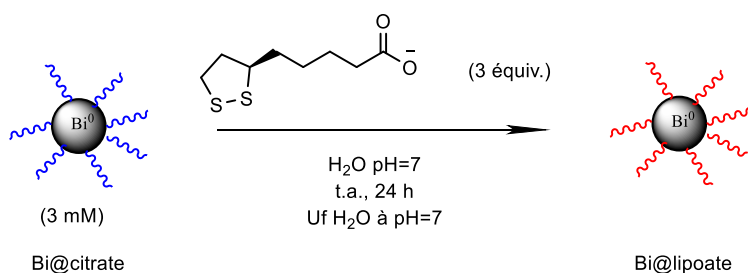


Schéma 28: Echange de ligands entre le citrate (en bleu) et le (R)-lipoate de sodium (en rouge).

Les résultats de l'étude de reproductibilité sont reportés dans le tableau 41.

Essais	Diamètres (nm) en nombre (Proportions %)	Potentiels zêta (mV) à pH=7
1	39±8 (100%)	-20
2	25±5 (100%)	-18
3	27±8 (100%)	-19

Tableau 41 : Diamètres et potentiels zêta des nanoparticules après l'échange de ligand.

L'échange de ligand est reproductible compte tenu des diamètres et des potentiels zêta mesurés. Néanmoins, les potentiels zêta mesurés sont supérieurs à -30 mV ce qui est insuffisant pour assurer une stabilité de nos nanoparticules selon la littérature.<sup>151</sup>

### 2.2.2.3 Caractérisations des nanoparticules revêtues d'acide (R)-lipoïque

Afin de caractériser rigoureusement le revêtement de la nanoparticule, plusieurs techniques sont utilisées.

#### 2.2.2.3.1 Spectroscopie infrarouge

Les nanoparticules revêtues par du (R)-lipoate ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge comme le montre la figure 82.



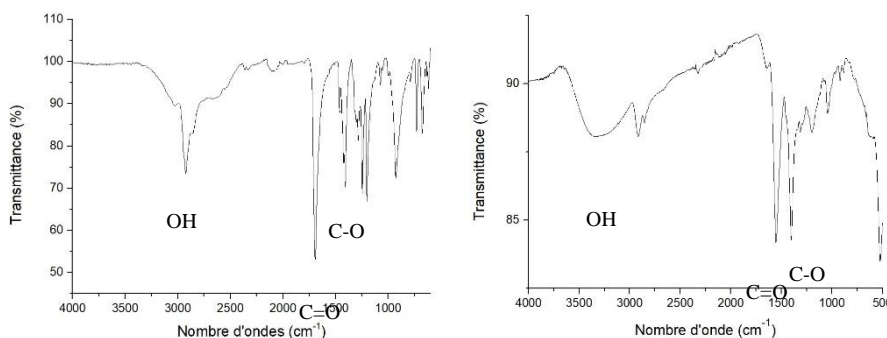


Figure 82: Spectre infrarouge de (*R*)-lipoate (à gauche) et des nanoparticules revêtues de (*R*)-lipoate (à droite).

En comparant, les analyses infrarouges des nanoparticules et de (*R*)-lipoate, une bande de vibration caractéristique apparaît à  $3274\text{ cm}^{-1}$  relatives aux groupements hydroxyles de l'acide carboxylique. Des bandes à  $1535\text{ cm}^{-1}$  et à  $1388\text{ cm}^{-1}$  correspondent à la liaison C=O et C-O respectivement. Nos conditions de spectroscopie infrarouge ne permettent de détecter les vibrations des liaisons S-S ( $400\text{-}700$ ). La bande à  $2600\text{ cm}^{-1}$  ne peut pas être attribué à une liaison SH d'après la littérature.<sup>128</sup> Compte tenu des similitudes entre les deux spectres infrarouges, le (*R*)-lipoate est bien présent à la surface des nanoparticules de bismuth.<sup>152</sup>

#### 2.2.2.3.2 Spectroscopie UV-Visible

Les nanoparticules revêtues par le (*R*)-lipoate ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible. Les nanoparticules absorbent dans tout le domaine spectral de 200 à 800 nm. Le spectre obtenu est identique à celui des nanoparticules de bismuth revêtues de dimercaptopropanol décrites dans la littérature.<sup>86</sup> La bande identifiée à 330 nm est caractéristique des nanoparticules de bismuth métallique revêtues de molécules contenant des thiols (Figure 83).<sup>86</sup>

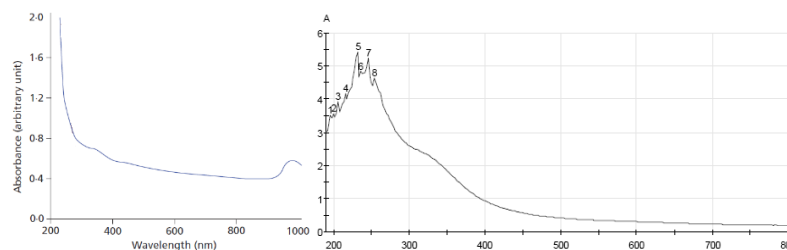


Figure 83: Spectre UV-Visible des nanoparticules revêtues de dimercaptopropanol décrites par Badireddy et al.<sup>86</sup> (à gauche), spectre UV-Visible des nanoparticules revêtues de (*R*)-lipoate (à droite).

En conclusion, les analyses infrarouges et UV-Visible démontrent que les nanoparticules sont revêtues de (*R*)-lipoate.



#### 2.2.2.4 Stabilité des nanoparticules avec un revêtement (R)-lipoate de sodium

La stabilité colloïdale à pH=7 des nanoparticules revêtues de (R)-lipoate a été étudiée et comparée à la stabilité des nanoparticules avec un revêtement citrate (Tableau 42).

Agents de revêtement	Diamètres en nombre à pH=7 (nm) (Proportions %)	Potentiels zêta à pH=7 (mV)	Stabilité visuelle dans l'eau à pH=7	Stabilité visuelle d'une solution de 9 g/L de NaCl (150 mM)
Citrate	55± 6 (100%)	-47	1 mois	<5 minutes
(R)-Lipoate	39±8 (100%)	-20	1 heure	10 minutes

Tableau 42: Stabilité colloïdale à pH=7 des nanoparticules revêtues de (R)-lipoate et citrate.

En solution à pH=7, les nanoparticules revêtues de citrate sont plus stables que celles revêtues de (R)-lipoate. Cette diminution de la stabilité est confirmée par la mesure du potentiel zêta qui passe de -47 mV pour un revêtement citrate à -20 mV pour le (R)-lipoate. Cette modification du potentiel zêta s'explique par une diminution des charges négatives apportées par le (R)-lipoate qui ne possède qu'un seul carboxylate à la différence du citrate qui en a trois.

Dans une solution de 9 g/L de NaCl (150 mM), la stabilité des nanoparticules avec un agent de revêtement citrate ou (R)-lipoate est faible de l'ordre de quelques minutes ce qui est insuffisant pour envisager des applications biomédicales. L'ajout de NaCl provoque des effets de compression de la double couche en raison de l'écrantage des forces ioniques.<sup>160</sup>

Pour améliorer la stabilité des nanoparticules dans une solution de 9 g/L de NaCl (150 mM), plusieurs stratégies ont été adoptées :

- La première stratégie a été de coupler l'acide (R)-lipoïque avec un PEG pour induire une stabilisation stérique des nanoparticules. Cette stratégie est déjà connue pour les nanoparticules de bismuth.<sup>25,95,96</sup>
- La deuxième stratégie consiste à incorporer les nanoparticules dans des émulsions huile hydrophobe/eau ou huile fluorée/eau puis de stabiliser ces émulsions en présence de tensio-actifs. Pour y parvenir, les nanoparticules ont été fonctionnalisées avec des revêtements hydrophobes ou polyfluorés.

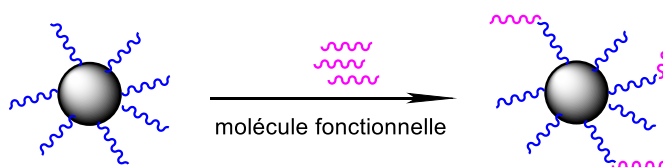
### 2.3 Fonctionnalisation des nanoparticules par différents agents de revêtement

La fonctionnalisation des nanoparticules a été décrite dans la littérature suivant deux stratégies illustrées ci-dessous (Schéma 29).



## Chapitre 3 : Fonctionnalisation des nanoparticules

### Fonctionnalisation directement sur la nanoparticule



### Via un échange de ligand

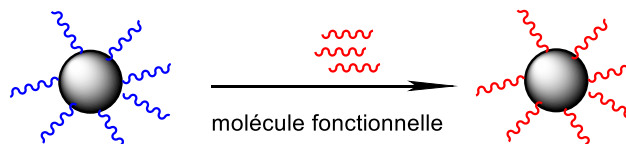


Schéma 29 : Les deux stratégies de fonctionnalisation des nanoparticules.

La molécule fonctionnelle peut être introduit directement sur la nanoparticule *via* une réaction de couplage sur le (*R*)-lipoate. Néanmoins, cette première stratégie qui semble simple nécessite de trouver des conditions réactionnelles compatibles avec la faible stabilité des nanoparticules revêtues de (*R*)-lipoate. De plus, elle nécessite aussi de mettre au point des outils analytiques permettant de quantifier le taux de greffage. Compte tenu de ces contraintes, nous n'avons pas retenu cette stratégie.

La seconde stratégie consiste à introduire des agents de revêtement préalablement fonctionnalisés et caractérisés afin de réaliser un échange de ligand. Cet échange est plus facile à confirmer qualitativement par différentes techniques spectroscopiques. Il peut aussi être évalué quantitativement même si à notre connaissance cela est très rarement spécifié dans la littérature.<sup>161</sup> C'est cette seconde stratégie que nous avons retenue.

### 2.3.1 Fonctionnalisation des nanoparticules avec un AL-PEG

L'acide (*R*)-lipoïque (AL) a été couplé à des chaînes PEG de longueur variable (*n*) pour obtenir des structures que nous nommerons AL-PEG<sub>*n*</sub>-OMe. L'adsorption des AL-PEG<sub>*n*</sub>-OMe sur la surface des nanoparticules est susceptible d'améliorer leur stabilité comme décrit dans la littérature.<sup>145</sup> En effet, la stabilité peut dépendre de la longueur des chaînes PEG.<sup>161,162</sup> Les PEG sont d'autant plus intéressants qu'ils sont présentés comme biocompatibles et non toxiques.<sup>145</sup>



### 2.3.1.1 Synthèse des dérivés AL-PEG<sub>n</sub>-OMe

Cette synthèse décrite dans la littérature a été optimisée lors du stage de Master 2 de Marion Dequenne (de Janvier 2018 à Juillet 2018). Pour accéder aux différents dérivés PEG, nous avons mis en œuvre la séquence réactionnelle décrite ci-dessous en quatre étapes (Schéma 30).

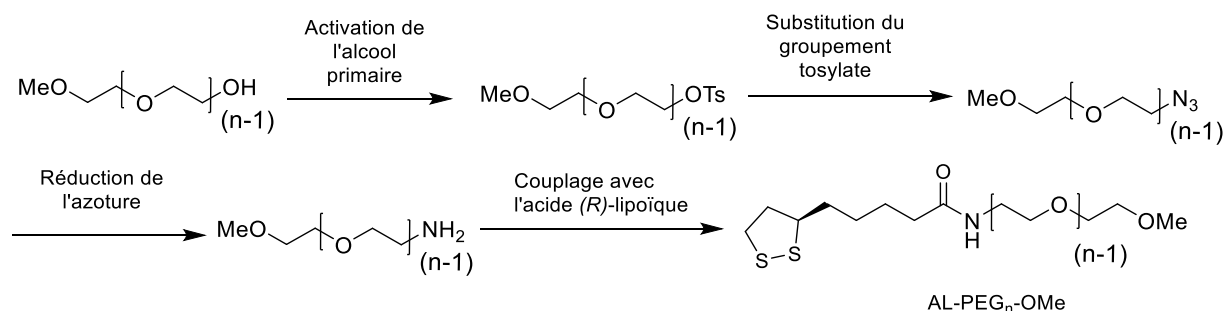


Schéma 30 : Séquence réactionnelle pour obtenir l'acide (R)-lipoïque pegylé AL-PEG<sub>n</sub>-OMe.

Les produits de départ de cette synthèse sont des PEG de longueur de chaîne variable ( $n = 8, 12, 17, 23$ ) monosubstitués par un groupement méthoxy. Ces composés commerciaux seront nommés comme suit : MeO-PEG<sub>n</sub>-OH ( $n = 8, 12, 17, 23$ ).

La première étape consiste à tosyler le groupement hydroxyle du MeO-PEG<sub>n</sub>-OH pour activer l'alcool primaire. La deuxième étape est la substitution du tosylate par l'azoture de sodium pour isoler l'azide MeO-PEG<sub>n</sub>-N<sub>3</sub>. Dans la troisième étape, l'azoture est réduit en amine puis couplé avec l'acide (R)-lipoïque dans une quatrième étape.

#### 2.3.1.1.1 Activation de l'alcool primaire

Dans la première étape, l'alcool de la chaîne MeO-PEG<sub>n</sub>-OH ( $n = 8, 12, 17, 23$ ) est activé par un groupement tosyloxy. Cette réaction se déroule dans de la pyridine anhydre avec du chlorure de *p*-toluène sulfonyle (Schéma 31).

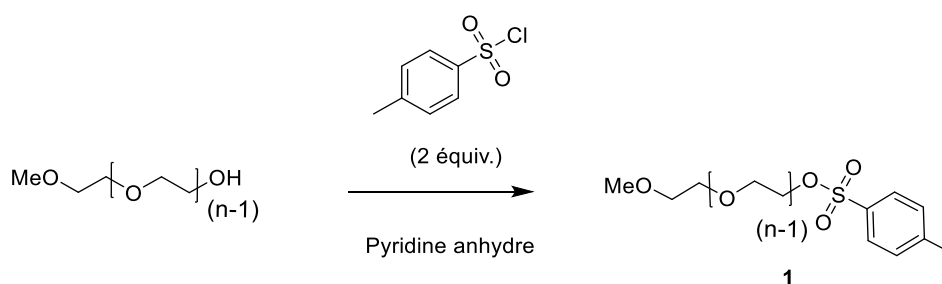


Schéma 31 : Activation du groupement hydroxyle du MeO-PEG-OH.



Les résultats suivants ont été obtenus en faisant varier la longueur de la chaîne et les quantités de réactifs de départ (Tableau 43).

	Temps (heures)	Masse du composé <b>1</b>
MeO-PEG <sub>23</sub> -OH (2 g)	24	1,74 g
MeO-PEG <sub>17</sub> -OH (2 g)	5	1,98 g
MeO-PEG <sub>12</sub> -OH (1 g)	16	0,98 g
MeO-PEG <sub>8</sub> -OH (1g)	20	0,94 g

Tableau 43 : Temps de réaction et quantités de produit tosylés.

Seuls des lavages de la phase organique ont été réalisés pour purifier les produits car ils sont difficilement isolables par chromatographie. Les bruts réactionnels ont été directement engagés dans l'étape suivante et de ce fait, seules les masses ont été indiquées dans le tableau précédent.

#### 2.3.1.1.2 Substitution du groupement tosylate par un azoture

La deuxième étape consiste à substituer le tosylate de la chaîne MeO-PEG<sub>n</sub>-OTs (n= 8, 12, 17, 23) par un azoture.<sup>149</sup> Le MeO-PEG<sub>n</sub>-OTs est solubilisé dans de l'acétonitrile anhydre, puis substitué en présence d'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>). La solution est agitée au reflux à 80 °C (Schéma 32).

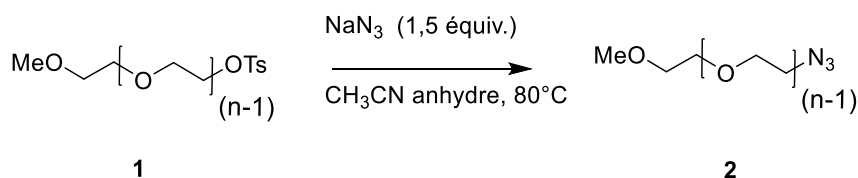


Schéma 32: Substitution du groupement tosylate par un azoture.

Les résultats suivants ont été obtenus en modifiant les longueurs de la chaîne pegylée (Tableau 44).

	Temps (heures)	Rendements <b>2</b>
MeO-PEG <sub>23</sub> -OTs (1,7g)	42	86%
MeO-PEG <sub>17</sub> -OTs (2g)	45	96%
MeO-PEG <sub>12</sub> -OTs (1,2g)	48	<100% *
MeO-PEG <sub>8</sub> -OTs (1,2g)	56	96%

\* Traces d'APTS observées par RMN.

Tableau 44 : Temps de réaction et rendements de la substitution.



Les conditions de la littérature ont été reproduites sur les différents MeO-PEG<sub>n</sub>-OTs de longueurs de chaînes variables (n = 8, 12, 17, 23).<sup>145</sup> Néanmoins, pour chacune des synthèses, des traces résiduelles d'acide paratoluènesulfonique (APTS) sont observées (entre 5 et 10%) par RMN après le traitement. Des lavages supplémentaires à l'eau de la phase organique ont alors été réalisés mais cela a entraîné des pertes de produit compte tenu de l'hydrophilie du substrat.

#### 2.3.1.1.3 Réduction de la fonction azide par la réaction de Staudinger

Dans la troisième étape, l'azide est réduit en amine *via* une réaction de Staudinger. Le MeO-PEG<sub>n</sub>-N<sub>3</sub> (n = 8, 12, 17, 23) est dilué dans une solution de HCl à 1M sous argon puis refroidi à 0 °C et agité jusqu'à dissolution totale. La triphénylphosphine (PPh<sub>3</sub>) diluée dans l'acétate d'éthyle, est ajoutée au goutte au goutte dans la solution précédente. Le milieu réactionnel est remis à température ambiante puis agité fortement (Schéma 33).

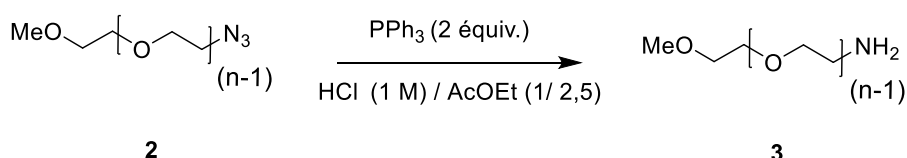


Schéma 33: Réduction de la fonction azide par la réaction de Staudinger.

Les résultats suivants ont été obtenus sur des MeO-PEG<sub>n</sub>-N<sub>3</sub> de n = 8, 12, 17, 23 (Tableau 45).

	Temps (jours)	Rendements <b>3</b>
MeO-PEG <sub>23</sub> -N <sub>3</sub> (1,7g)	10	82%
MeO-PEG <sub>17</sub> -N <sub>3</sub> (1,3g)	9	94%
MeO-PEG <sub>12</sub> -N <sub>3</sub> (1,1g)	6	90%
MeO-PEG <sub>8</sub> -N <sub>3</sub> (1,5g)	10	81%

Tableau 45 : Temps de réaction et rendements de la réaction Staudinger.

Comparativement aux résultats de la littérature, les rendements de cette réaction sont similaires mais des temps de réaction plus longs sont nécessaires.<sup>149</sup>

#### 2.3.1.1.4 Couplage de l'acide (R)-lipoïque avec l'amine du MeO-PEG<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>

La dernière étape consiste à réaliser un couplage entre l'amine du MeO-PEG<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> et l'acide (R)-lipoïque. Pour ce faire, l'amine MeO-PEG<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, la DMAP et le DCC sont solubilisés dans du DCM (dichlorométhane) anhydre. Le milieu réactionnel est placé sous argon puis



refroidi à 0 °C à l'aide d'un bain de glace. L'acide (*R*)-lipoïque est dissous dans le DCM en parallèle puis ajouté à la solution précédente. Le milieu réactionnel est agité pendant une heure à 0 °C puis quarante-huit heures à température ambiante (Schéma 34).

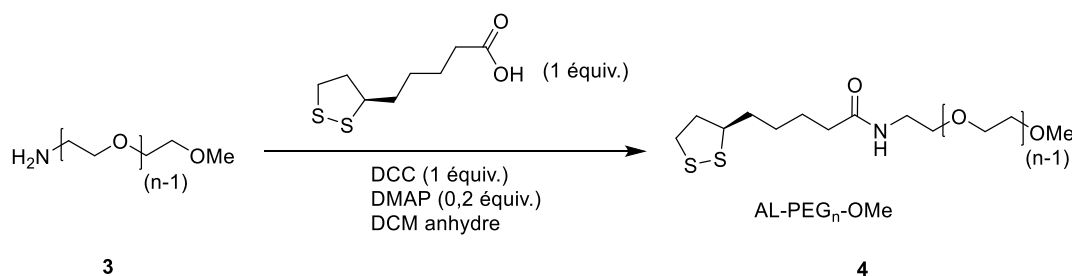


Schéma 34: Couplage entre l'amino-polyéthylène glycol et l'acide (*R*)-lipoïque.

Après une purification par chromatographie sur silice, les résultats suivants ont été obtenus (Tableau 46).

	Temps (heures)	Rendements <b>4</b>
MeO-PEG <sub>46</sub> -NH <sub>2</sub> *	48	65 %
MeO-PEG <sub>23</sub> -NH <sub>2</sub> (1g)	48	45 %
MeO-PEG <sub>17</sub> -NH <sub>2</sub> (1g)	48	60 %
MeO-PEG <sub>12</sub> -NH <sub>2</sub> (1g)	48	46 %
MeO-PEG <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub> (1g)	48	39 %

\* MeO-PEG<sub>46</sub>-NH<sub>2</sub> commercial

Tableau 46 : Temps de réaction et rendements du couplage entre l'amino-polyéthylène glycol et l'acide (*R*)-lipoïque.

Les rendements obtenus en AL-PEG<sub>n</sub>-OMe sont similaires quelle que soit la longueur de chaîne du PEG. Ces rendements faibles peuvent s'expliquer par une conversion incomplète. En effet, après purification 24 % de MeO-PEG<sub>17</sub>-NH<sub>2</sub> sont récupérées ce qui donne un rendement corrigé de la réaction de 78% pour ce dérivé.

### 2.3.1.2 Sélection du dérivé AL-PEG<sub>n</sub>-OMe

Les AL-PEG<sub>n</sub>-OMe de longueurs de chaînes variables ont été utilisés dans la réaction d'échange de ligand sur les nanoparticules de citrate. Cet échange de ligand a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment à température ambiante pendant vingt-quatre heures (Schéma 35).



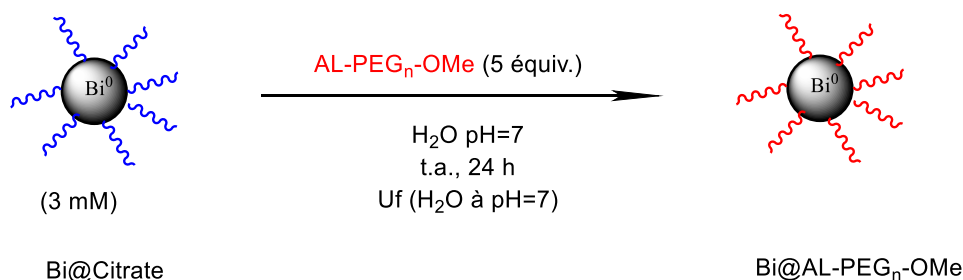


Schéma 35: Conditions expérimentales d'échange de ligand.

Les stabilités de ces nouvelles nanoparticules à pH=7 et en solution dans le NaCl à 9 g/L (150 mM) ont été comparées selon la longueur de chaîne des PEG. (Tableau 47).

Agents de revêtement	Eau à pH=7			Solution NaCl à 9 g/L (150 mM)	
	Diamètres (nm) en nombre (proportions %)	Stabilité visuelle	Potentiels zêta (mV)	Diamètres (nm) en nombre (proportions %)	Stabilité visuelle
AL-PEG <sub>2000</sub> -OMe	71±53 (100%)	24 heures	-18	81±43 (100%)	30 heures
AL-PEG <sub>1000</sub> -OMe	72±40 (100%)	30 heures	-15	58±30 (100%)	48 heures
AL-PEG <sub>750</sub> -OMe	70±24 (100%)	30 heures	-18	51±23 (100%)	48 heures
AL-PEG <sub>550</sub> -OMe	56±24 (100%)	24 heures	-18	105±23 (100%)	1 heure
AL-PEG <sub>350</sub> -OMe	39±20 (100%)	24 heures	-20	1167±242 (100%)	5 minutes

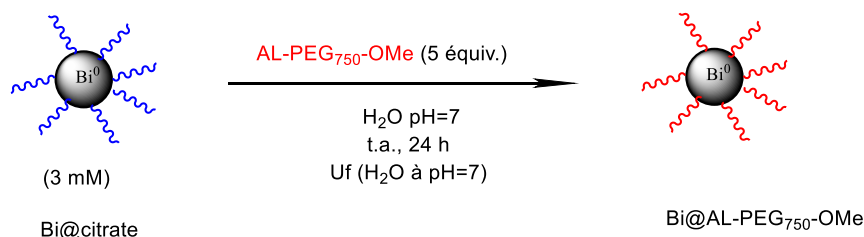
Tableau 47 : Diamètres et stabilités des nanoparticules (3 mM en Bismuth) revêtues de différents AL-PEG<sub>n</sub>-OMe.

Les potentiels zêta ne sont pas inférieurs à -30 mV. Cependant, les agents de revêtement contenant les PEG<sub>1000</sub> et PEG<sub>750</sub> stabilisent plus longtemps les nanoparticules dans une solution aqueuse à pH=7 et dans une solution de NaCl à 9 g/L (150 mM). L'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe a été sélectionné car sa synthèse est plus facile à mettre en œuvre comparativement à l'AL-PEG<sub>1000</sub>-OMe. Les composés de longueurs de chaînes PEG<sub>1000</sub> pourront être utilisés par la suite pour vectoriser les nanoparticules par des biovecteurs.<sup>163</sup>

### 2.3.1.3 Reproductibilité de l'échange de ligand avec l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe

La reproductibilité de l'échange de ligand avec l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe a été testée (Schéma 36).





*Schéma 36: Conditions réactionnelles de l'échange de ligand entre l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe (en rouge) à partir d'une nanoparticule à revêtement citrate (en bleu).*

Les résultats de l'étude de reproductibilité sont reportés dans le tableau 48.

Lots	Diamètres (nm) en nombre à pH=7 (Proportions %)	Diamètres (nm) en intensité à pH=7 (Proportions %)	Potentiels zêta (mV) à pH=7
1	70±24 (100%)	206±139 (100%)	-18
2	88±40 (100%)	227±158 (100%)	-16
3	64±25 (100%)	211±145 (100%)	-17

*Tableau 48: Diamètres et potentiels zêta de l'étude de reproductibilité de l'échange de ligand.*

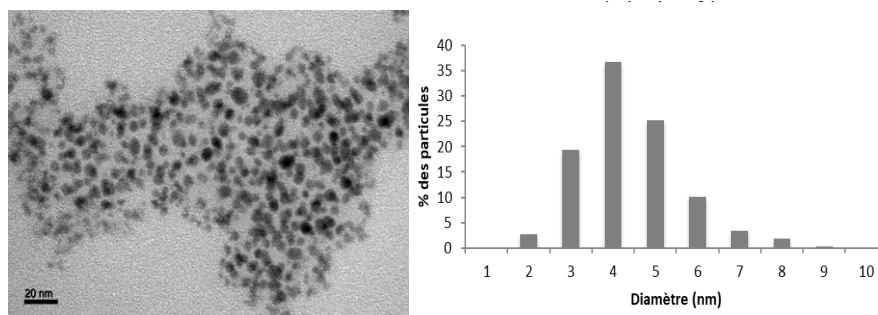
D'après les résultats obtenus, l'échange de ligand est bien reproductible. Les nanoparticules sont monodisperses à pH=7 en nombre et en intensité. Ce protocole permettant d'introduire de nouveaux agents de revêtement AL-PEG<sub>750</sub>-OMe est robuste.

## 2.3.1.4 Caractérisations des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe

Afin de bien caractériser les nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe et confirmer les résultats précédents, plusieurs techniques ont été utilisées.

### 2.3.1.4.1 Microscopie électronique en transmission

Les nanoparticules obtenues après un échange avec l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe ont été caractérisées par TEM (Figure 84).



*Figure 84: A) Image TEM des nanoparticules de bismuth revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe B) Histogramme des diamètres des nanoparticules de bismuth obtenues après l'échange.*



Les nanoparticules obtenues après l'échange avec l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe mesurent  $3,9 \pm 0,5$  nm en TEM, par contre, la mesure DLS nous indique un diamètre en nombre de l'ordre de  $70 \pm 24$  nm. Cette différence montre que les nanoparticules forment des agrégats stables en solution.

#### 2.3.1.4.2 Spectroscopie infrarouge

Les nanoparticules obtenues après un échange avec l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge comme le montre la figure 85.

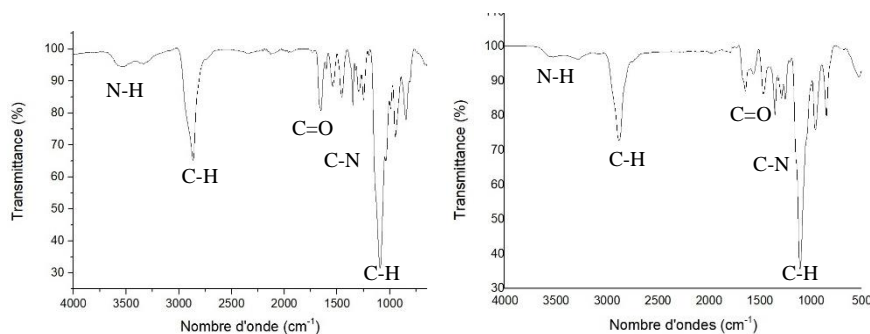


Figure 85: Spectre infrarouge d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe (à gauche), des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe (à droite).

En comparant, les analyses infrarouges des nanoparticules et de l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe, une bande de vibration caractéristique apparaît à  $3353 \text{ cm}^{-1}$  relatives aux groupements N-H de l'amide. Deux bandes à  $1634 \text{ cm}^{-1}$  et à  $1334 \text{ cm}^{-1}$  correspondent à la liaison C=O et C-N de l'amide respectivement. Une bande intense à  $1102 \text{ cm}^{-1}$  correspond à la liaison C-H présente dans le PEG. Ces bandes caractéristiques permettent de prouver la présence de l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe à la surface des nanoparticules de bismuth.



### 2.3.1.4.3 Analyse thermogravimétrique

Les nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe ont été caractérisées par TGA (Figure 86).

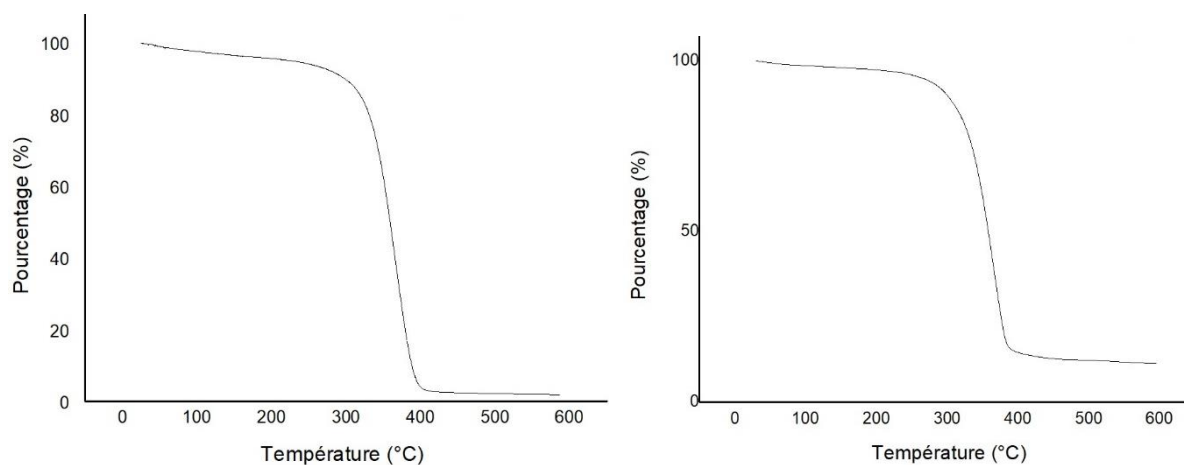


Figure 86 : TGA de l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe (à gauche) et des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe (à droite).

La TGA des nanoparticules montre une perte en masse de 88% qui est centrée sur 350°C et correspond à l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe (Figure 86).

### 2.3.1.4.4 Quantification du nombre d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe sur la nanoparticule

Le nombre de AL-PEG<sub>750</sub>-OMe par nanoparticule a aussi été estimé grâce à la TGA avec la méthodologie décrite au chapitre 1. Le nombre de AL-PEG-OMe présent sur une nanoparticule a été évalué à 842 ce qui correspond à 18 molécules d'AL-PEG-OMe par nm<sup>2</sup>. Une estimation a été effectuée par modélisation en évaluant la surface de l'acide (R)-lipoïque adsorbé sur la nanoparticule (Figure 87). Par modélisation, le nombre de ligand varie entre 4 et 12 molécules par nm<sup>2</sup>. L'étude DOSY réalisée sur ces nanoparticules nous montre que 25% de l'agent de revêtement est en interaction avec la nanoparticule (voir infra). Par conséquent, cinq molécules de AL-PEG<sub>750</sub>-OMe sont probablement présentes par nm<sup>2</sup> à la surface de nanoparticules.



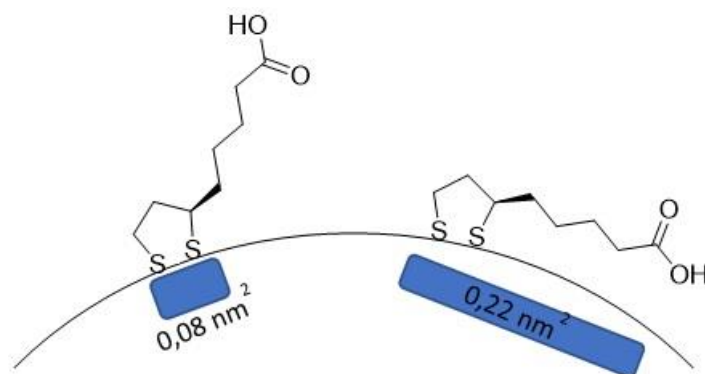


Figure 87: Surface de l'acide (R)-lipoïque adsorbée sur la surface de la nanoparticule.

#### 2.3.1.4.5 Spectroscopie UV-Visible.

Les nanoparticules revêtues par AL-PEG<sub>750</sub>-OMe ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible (Figure 88).

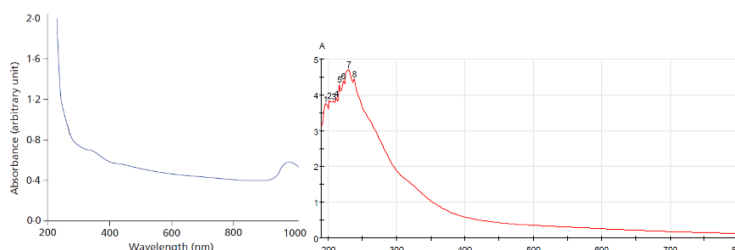


Figure 88: Spectre UV-Visible des nanoparticules synthétisées par Badireddy *et al.* (à gauche), Spectre UV-Visible des nanoparticules obtenues après un échange avec AL-PEG<sub>750</sub>-OMe (à droite).

Les nanoparticules absorbent dans tout le domaine spectral de 200 à 800 nm. Le spectre de nos nanoparticules de bismuth métallique est identique à celui décrit dans la littérature par Badireddy *et al.*<sup>86</sup> La bande à 330 nm correspond spécifiquement aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de molécules contenant des groupements thiols.

#### 2.3.1.5 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Un spectre RMN du proton a été effectué dans D<sub>2</sub>O sur nos nanoparticules revêtues de AL-PEG<sub>750</sub>-OMe (en bleu, Figure 89) et comparé avec la molécule de AL-PEG<sub>750</sub>-OMe seule (en rouge, Figure 89). La superposition des deux spectres a montré que l'agent de revêtement était bien présent sur les nanoparticules (Figure 89).



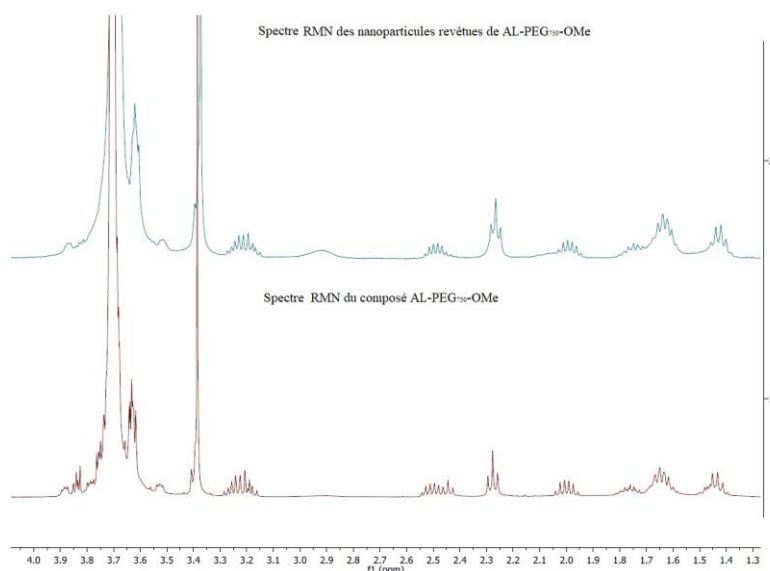


Figure 89: Comparaison des spectres RMN de AL-PEG<sub>750</sub>-OMe et des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe.

Cependant, un signal supplémentaire à 2,92 ppm a été observé sur le spectre correspondant aux nanoparticules. Ce signal ne correspond pas à la forme réduite de l'acide (*R*)-lipoïque d'après les données de la littérature (Figure 90).<sup>164</sup>

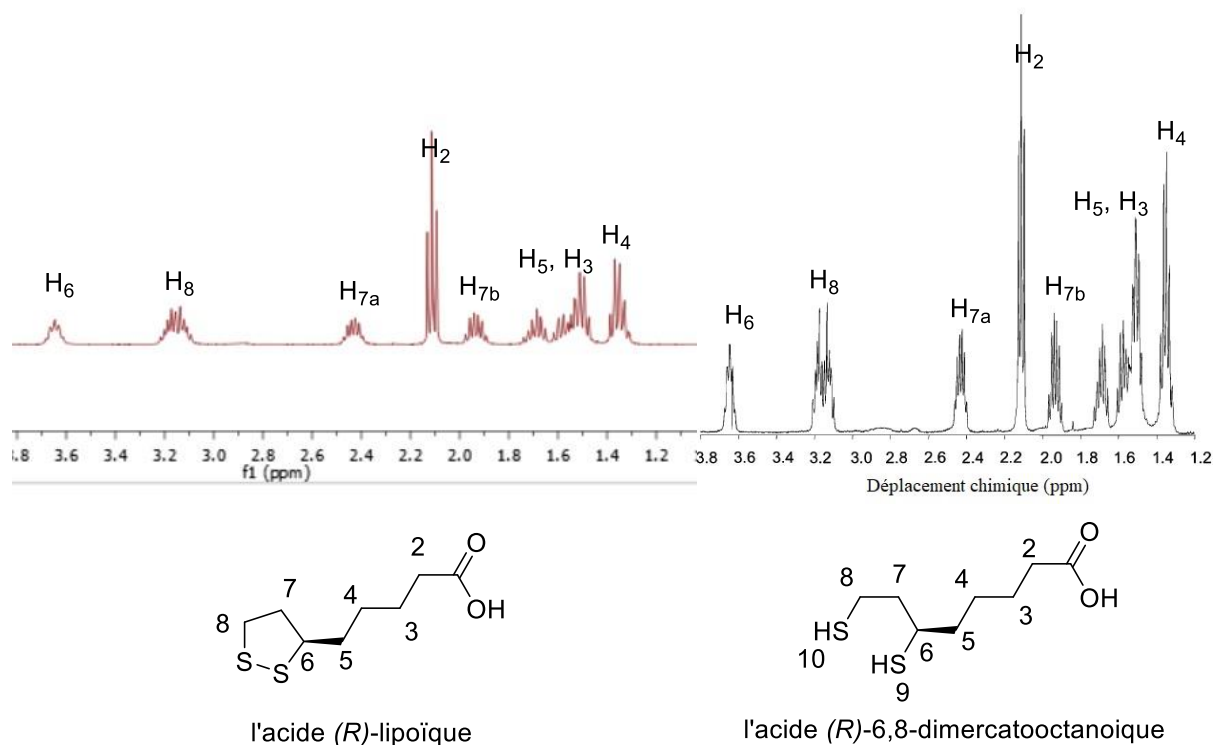


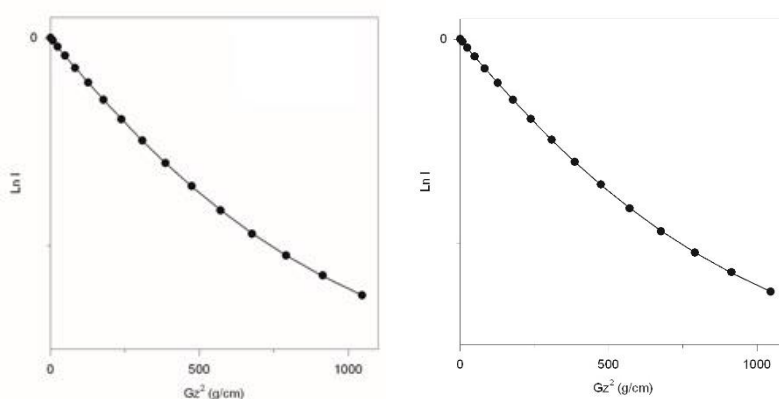
Figure 90: Comparaison des spectre RMN des formes réduites et oxydées de l'acide (*R*)-lipoïque dans D<sub>2</sub>O.



Une étude de DOSY a été effectuée pour mesurer la force d'interaction de l'agent de revêtement avec la surface des nanoparticules.

### 2.3.1.5.1 Détermination du coefficient de diffusion par DOSY :

Le coefficient de diffusion translationnelle des molécules a été déterminé par DOSY. Pour rappel, le résultat obtenu est sous forme d'un graphe représentant le logarithme népérien de l'intensité du signal du proton sélectionné en fonction du gradient de champ magnétique. La pente de la droite est proportionnelle au coefficient de diffusion du proton sélectionné. La figure 91 montre l'évolution du logarithme népérien des signaux du groupement méthoxy du PEG à 3,35 ppm et du CH<sub>2</sub> de la chaîne alkyle à 1,45 ppm de l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe en fonction du gradient de champ magnétique.



*Figure 91 : Evolution du logarithme népérien du signal à 3,35 ppm et 1,45 ppm de l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe en fonction du gradient de champ magnétique.*

Ces signaux montrent une évolution non linéaire de la décroissance du logarithme népérien du signal en fonction du gradient de champ magnétique (Figure 91). La perte de la linéarité indique la contribution de deux coefficients de diffusion. Deux coefficients de diffusion sont mesurés

- $5,45 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  avec une pondération de 25% correspondant à une diffusion caractéristique d'une petite molécule greffée (ou en échange lent) en surface des nanoparticules.
- $2,39 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  avec une pondération de 75% correspondant à une diffusion caractéristique d'une petite molécule non greffée.

Ce résultat signifie que 25% de l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe en solution est adsorbée à la surface de la nanoparticule de bismuth métallique *via* une interaction forte. On peut faire l'hypothèse que les molécules non greffées correspondent à la forme fermée (oxydée) du cycle 1, 2 dithiolane



tandis que les molécules greffées correspondent à une forme ouverte (réduite) du cycle via un mécanisme d'oxydo-réduction surfacique (Figure 92).

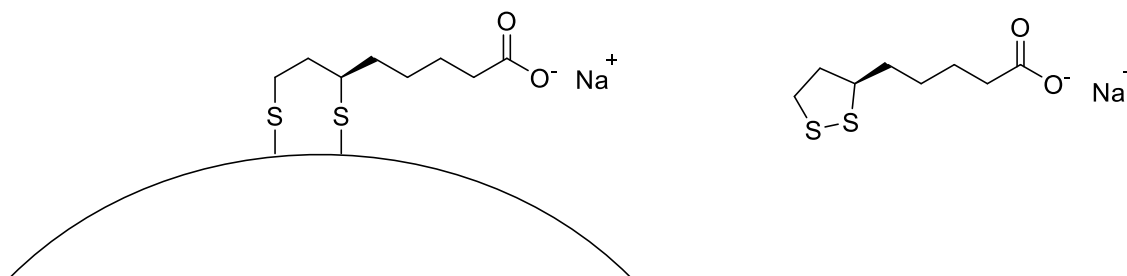


Figure 92 : Schéma hypothétique du greffage du lipoate de sodium à la surface des nanoparticules de bismuth.

Ces résultats montrent qu'il serait intéressant d'étudier la réduction de la quantité d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe utilisée pour réaliser l'échange de ligand.

La figure 93 montre l'évolution du logarithme népérien du signal à 2.92 ppm correspondant sans doute à une impureté non identifiée (mais ne correspondant pas à l'isopropanol) en fonction du gradient de champ magnétique.

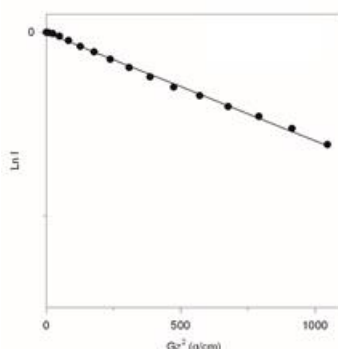


Figure 93 : Evolution du logarithme népérien du signal à 2,92 ppm en fonction du gradient de champ magnétique.

La pente de la régression linéaire donne le coefficient de diffusion moyen qui est de  $6,86 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  ce qui indique que cette impureté est totalement absorbée à la surface de la nanoparticule (Figure 93).

En conclusion, l'étude DOSY montre que 25% de AL-PEG<sub>750</sub>-OMe a une forte interaction avec la surface de la nanoparticule ainsi qu'une impureté qu'il serait pertinent d'identifier (par spectrométrie de masse des ions secondaires par exemple) notamment pour identifier des fonctions chimiques qui se lient fortement à la surface de nos particules.



### 2.3.1.6 Rendement de formation et concentration en nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe

#### 2.3.1.6.1 Rendement d'échange des nanoparticules en bismuth

Le rendement d'échange des nanoparticules a été évalué selon le protocole décrit dans le chapitre 1 par la dissolution oxydative des nanoparticules puis le dosage des ions Bi(III) par la dithizone à l'aide de la spectroscopie UV-Visible. La concentration de bismuth présente dans l'échantillon est calculée à partir de la mesure d'absorbance retranscrite sur la courbe d'étalonnage (voir chapitre 1). La quantité de Bi(III) dosée a été rapportée à la quantité initiale de Bi(III) présente dans les nanoparticules avant l'échange de ligand pour quantifier le rendement d'échange des nanoparticules de bismuth. Le rendement d'échange des nanoparticules de bismuth est de 90% pour les nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe. Ce rendement est satisfaisant et démontre qu'aucun phénomène de dissolution n'est présent lors de l'échange dans les conditions optimums.

#### 2.3.1.6.2 Calcul de la concentration en nanoparticules

Le nombre de nanoparticules de bismuth a été estimé grâce au dosage du Bi(III) par spectroscopie UV-Visible en utilisant les calculs présentés en chapitre 1. Le calcul nous donne un nombre de nanoparticules de bismuth de  $3,12 \cdot 10^{15}$  issues de 3 mM de bismuth. Ce calcul permet de quantifier une concentration en nanoparticules de bismuth revêtues de AL-PEG<sub>750</sub>-OMe de la solution finale après ultrafiltration de 6,5  $\mu$ M.

### 2.3.1.7 Comparaison des caractéristiques des nanoparticules avec un revêtement citrate et avec un revêtement AL-PEG<sub>750</sub>-OMe

Les caractérisations des nanoparticules avec un revêtement citrate sont comparés ici aux nanoparticules avec un revêtement AL-PEG<sub>750</sub>-OMe.

#### 2.3.1.7.1 Potentiel zêta

Les valeurs des potentiels zêta à pH=7 sont indiquées dans le tableau 49.

Agents de revêtement	Potentiels zêta (mV) à pH=7
Citrate	-47
AL-PEG <sub>750</sub> -OMe	-18

Tableau 49 : Comparaison des potentiels zêta avant et après échange du ligand AL-PEG<sub>750</sub>-OMe.



Le potentiel zêta passe de -47 mV pour un revêtement citrate à -18 mV pour le revêtement AL-PEG<sub>750</sub>-OMe. Cette modification s'explique par une diminution des charges négatives apportées par l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe qui ne possède plus de charge à pH=7 à la différence du citrate qui en a trois apportées par les groupements carboxylates.

#### 2.3.1.7.2 Spectroscopie infrarouge

Une comparaison des spectres infrarouges avant et après l'échange est illustrée sur la figure 94.

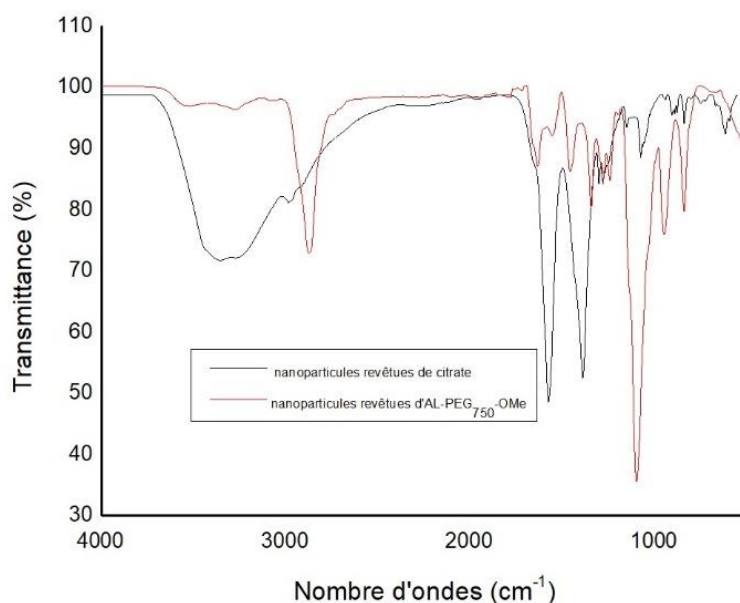


Figure 94 : Comparaison des spectres infrarouges avant et après l'échange.

La superposition des spectres infrarouges des nanoparticules revêtues de citrate et de AL-PEG<sub>750</sub>-OMe montre que l'échange est complet car la bande de la fonction hydroxyde à 3309 cm<sup>-1</sup> et les bandes à 1558 cm<sup>-1</sup> (C=O) et à 1362 cm<sup>-1</sup> (C-O) correspondant aux acides carboxyliques ont disparu. Des nouvelles bandes intenses à 2870 cm<sup>-1</sup> (C<sub>sp3</sub>-H) et à 1100 cm<sup>-1</sup> (C-H) ainsi qu'une bande de faible intensité à 1634 cm<sup>-1</sup> (C=O) correspondent à la molécule AL-PEG<sub>750</sub>-OMe à la surface de la nanoparticule.

#### 2.3.1.7.3 Analyse thermogravimétrique

Une comparaison des graphes de thermogravimétrie avant et après l'échange est illustrée sur la figure 95.



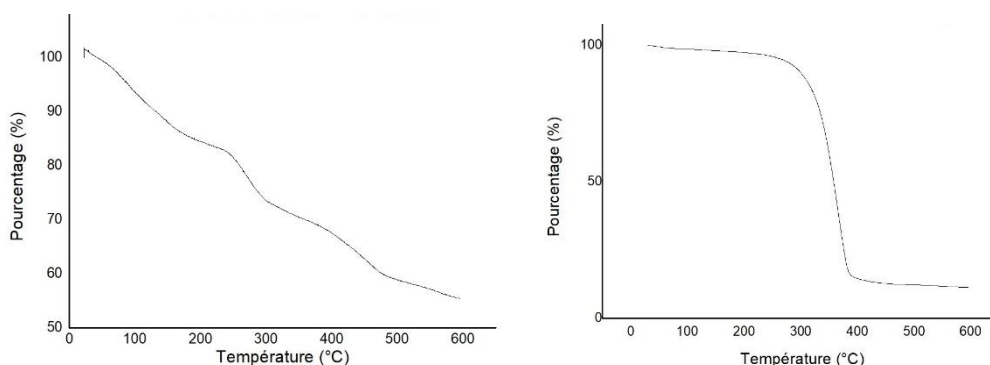


Figure 95: TGA des nanoparticules revêtues de citrate (à gauche) vs les nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe (à droite).

La perte de masse centrée sur 250 °C correspondant aux molécules de citrate adsorbées sur les nanoparticules n'est plus observée après l'échange. Par conséquent, l'échange de ligand a bien eu lieu entre le citrate et l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe.

### 2.3.1.7.4 Spectroscopie UV-Visible

Pour rappel, la spectroscopie UV-Visible permet de suivre l'échange de ligand *via* l'observation du déplacement de la bande plasmonique (Figure 96).

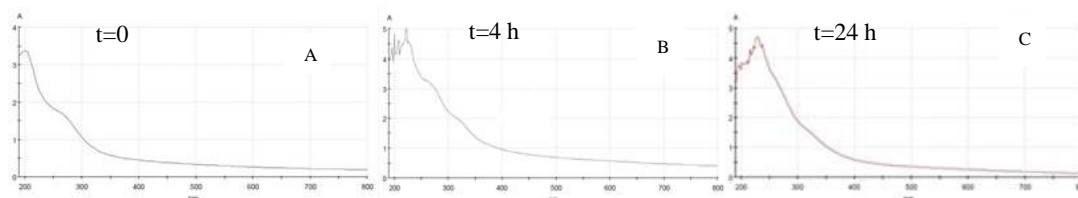


Figure 96 : Suivis de l'échange de ligand par spectroscopie UV-Visible entre le citrate et le AL-PEG<sub>750</sub>-OMe de sodium à différent temps.

Au départ de la réaction, la bande à 268 nm correspond spécifiquement aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate (Figure 96A).<sup>19</sup> Après quatre heures de réaction, deux bandes plasmoniques sont observées, l'une est caractéristique du revêtement citrate (268 nm) à la surface et l'autre est caractéristique d'un revêtement par une molécule contenant des thiols (330 nm) à la surface des nanoparticules (Figure 96B). Après vingt-quatre heures de réaction, une seule bande plasmonique à 330 nm est observée correspondant aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de (*R*)-lipoate de sodium (Figure 96C), démontrant encore une fois que l'échange est total.<sup>86</sup>



### 2.3.1.8 Conclusion sur les nanoparticules avec revêtement AL-PEG<sub>750</sub>-OMe

L'ensemble des caractérisations menées nous permettent d'affirmer que l'échange de ligand est total. A notre connaissance, cette quantification a été très jamais étudiée dans la littérature sur des nanoparticules de bismuth métallique.

### 2.3.1.9 Stabilité des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe en milieu salin

#### 2.3.1.9.1 Détermination du facteur W des nanoparticules dans une solution saline

Pour déterminer quantitativement la stabilité, le facteur W a été mesuré. En considérant que la stabilité des colloïdes est un processus cinétique, le facteur W est le rapport des vitesses d'agrégation rapide et lente, c'est donc un nombre sans dimension comme décrit ci-dessous.

$$W = \frac{\text{constante de vitesse d'agrégation rapide}}{\text{constante de vitesse d'agrégation à une concentration saline mesurée}}$$

Pour déterminer le facteur W, l'évolution linéaire du diamètre hydrodynamique mesuré en DLS en fonction du temps et à une concentration saline fixée est effectuée. La pente de la droite de la régression linéaire est proportionnelle à la vitesse d'agrégation comme montré sur la figure 97. Après détermination de la pente de la droite, il suffit de calculer le rapport entre la constante de vitesse d'agrégation rapide et la constante de vitesse à une concentration saline mesurée.

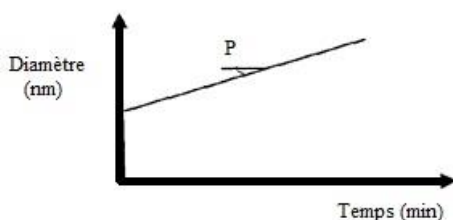


Figure 97: Schéma représentant le calcul de la pente proportionnelle à la vitesse d'agrégation à partir de l'étude du diamètre des nanoparticules en fonction du temps.

L'évolution du diamètre des nanoparticules a été étudiée sur 25 minutes en faisant varier la concentration en NaCl de 0 à 450 mM (2,7% de NaCl) (Figure 98).



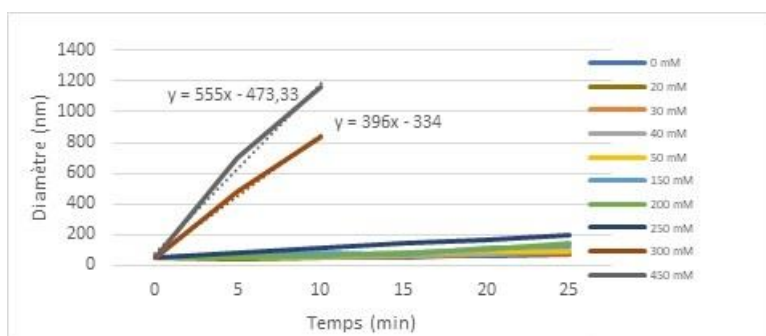


Figure 98: Evolution du diamètre des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe au cours du temps à différentes concentrations salines.

Pour les concentrations supérieures à 300 mM en NaCl, la courbe n'est plus linéaire au-delà de dix minutes car le phénomène d'agrégation est rapide et a lieu à partir de dix minutes. Pour des concentrations de 300 et 450 mM, la pente de la droite est donc calculée entre 0 et 10 minutes (Tableau 50).<sup>165</sup> On considère que la pente à 450 mM en NaCl est proportionnelle à la vitesse d'agrégation rapide.

Concentrations en NaCl en mM (% masse / volume)	Pentes (nm/min)	Facteurs W
0 mM (0 g/L)	5,4	102
20 mM (1,2 g/L)	5,6	99
30 mM (1,8 g/L)	6	92
40 mM (2,4 g/L)	8,4	66
50 mM (3 g/L)	9,6	58
150 mM (9 g/L)	12,6	41
200 mM (12 g/L)	18,8	29
250 mM (15 g/L)	28,8	19
300 mM (18 g/L)	396	1,4
450 mM (27 g/L)	555	1

Tableau 50 : Pentes et facteurs W en fonction de la concentration de NaCl (0 à 450 mM)

Le calcul du facteur W permet de mettre en évidence l'influence de la concentration saline sur la stabilité des nanoparticules (Figure 99).



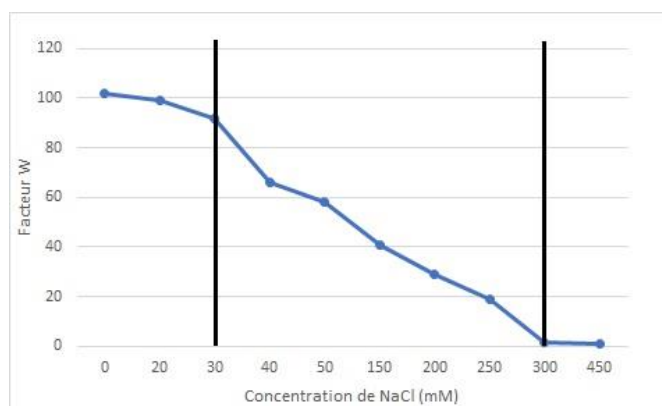


Figure 99: Evolution du facteur W selon la concentration en NaCl (0 à 450 mM).

Sur ce graphe, trois zones sont à distinguer.

La première zone de 0 mM à 30 mM en NaCl correspond à un facteur W très élevé ce qui représente à une bonne stabilité des nanoparticules. Une seconde zone de 40 mM et 250 mM en NaCl correspond à une diminution linéaire du facteur W. Par conséquent, la stabilité des nanoparticules diminue selon la concentration saline. A la concentration du sérum physiologique en NaCl de 150 mM soit 9 g/L, le facteur W est de 41. Une troisième zone de 300 et 450 mM en NaCl correspond à des nanoparticules instables puisque le facteur W est proche de 1.

### 2.3.1.9.2 Stabilité des nanoparticules dans une solution saline

La stabilité à 37 °C des nanoparticules dans une solution de 9 g/L de NaCl a aussi été étudiée par turbiscan sur vingt-quatre heures. Cette technique permet d'observer l'évolution de la turbidité d'une solution en fonction du temps (Figure 100).

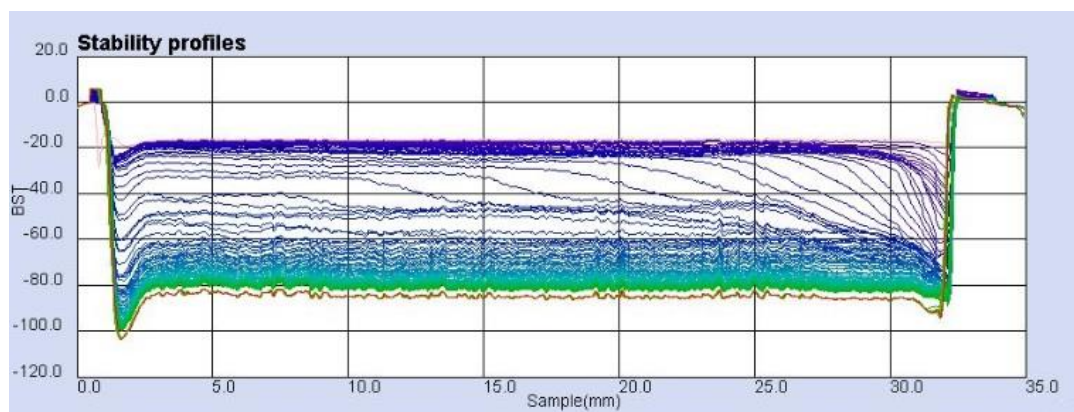


Figure 100: Stabilité des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OME étudiée par turbiscan dans une solution de 9 g/L de NaCl.



La courbe à  $t=0$  est en rose et la dernière mesure à  $t= 24$  heures est en rouge. La différence de turbidité entre les deux courbes est significative, par conséquent, la solution est considérée comme instable. Cette instabilité serait causé par un phénomène de floculation probablement réversible parce les nanoparticules sont encore dispersées en solution après la mesure (Figure 101).<sup>143</sup>



*Figure 101 : Solution de nanoparticules après la mesure de turbiscan.*

#### 2.3.1.9.3 Conclusion sur la stabilité des nanoparticules revêtues de AL-PEG<sub>750</sub>-OMe dans une solution saline

La stabilité des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe est correcte pour une utilisation dans un milieu biologique (de 2 à 24 heures) au vu d'un facteur W de 41, de l'évaluation visuelle et de l'évaluation au turbiscan.

#### 2.3.1.10 Stérilisation par filtration des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe

Cette méthode consiste à filtrer les nanoparticules à l'aide d'un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$ . Le tableau 51 compare les diamètres des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe avant et après la filtration.

	Diamètres en nombre (nm) (Proportions %)
Avant la filtration	$64 \pm 25$ (100%)
Après la filtration	$50 \pm 16$ (100%)

*Tableau 51: Diamètres des nanoparticules revêtues d'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe avant et après stérilisation à l'aide d'un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$ .*

La stérilisation à l'aide d'un filtre de 0,22 $\mu\text{m}$  n'influence pas le diamètre hydrodynamique des nanoparticules. Nous n'avons pas cependant pas vérifié la stérilité de la solution obtenues après cette filtration.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'introduction de chaînes lipophiles et fluorophiles à la surface des nanoparticules de bismuth.



### 2.3.2 Fonctionnalisation des nanoparticules avec une chaîne hydrophobe

Dans la littérature, des nanoparticules d'or avec un revêtement lipoate ont été couplées à des longues chaînes carbonées ce qui correspond à une des stratégies mentionnée dans le schéma 29 (Schéma 37).<sup>166</sup>

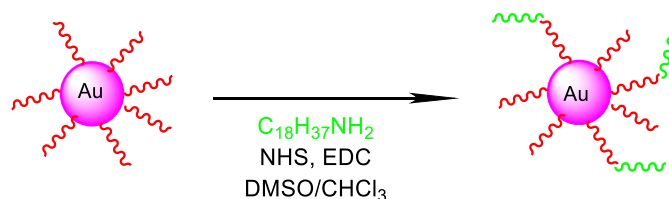


Schéma 37 : Modification de la surface des nanoparticules pour les rendre hydrophobes.

Cependant, comme précédemment, nous avons opté pour la stratégie d'échange de ligand (deuxième stratégie du schéma 29).

#### 2.3.2.1 Synthèse des dérivés acide (R)-lipoïque hydrophobe

Ce protocole est basé sur les conditions de couplage utilisées précédemment mais mettant ici en réaction une chaîne hydrophobe aminée  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$  et l'acide (R)-lipoïque.<sup>145</sup> Pour cela, l'amine  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ , la DMAP puis le DCC sont solubilisés dans du DCM anhydre. Le milieu réactionnel est placé sous argon puis refroidi à 0 °C à l'aide d'un bain de glace. L'acide (R)-lipoïque est dissous dans le DCM puis ajouté à la solution précédente. Le milieu réactionnel est agité pendant une heure à 0 °C puis vingt-quatre heures à température ambiante (Schéma 38).

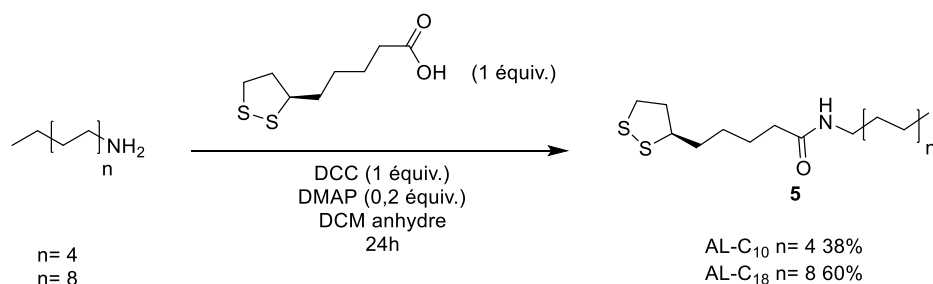


Schéma 38: Couplage de la chaîne hydrophobe aminée avec l'acide (R)-lipoïque.

Après purification par chromatographie sur silice, le couplage avec l'octadécylamine donne le produit AL-C<sub>18</sub> avec un meilleur rendement de 60% que le couplage avec l'aminodécane qui donne le produit AL-C<sub>10</sub> avec un rendement de 38%. En effet, le produit AL-C<sub>10</sub> est plus difficile à purifier que l'AL-C<sub>18</sub> (co-élution avec la dicyclohexylurée (DCU)).



### 2.3.2.2 Sélection du dérivé hydrophobe AL-C<sub>10</sub> ou AL-C<sub>18</sub>

Après avoir obtenu les dérivés hydrophobes AL-C<sub>10</sub> et AL-C<sub>18</sub>, plusieurs conditions réactionnelles ont été testées afin de réaliser l'échange de ligand. Cet échange est évalué *via* la capacité des nanoparticules revêtues d'agents hydrophobes à passer d'un milieu aqueux à un milieu organique. Au départ, les nanoparticules de citrate issues du flux sont en solution dans l'eau puis le revêtement hydrophobe (AL-C<sub>10</sub> ou AL-C<sub>18</sub>) est ajouté en solution dans un solvant organique (Schéma 39).

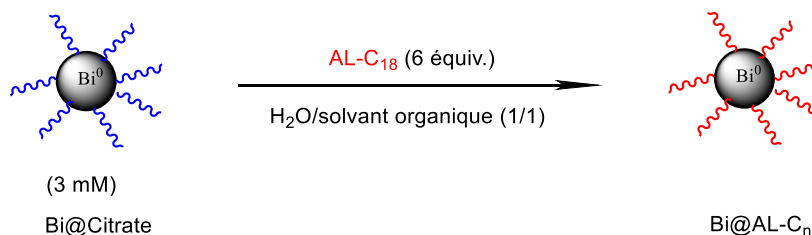


Schéma 39: Conditions expérimentales pour l'échange de ligand avec AL-C<sub>10</sub> ou AL-C<sub>18</sub>

Une étude des solvants organiques a été nécessaire pour réaliser l'échange. En effet, si l'on utilise des systèmes de solvant non miscibles, les nanoparticules ne passent pas en phase organique signe que l'échange est inefficace (Tableau 52, entrées 1, 2, 3). Pour faciliter l'échange et éviter sa limitation à une réaction interfaciale entre les deux solvants non miscibles, nous avons utilisé un système de solvants miscibles à savoir un mélange eau/éthanol/DCM (Tableau 52, entrée 4). Après vingt-quatre heures d'agitation, les solvants ont été évaporés à sec. Les nanoparticules lyophilisées ont été ensuite redispersées dans un mélange de solvants eau/DCM (1/1). Les nanoparticules ont été observées visuellement dans le DCM ce qui a démontré que l'échange de ligand avait eu lieu.

Entrées	Mélange de solvant (proportions)	Passage des nanoparticules en phase organique
1	Eau/DCM (1/1)	Non
2	Eau/Toluène (1/1)	Non
3	Eau/Cyclohexane (1/1)	Non
4	Eau/Ethanol/DCM (1,3/5/3,7)	Oui (évaporation et lyophilisation)

Tableau 52: Conditions de l'échange de ligand entre le citrate et AL-C<sub>10</sub> ou AL-C<sub>18</sub>.

Après l'échange du citrate avec l'AL-C<sub>10</sub> ou l'AL-C<sub>18</sub>, les nanoparticules ont été redispersées dans différents solvants organiques (Tableau 53).

Ligand	Solvant	Solubilité **
AL-C <sub>10</sub>	DCM	Partage dans les deux solvants
AL-C <sub>18</sub>	DCM	Oui



	Toluène	Oui
	Éthanol	Oui
	Cyclohexane	Non
	Octane	Non
	Miglyol® 812 N*	Oui

\*Le Miglyol® 812 N est une huile utilisée dans la formulation d'émulsions.

\*\*La solubilité est appréciée visuellement

Tableau 53: Solubilité des nanoparticules revêtues de AL-C<sub>10</sub> ou AL-C<sub>18</sub> dans différents solvants.

L'aminodécane n'est pas assez hydrophobe pour que les nanoparticules passent en phase organique comme le montre la figure 102. Par contre la chaîne octadécylamine permet un passage total en phase organique.



Figure 102: Photo des nanoparticules dans un mélange de solvant eau/DCM. De gauche à droite : la nanoparticule revêtue de citrate, la nanoparticule revêtue d'AL-C<sub>10</sub> et la nanoparticule revêtue d'AL-C<sub>18</sub>.

Ces résultats nous ont amenés à sélectionner la nanoparticule hydrophobe revêtue d'AL-C<sub>18</sub> pour la suite du travail.

### 2.3.2.3 Étude de reproductibilité de l'échange de citrate avec l'AL-C<sub>18</sub>

La reproductibilité de l'échange de ligand a été évaluée dans les conditions réactionnelles suivantes (Schéma 40).

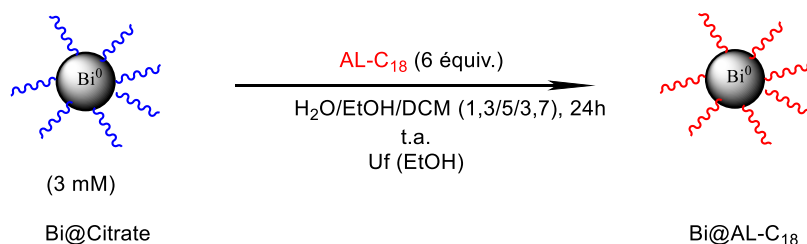


Schéma 40: Etude de reproductibilité de l'échange de citrate par l'AL-C<sub>18</sub>.



Les résultats de l'étude de reproductibilité sont reportés dans le tableau 54. La mesure des diamètres en DLS est effectuée en milieu éthanol ou Miglyol® 812 N.

Lots	Diamètres en nombre dans le Miglyol® 812 N (nm) (Proportions %)	Diamètres en nombre dans l'éthanol (nm) (Proportions %)
1	94± 21 (100%)	112±19 (100%)
2	124±28 (100%)	119±25 (100%)
3	125±23 (100%)	125±35 (100%)

Tableau 54: Diamètres des nanoparticules obtenues lors de l'étude de reproductibilité de l'échange de ligand.

Comme le montre le tableau 54, la synthèse est reproductible. Par conséquent, ce protocole utilisant des conditions d'échange de ligand à température ambiante avec six équivalents AL-C<sub>18</sub> est robuste.

## 2.3.2.4 Caractérisations des nanoparticules hydrophobes revêtues d'AL-C<sub>18</sub>

Afin de bien caractériser le revêtement hydrophobe des nanoparticules revêtues d'AL-C<sub>18</sub>, plusieurs techniques ont été utilisées.

### 2.3.2.4.1 Spectroscopie infrarouge

Les nanoparticules revêtues par AL-C<sub>18</sub> ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge comme le montre la figure 103 :

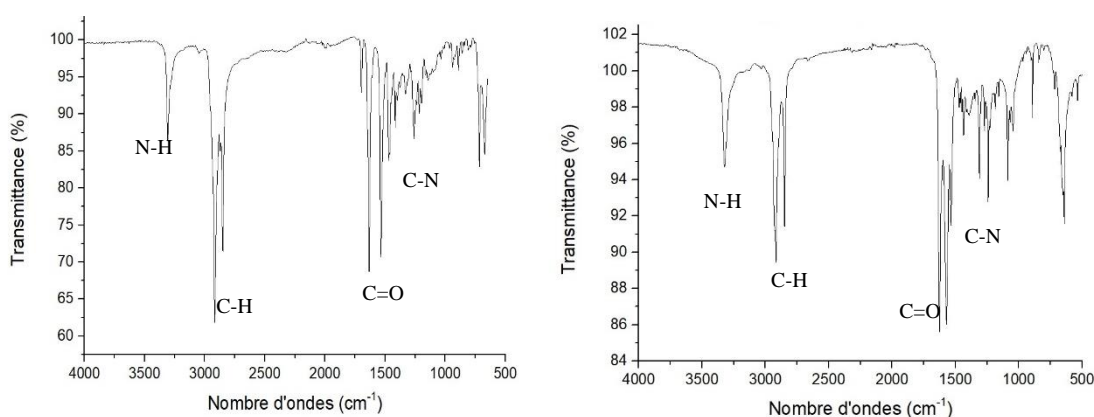


Figure 103: Spectre infrarouge de l'acide (R)-lipoïque couplé avec l'octadécylamine (AL-C<sub>18</sub>) (à gauche) et des nanoparticules revêtues de AL-C<sub>18</sub> (à droite).

En comparant, les analyses infrarouges des nanoparticules et de l'AL-C<sub>18</sub>, une bande de vibration caractéristique apparaît à 3325 cm<sup>-1</sup> relative aux groupements N-H de l'amide. Deux bandes apparaissent à 2918 cm<sup>-1</sup> et à 2851 cm<sup>-1</sup> correspondant aux liaisons C-H. Deux bandes apparaissent à 1628 cm<sup>-1</sup> et à 1572 cm<sup>-1</sup> (C=O) correspondant à la liaison carbonyle de



l'amide. Une bande apparaît à  $1309\text{ cm}^{-1}$  correspondant à la liaison C-N. Ces bandes caractéristiques permettent de prouver la présence de l'AL-C<sub>18</sub> à la surface des nanoparticules de bismuth.

### 2.3.2.4.2 Analyse thermogravimétrique

Les nanoparticules revêtues d'AL-C<sub>18</sub> ont été caractérisées par TGA.

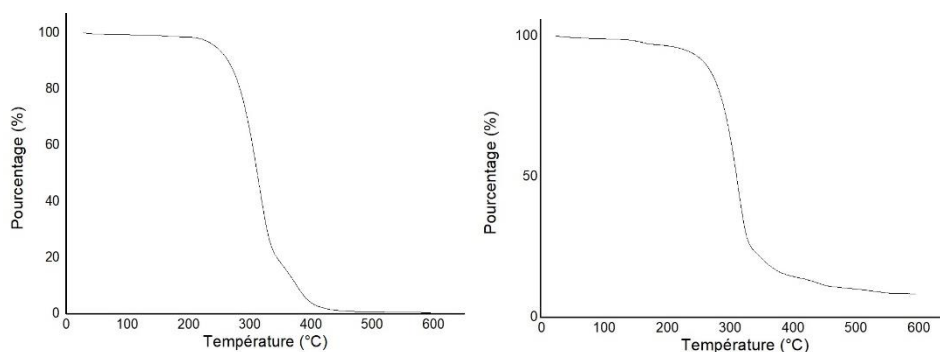


Figure 104 : TGA d'AL-C<sub>18</sub> (à droite) et des nanoparticules revêtues de AL-C<sub>18</sub> (à gauche).

La TGA des nanoparticules montre une perte en masse de 86 % centrée sur 310 °C et qui correspond à la perte d'AL-C<sub>18</sub> (Figure 104).

### 2.3.2.4.3 Quantification du nombre de AL-C<sub>18</sub> sur la nanoparticule

Le nombre de AL-C<sub>18</sub> par nanoparticule a aussi été estimé grâce à la TGA avec la méthodologie décrite au chapitre 1. Le nombre d'AL-C<sub>18</sub> présent sur une nanoparticule a été évalué à 1559 ce qui correspond à 34 molécules d'AL-C<sub>18</sub> par nm<sup>2</sup>. Une estimation par modélisation a été effectuée en évaluant la surface du ligand sur la nanoparticule (Figure 87). Le nombre de ligand varie entre 4 et 12 molécules par nm<sup>2</sup>. L'étude DOSY n'a pas été réalisée dans le chloroforme. Néanmoins, nous pouvons supposer que le pourcentage d'acide lipoïque lié à la surface (25%) de la nanoparticule est identique à celui de l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe. Par conséquent, 9 molécules de AL-C<sub>18</sub> seraient présentes par nm<sup>2</sup> à la surface des nanoparticules.

### 2.3.2.4.4 Spectroscopie UV-Visible

Les nanoparticules revêtues par AL-C<sub>18</sub> ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible (Figure 105).



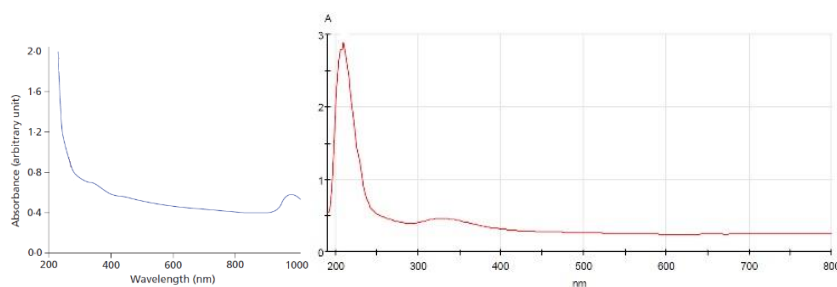


Figure 105: Spectre UV-Visible des nanoparticules synthétisées par Badireddy *et al.* (à gauche),<sup>86</sup> spectre UV-Visible des nanoparticules revêtues AL-C<sub>18</sub> (à droite).

Les nanoparticules absorbent dans tout le domaine spectral de 200 à 800 nm. Le spectre de nos nanoparticules de bismuth métallique est identique à celui décrit dans la littérature par Badireddy *et al.*<sup>86</sup> La bande à 330 nm correspond spécifiquement aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de molécules contenant des groupements thiols.

### 2.3.2.5 Comparaison des nanoparticules avec un revêtement AL-C<sub>18</sub>

Dans cette partie du chapitre, les résultats de caractérisation des nanoparticules à revêtement citrate sont comparés aux nanoparticules avec un revêtement AL-C<sub>18</sub>.

#### 2.3.2.5.1 Spectroscopie infrarouge

Une comparaison des spectres infrarouge avant et après l'échange est illustrée par la figure 106.

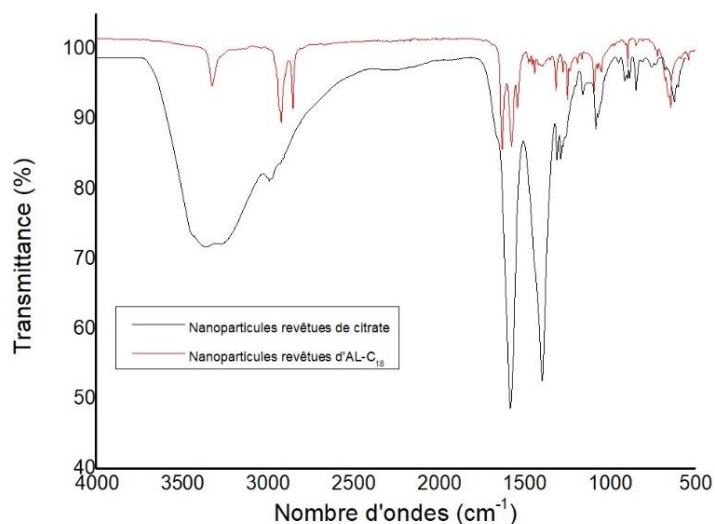


Figure 106 : Comparaison des spectres infrarouge avant et après l'échange.

La superposition des spectres infrarouges des nanoparticules revêtues de citrate et d'AL-C<sub>18</sub> montre que l'échange est complet car la bande hydroxyde à 3309 cm<sup>-1</sup> et les bandes à 1558



$\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ ) et à  $1362 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}$ ) de la fonction carboxyle ont disparu après l'échange. De nouvelles bandes à  $3325 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{N}-\text{H}$ ), à  $1628 \text{ cm}^{-1}$  et à  $1572 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  du carbonyle de l'amide) sont observées et montrent la présence de la molécule AL- $\text{C}_{18}$  à la surface de la nanoparticule.

#### 2.3.2.5.2 Analyse thermogravimétrique

Une comparaison des graphes de thermogravimétrie avant et après l'échange est illustrée par la figure 107.

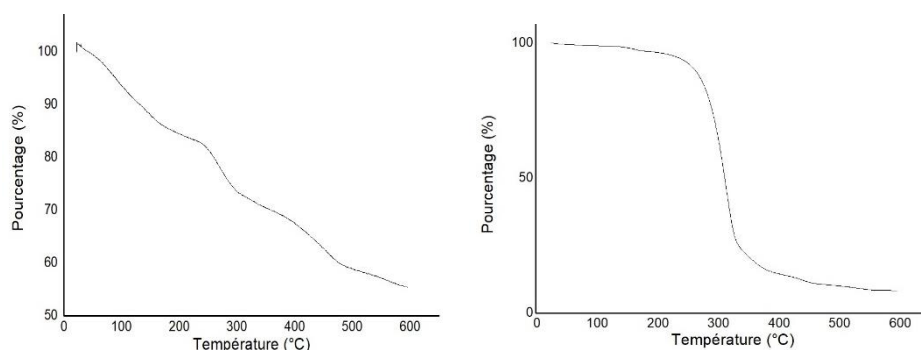


Figure 107: TGA avant (à gauche) et après l'échange (à droite).

La perte de masse centrée sur  $250^\circ\text{C}$  correspondant aux molécules de citrate adsorbées sur les nanoparticules n'est plus observée après l'échange. Par conséquent, l'échange de ligand a bien eu lieu entre le citrate et l'AL- $\text{C}_{18}$ .

#### 2.3.2.5.3 Spectroscopie UV-Visible

Pour rappel, la spectroscopie UV-Visible permet de suivre l'échange de ligand *via* l'observation du déplacement de la bande plasmonique (Figure 108).

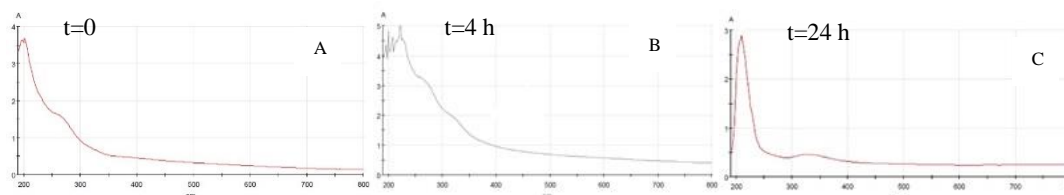


Figure 108 : Comparaison des spectre UV-Visible avant et après l'échange.

Au départ de la réaction, la bande à  $268 \text{ nm}$  correspond spécifiquement aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate (Figure 108A).<sup>19</sup> Après quatres heures de réaction, deux bandes plasmoniques sont observées, l'une est caractéristique du revêtement citrate ( $268 \text{ nm}$ ) à la surface et l'autre est caractéristique d'un revêtement par une molécule contenant des thiols ( $330 \text{ nm}$ ) à la surface des nanoparticules (Figure 108B). Après 24 heures de réaction,



une seule bande plasmonique à 330 nm est observée correspondant aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de (*R*)-lipoate de sodium (Figure 108C).<sup>86</sup>

Toutes les caractérisations démontrent que l'échange de ligand avec AL-C<sub>18</sub> est complet.

### 2.3.3 Fonctionnalisation des nanoparticules avec une chaîne polyfluorée

Dans la littérature, des nanoparticules d'or revêtues d'un composé polyfluorée ont été décrites comme agents de relargage de principes actifs (Schéma 41).<sup>167</sup> Cet agent de revêtement est constitué d'un bloc perfluoré (en bleu) et d'un bloc polyéthylène glycol (en vert).

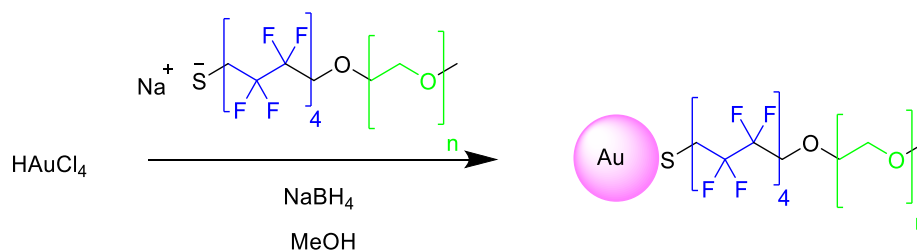


Schéma 41 : Revêtement des nanoparticules d'or avec une molécule polyfluorée.

Dans le but de rendre nos nanoparticules fluorophiles, plusieurs longueurs de chaînes polyfluorées ont été testées.

#### 2.3.3.1 Synthèse des dérivés d'acide (*R*)-lipoïque fonctionnalisés par des chaînes polyfluorées

Ce protocole est basé sur les conditions de couplage utilisées précédemment mais mettant ici en réaction une chaîne polyfluorée aminée  $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_n-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  et l'acide (*R*)-lipoïque.<sup>145</sup> Pour cela, l'amine  $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_n-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ , la DMAP puis le DCC sont solubilisés dans du DCM anhydre. Le milieu réactionnel est placé sous argon puis refroidi à 0 °C à l'aide d'un bain de glace. L'acide (*R*)-lipoïque est dissous dans le DCM puis ajouté à la solution précédente. Le milieu réactionnel est agité pendant une heure à 0 °C puis vingt-quatre heures à température ambiante (Schéma 42).

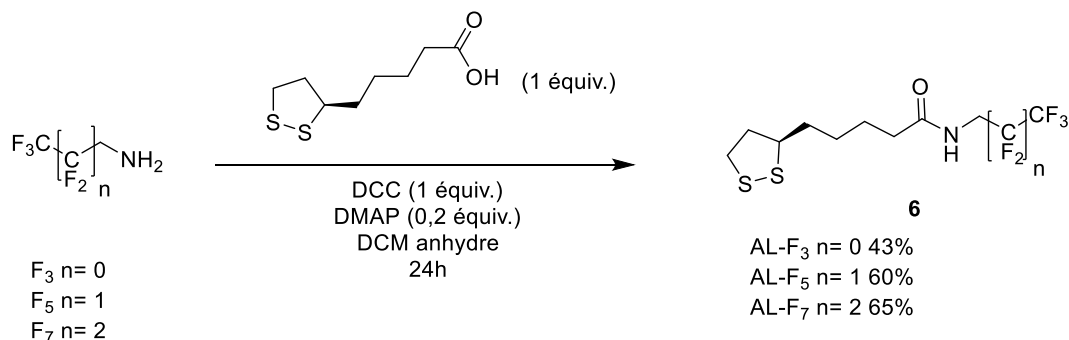


Schéma 42: Couplage entre différentes amines-polyfluorées et l'acide (*R*)-lipoïque.



Après vingt-quatre heures d'agitation, le mélange réactionnel est filtré sur célite puis purifié par chromatographie sur silice. Les résultats suivants ont été obtenus (Tableau 55).

	Temps (heures)	Rendements
Trifluoroéthylamine (F <sub>3</sub> )	24	43%
Pentafluoropropylamine (F <sub>5</sub> )	24	60%
Heptafluorobutylamine (F <sub>7</sub> )	24	65%

Tableau 55: Temps réactionnels et rendements de l'étape de couplage entre différentes amines polyfluorées et l'acide (R)-lipoïque.

Le couplage avec l'heptafluorobutylamine et la pentafluoropropylamine donne les produits AL-F<sub>7</sub> et AL-F<sub>5</sub> respectivement avec de meilleurs rendements (65% et 60%) que le couplage avec la trifluoroéthylamine qui donne le produit AL-F<sub>3</sub> avec un rendement de 43%. Ce composé est très hygroscopique, la présence de traces d'eau dans la réaction est possible.

### 2.3.3.2 Sélection du dérivé polyfluoré

Notre objectif est d'obtenir des nanoparticules solubles dans l'huile bromure de perfluorooctyl (PFOB) afin de l'incorporer dans des émulsions perfluorées. Une réaction d'échange de ligand a été réalisée puis testée pour observer la capacité de nos nouvelles nanoparticules à se solubiliser dans le PFOB.

La réaction d'échange de ligand à partir de nanoparticules citratées est réalisée dans les conditions suivantes (Schéma 43).

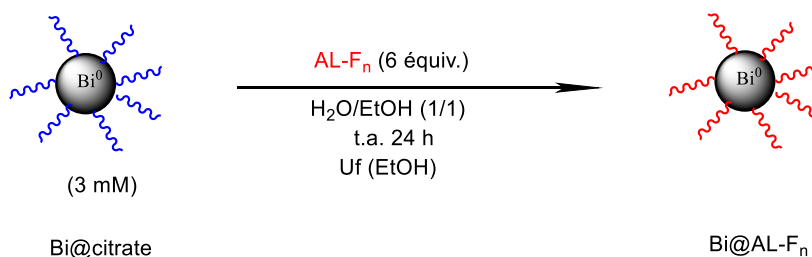


Schéma 43: Conditions d'échange de ligand en série polyfluorée

L'échange de ligand se déroule dans une solution contenant de l'eau et de l'éthanol dans une proportion 50/50. Au départ, les nanoparticules sont conservées dans l'eau et les composés fluorés sont solubilisés dans l'éthanol. Après vingt-quatre heures d'agitation, les solvants ont été évaporés à sec. Les nanoparticules lyophilisées ont été ensuite redispersées dans un mélange de solvants eau/PFOB (1/1). Le partage des nanoparticules entre le PFOB et l'eau (mélange 1/1) est apprécié visuellement (Tableau 56).



Agents de revêtement	Solubilité dans le PFOB
AL-F <sub>3</sub>	Non
AL-F <sub>5</sub>	Partage entre les deux solvants *
AL-F <sub>7</sub>	Oui

\* Le composé contenant cinq fluors est en partie soluble dans l'huile fluorée mais beaucoup de nanoparticules se retrouvent à l'interface eau/PFOB.

Tableau 56: Solubilité des nanoparticules revêtues de AL-F<sub>3</sub>, AL-F<sub>5</sub> ou AL-F<sub>7</sub> dans le PFOB.

Les nanoparticules polyfluorées totalement solubles dans le PFOB sont celles revêtues d'une chaîne contenant sept fluors. En conséquence, dans la suite de notre travail, nous n'utiliserons que les nanoparticules revêtues d'AL-F<sub>7</sub>.

### 2.3.3.3 Étude de reproductibilité de l'échange entre le ligand citrate et l'AL-F<sub>7</sub>

La reproductibilité des conditions d'échange a été testée (Schéma 44) et les résultats sont reportés dans le tableau 57.

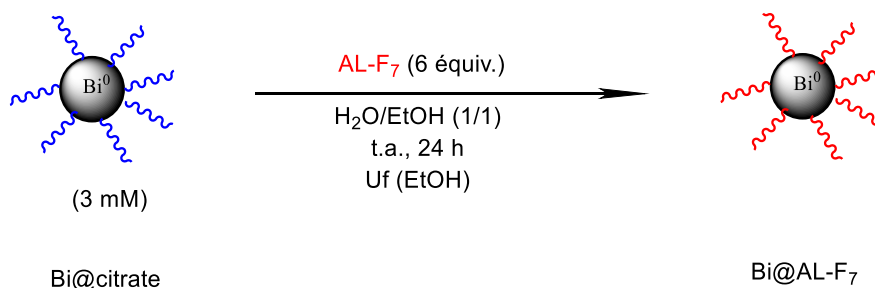


Schéma 44: Reproductibilité de l'échange entre le ligand citrate et l'AL-F<sub>7</sub>.

Lot	Diamètres (nm) en nombre dans l'éthanol (Proportions %)	Diamètres (nm) en intensité dans l'éthanol (Proportions %)
1	44±13 (100%)	126±61 (100%)
2	49±39 (100%)	130±45 (100%)
3	48±15 (100%)	160±68 (100%)

Tableau 57 : Diamètres des nanoparticules obtenues lors de l'étude de reproductibilité de l'échange de ligand.

Comme le montre le tableau 57, la synthèse est reproductible. Par conséquent, ce protocole utilisant des conditions d'échange de ligand à température ambiante avec six équivalents d'AL-F<sub>7</sub> est robuste.

### 2.3.3.4 Caractérisations des nanoparticules

Afin de bien caractériser le revêtement polyfluoré des nanoparticules, plusieurs techniques ont été utilisées.



#### 2.3.3.4.1 Spectroscopie infrarouge

Les nanoparticules revêtues par l'AL-F<sub>7</sub> ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge comme le montre la figure 109.

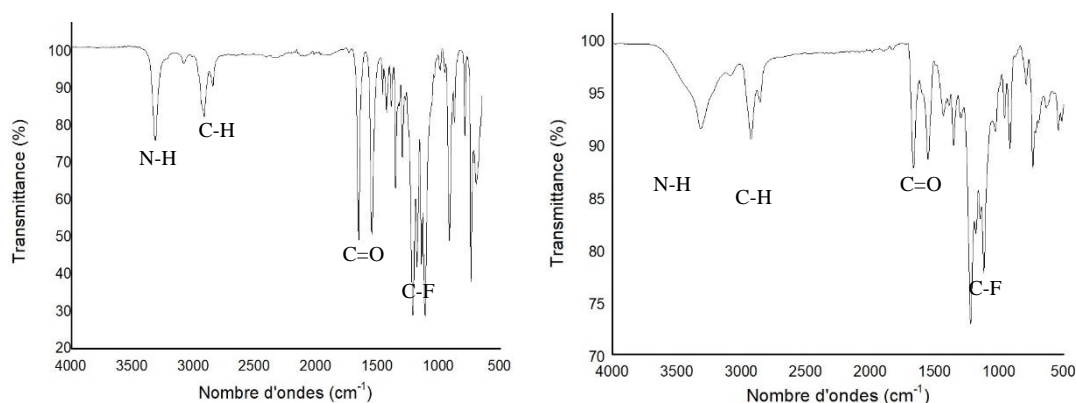


Figure 109 : Spectres infra rouge de l'AL-F<sub>7</sub> (à gauche) et des nanoparticules revêtues de l'AL-F<sub>7</sub> (à droite).

En comparant, les analyses infrarouges des nanoparticules et de l'AL-C<sub>7</sub>, une bande de vibration caractéristique apparaît à 3322 cm<sup>-1</sup> relatives aux groupements N-H de l'amide. Deux bandes à 2930 cm<sup>-1</sup> et à 2880 cm<sup>-1</sup> correspondent à la liaison C-H. Deux bandes à 1660 cm<sup>-1</sup> et à 1548 cm<sup>-1</sup> (C=O) correspondent à la liaison carbonyle de l'amide. Enfin deux bandes à 1222 cm<sup>-1</sup> et 1115 cm<sup>-1</sup> correspondent aux modes de vibration de la liaison C-F. Ces bandes caractéristiques permettent de prouver la présence de l'AL-F<sub>7</sub> à la surface des nanoparticules de bismuth.

#### 2.3.3.4.2 Analyse thermogravimétrique

Les nanoparticules revêtues par AL-F<sub>7</sub> ont été caractérisées par thermogravimétrie (TGA) comme le montre la figure 110.

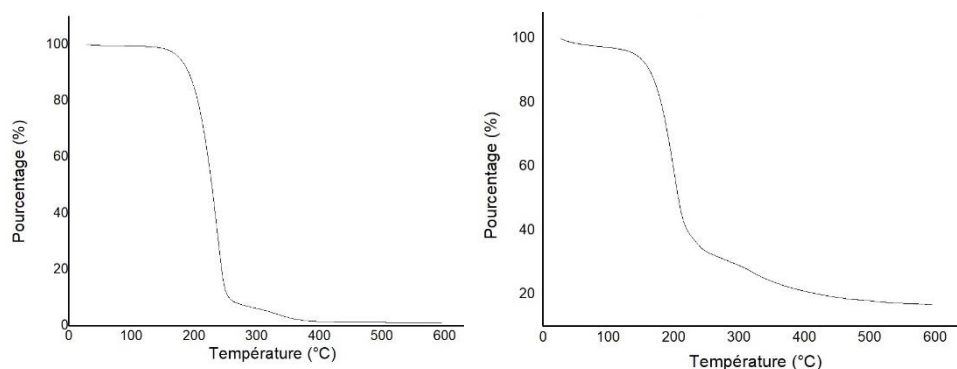


Figure 110 : TGA de l'AL-F<sub>7</sub> (à gauche) et des nanoparticules revêtues d'AL-F<sub>7</sub> (à droite).



La TGA des nanoparticules montre une perte en masse de 68 % centrée sur 205 °C et qui correspond à la perte d'AL-F<sub>7</sub>.

### 2.3.3.4.3 Quantification du nombre d'AL-F<sub>7</sub> sur la nanoparticule

Le nombre de AL-F<sub>7</sub> par nanoparticule a été estimé grâce à la thermogravimétrie avec la méthodologie utilisée au chapitre 1. Après modélisation, le nombre de AL-F<sub>7</sub> adsorbé par nanoparticule est estimé à 1084 ce qui correspond à 24 molécules d'AL-F<sub>7</sub> par nm<sup>2</sup>. Une estimation par modélisation a été effectuée en évaluant la surface du ligand sur la nanoparticule (Figure 87). Le nombre de ligand varie entre 4 et 12 molécules par nm<sup>2</sup>. L'étude DOSY n'a pas été réalisée dans le chloroforme. Néanmoins, nous pouvons supposer que le pourcentage d'acide lipoïque lié à la surface (25%) de la nanoparticule est identique à celui de l'AL-PEG<sub>750</sub>-OMe. Par conséquent, 6 molécules de AL-F<sub>7</sub> seraient présentes par nm<sup>2</sup> à la surface des nanoparticules.

### 2.3.3.4.4 Spectroscopie UV-Visible

Les nanoparticules revêtues d'AL-F<sub>7</sub> ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible (Figure 111).

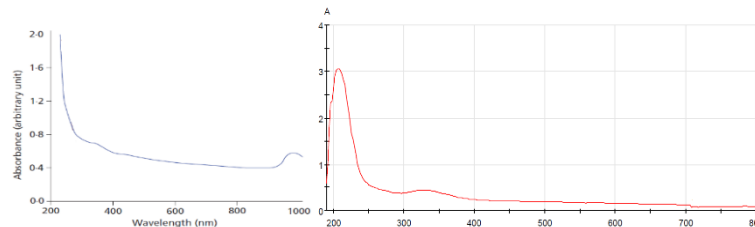


Figure 111: Spectre UV-Visible des nanoparticules synthétisées par Badireddy et al. (à gauche)<sup>86</sup> et des nanoparticules revêtues d'AL-F<sub>7</sub> (à droite).

Les nanoparticules absorbent dans tout le domaine spectral de 200 à 800 nm. Le spectre de nos nanoparticules de bismuth métallique est identique à celui décrit dans la littérature par Badireddy et al.<sup>86</sup> La bande à 330 nm correspond spécifiquement aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de molécules contenant des groupements thiols.

### 2.3.3.5 Caractérisation des nanoparticules avec un revêtement AL-F<sub>7</sub>

Dans cette partie du chapitre, les résultats de caractérisation des nanoparticules à revêtement citrate sont comparées aux nanoparticules à revêtement AL-F<sub>7</sub>.



### 2.3.3.5.1 Spectroscopie infrarouge

Une comparaison des spectres infrarouge avant et après l'échange est illustrée par la figure 112.

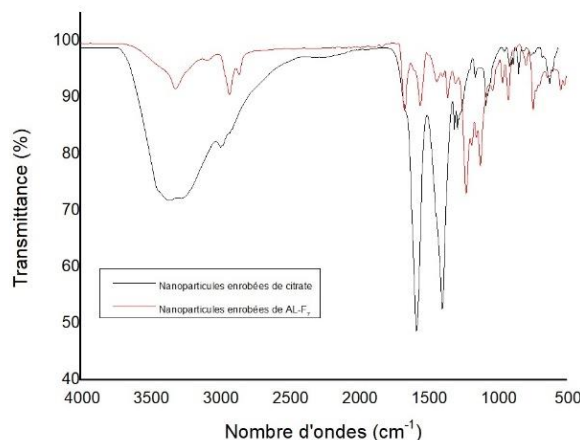


Figure 112 : Comparaison des spectres infrarouge avant et après l'échange par AL-F<sub>7</sub>.

La superposition des spectres infrarouges des nanoparticules revêtues de citrate et d'AL-F<sub>7</sub> montre que l'échange est complet car la bande hydroxyde à 3309 cm<sup>-1</sup> et les bandes à 1558 (C=O) et à 1362 cm<sup>-1</sup> (C-O) ont disparu. Des nouvelles bandes à 3322 cm<sup>-1</sup> (N-H), à 1660 cm<sup>-1</sup>, à 1548 cm<sup>-1</sup> (C=O du carbonyle de l'amide) ainsi que des bandes de fortes intensités à 1222 cm<sup>-1</sup> et à 1115 cm<sup>-1</sup> (C-F) sont observées et montrent la présence de la molécule AL-F<sub>7</sub> à la surface de la nanoparticule.

### 2.3.3.5.2 Analyse thermogravimétrique

Une comparaison des graphes de thermogravimétrie avant et après l'échange par AL-F<sub>7</sub> est illustrée par la figure 113.

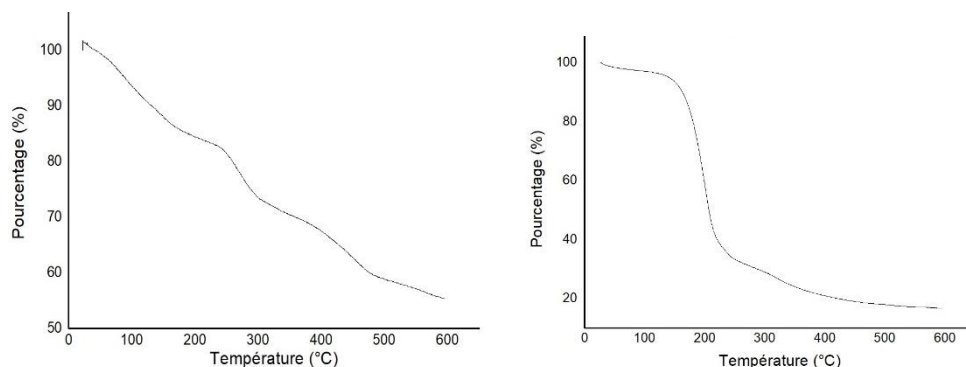


Figure 113: TGA avant l'échange (à gauche) et après l'échange par AL-F<sub>7</sub> (à droite).



La perte de masse centrée sur 250 °C correspondant aux molécules de citrates adsorbées sur les nanoparticules n'est plus observée après l'échange. Par conséquent, l'échange de ligand a eu lieu entre le citrate et l'AL-F<sub>7</sub>.

### 2.3.3.5.3 Spectroscopie UV-Visible

Pour rappel, la spectroscopie UV-Visible permet de suivre l'échange de ligand *via* l'observation du déplacement de la bande plasmonique (Figure 114).

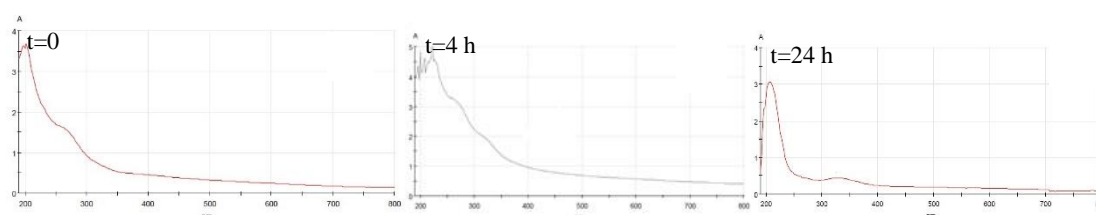


Figure 114 : Comparaison des spectre UV-Visible avant et après l'échange par AL-F<sub>7</sub>.

Au départ de la réaction, la bande à 268 nm correspond spécifiquement aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate (Figure 114A).<sup>19</sup> Après 4 heures de réaction, deux bandes plasmoniques sont observées, l'une est caractéristique du revêtement citrate (268 nm) à la surface et l'autre est caractéristique d'un revêtement par une molécule contenant des thiols (330 nm) à la surface des nanoparticules (Figure 114B). Après 24 heures de réaction, une seule bande plasmonique à 330 nm est observée correspondant aux nanoparticules de bismuth métallique revêtues de (*R*)-lipoate de sodium (Figure 114C).<sup>86</sup>

Toutes les caractérisations démontrent que l'échange de ligand avec AL-C<sub>18</sub> est complet.

## 3 Conclusion

La surface des nanoparticules de bismuth métallique revêtue de citrate a été modifiée pour améliorer leur stabilité dans le sérum physiologique et changer la physicochimie de la surface. La stratégie choisie dans ce travail a été d'effectuer un échange de ligand. Cette stratégie a permis de mieux contrôler les molécules adsorbées à la surface.

Plusieurs ligands ont été testés et nous avons sélectionné le (*R*)-lipoate de sodium. L'avantage de ce composé est aussi sa facilité à être fonctionnalisé par couplage entre son acide carboxylique et une amine notamment.



Au départ, l'acide (*R*)-lipoïque a été couplé avec le polyéthylène glycol 750 afin d'améliorer la stabilité des nanoparticules hydrophiles dans une solution de NaCl à 9 g/L (150 mM). Des revêtements hydrophobes ont ensuite été introduits tels que l'octadécylamine et l'heptafluorobutylamine pour obtenir des nanoparticules hydrophobes et fluorophiles.

Une méthode de spectroscopie UV-Visible a été développée afin de suivre l'échange de ligand. Ensuite, plusieurs techniques de caractérisation ont été utilisées pour mettre en évidence l'échange complet entre le citrate et les différents dérivés de l'acide (*R*)-lipoïque. A notre connaissance, cette étude quantitative de validation d'échange de ligand n'a jamais été effectuée pour des nanoparticules de bismuth métallique.

Les travaux présentés dans les trois premiers chapitres ont fait l'objet d'un brevet européen (Bismuth metallic(0) nanoparticle, process of manufacturing and uses thereof. EP 18305851.0).<sup>168</sup>

Dans la suite de ce manuscrit, la formulation des nanoparticules hydrophobes et fluorophile dans des émulsions a été envisagée afin d'être utilisées dans des applications biomédicales.







## Chapitre 4 : Formulation des émulsions incorporant des nanoparticules







## 1 Introduction

Nous avons montré dans le chapitre précédent qu'après l'échange de ligand, il était possible d'obtenir de façon reproductible des nanoparticules de bismuth métallique revêtues d'un ligand hydrophobe ou polyfluoré. Pour rappel, ces ligands ont été introduits afin de solubiliser les nanoparticules dans des huiles hydrophobes ou fluorées afin de former des émulsions H/E. À notre connaissance, ces systèmes d'émulsion n'ont jamais été décrits et pourraient permettre d'augmenter la concentration locale en nanoparticules pour induire des effets radiosensibilisants efficaces. Dans la littérature, très peu d'émulsions dites « standard » c'est à dire stabilisées pas des tensio-actifs incorporant des nanoparticules ont été étudiées. Seuls des travaux incorporant des ferrofluides dans des émulsions sont décrits.<sup>169–171</sup> A contrario, les émulsions de Pickering sont des systèmes très étudiés. Ces émulsions sont stabilisées par des particules solides colloïdales. Cette méthode de stabilisation diffère des émulsions standards (Figure 115).

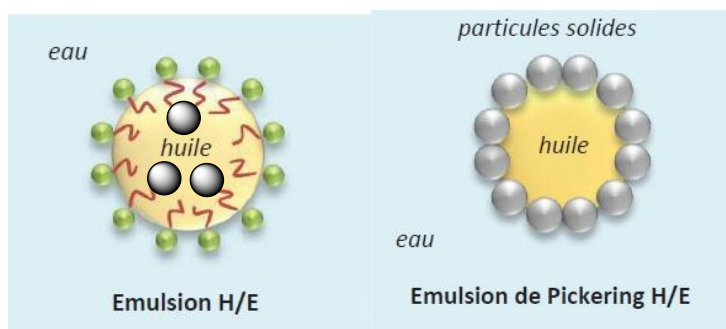


Figure 115 : Comparaison d'une émulsion standard incorporant des nanoparticules et d'une émulsion de Pickering.

## 2 Émulsions hydrophobes stabilisées par des phospholipides

### 2.1 Composition des émulsions

Pour former une émulsion H/E, nous avons sélectionné des composés inscrits dans la pharmacopée puisque nos systèmes sont susceptibles d'avoir des applications biomédicales notamment en tant que radiosensibilisateurs pour la radiothérapie. Nous avons donc choisi dans un premier temps d'étudier un couple huile/tensio-actif, constitué de Miglyol® 812 N et du LIPOID S75 utilisé dans la formulation des émulsions parentérales. La composition typique d'une formulation d'émulsion parentérale est décrite dans le tableau 58. Ce type d'émulsion permet d'apporter des nutriments en cas d'impossibilité ou de contre-indication à la nutrition orale.<sup>172</sup>



	Composition
Huile	15% à 35% (m/m)
Glycérol	0,225-0,250%
LIPOID S75	0,6-1,8%
Oléate de sodium	0,03%
NaOH	Pour ajuster le pH

Tableau 58: composition d'une émulsion parentérale.

- L'huile utilisée est le Miglyol® 812 N de la société IOI Oleochemical. Cette huile est composée de triglycérides avec des chaînes de huit carbones et de dix carbones en proportion molaire 55:45.
- Le tensio-actif commercialisé par la société Lipoid sous la terminologie de LIPOID S75 est constitué d'un mélange de phospholipides de soja contenant majoritairement (70%) de phosphatidylcholine. A pH=7, la phosphatidylcholine est sous forme zwitterionique (Figure 116).<sup>173</sup>

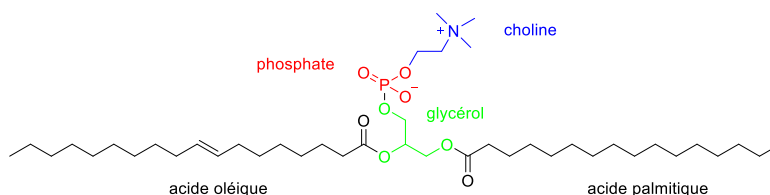


Figure 116 : Structure de la phosphatidylcholine.

Pour prendre en main la technologie d'émulsification de ce couple huile / tensio-actif, nous avons réalisé dans un premier temps des émulsions sans incorporation de nanoparticules et avons testé différentes concentrations de LIPOID S75.

## 2.2 Formulation d'émulsions H/E sans incorporation de nanoparticules

La préparation d'une émulsion H/E se réalise en plusieurs étapes (Schéma 45) :

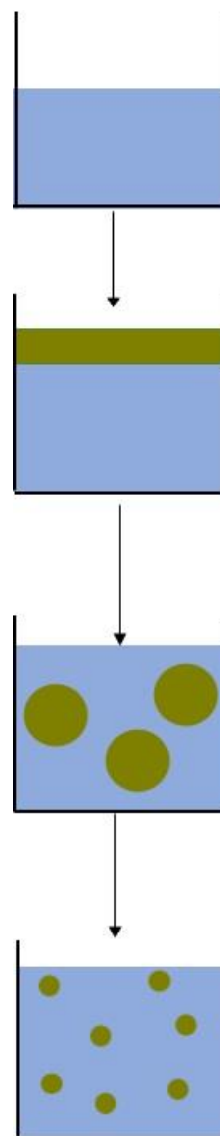


**Étape 1 :** Solubilisation de glycérol 0,2% (m/m) et de LIPOID S75 dans l'eau.

**Étape 2 :** Ajout de l'huile Miglyol® 812 N (20% m/m) à 50 °C.

**Étape 3 :** Formation de la pré-émulsion en utilisant un système rotor/stator de type Ultra-Turrax.

**Étape 4 :** Formation de l'émulsion à l'aide d'un microfluidiseur.



*Schéma 45 : Etapes de formulation d'une émulsion.*

#### 2.2.1 Solubilisation des réactifs : étape 1

Dans un premier temps, le LIPOID S75 est solubilisé dans un mélange eau/glycérol à 50 °C. L'ajout du glycérol (0,2% m/m) est justifié dans les émulsions parentérales par la nécessité d'ajuster dans ces formulations l'osmolalité de la solution injectée à l'osmolalité sanguine (# 300 mOsm/L).<sup>174</sup>



### 2.2.2 Ajout de l'huile : étape 2

La phase huileuse, constituée de Miglyol® 812 N, est chauffée préalablement à 50 °C avant son ajout à la solution aqueuse afin de diminuer sa viscosité. Dans toutes nos études, la quantité d'huile est fixée à 20% en masse par rapport à la phase aqueuse par analogie aux émulsions parentérales commercialisées (de 15 à 35 % en masse).<sup>174</sup>

### 2.2.3 Formulation de la pré-émulsion grossière : étape 3

La solution a été pré-émulsifiée avec un système rotor/stator de type Ultra-Turrax tournant à 20500 tours/min pendant cinq minutes. Le rotor et le stator sont deux cylindres concentriques, respectivement de 18 mm et de 25 mm de diamètres internes, séparés par un entrefer de 0,5 mm (Figure 117). L'extrémité de ces deux pièces est garnie de dentelures de forme rectangulaire permettant la circulation du fluide. La solution est aspirée automatiquement dans le sens axial, dans la tête de dispersion et comprimée ensuite, dans le sens radial, à travers les fentes du système rotor/stator. Les gouttes sont fragmentées dans le gradient de vitesse à l'intérieur de l'entrefer.

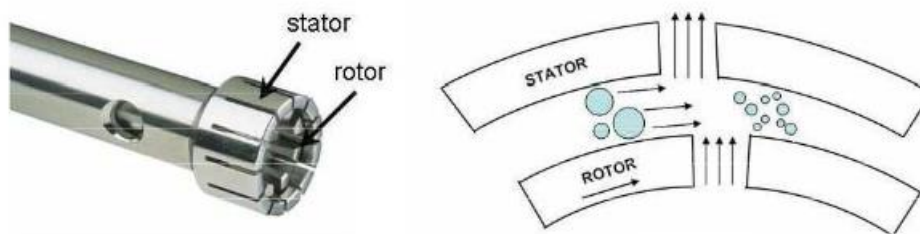


Figure 117 : Sonde et effet du fonctionnement de l'Ultra-Turrax.

Les pré-émulsions obtenues restent grossières, en effet les diamètres sont de l'ordre du micromètre. Cet appareil ne crée pas un cisaillement suffisamment important pour former des émulsions de faibles diamètres comme illustré par la figure 118.<sup>175</sup>



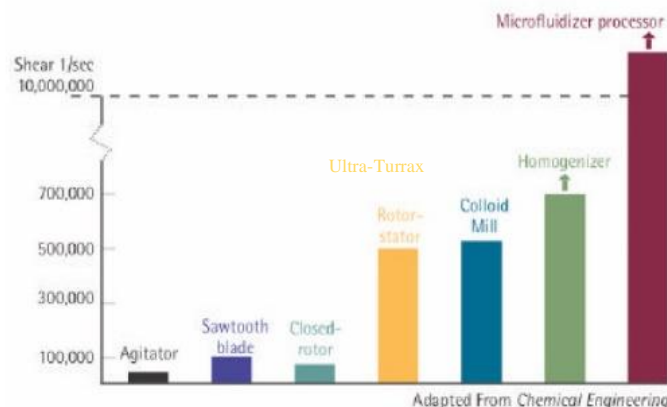


Figure 118: Comparaison des taux de cisaillement selon les équipements utilisés.

On obtient des cisaillements de 500 000 par seconde via l'Ultra-Turrax ce qui permet d'obtenir classiquement des diamètres de l'ordre du micromètre. Le microfluidiseur lui permet d'obtenir 10 000 000 cisaillements par seconde ce qui permet d'atteindre typiquement des diamètres de gouttelettes de 200 nm, d'après les données des fournisseurs.

#### 2.2.4 Formulation de l'émulsion fine : étape 4

Comme montré dans la figure 118, le microfluidiseur permet d'obtenir un taux de cisaillement beaucoup plus important que l'Ultra-Turrax afin de former des émulsions de plus faibles diamètres. Son fonctionnement est schématisé sur la figure 119.

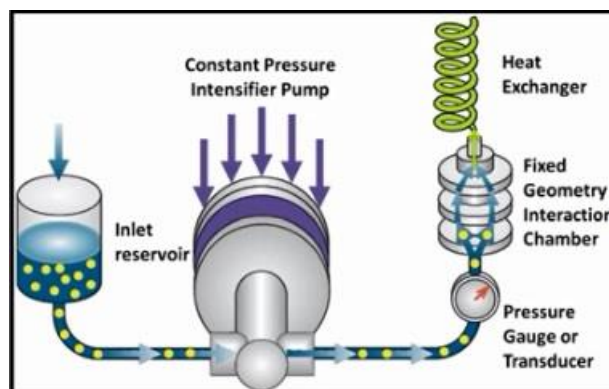


Figure 119 : Fonctionnement du microfluidiseur.

Le microfluidiseur utilisé est un Microfluidic® LV1 qui permet de travailler à une gamme de pression allant de 10000 psi à 30000 psi. L'échantillon est d'abord introduit dans la machine par aspiration, puis est comprimé à l'aide d'une haute pression vers une chambre de géométrie Y pour créer du cisaillement (Figure 120).





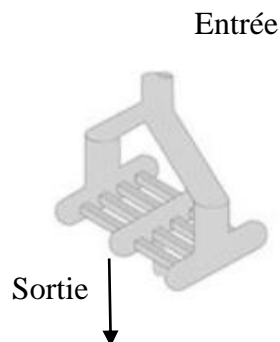


Figure 120 : Représentation des canaux de la chambre en Y du microfluidiseur.

Cette forme en Y provoque des zones importantes de cisaillement et de collision. De ce fait, la solution est alors soumise à :<sup>175</sup>

- Un écoulement de cisaillement laminaire, au niveau du contact entre le liquide circulant à très grande vitesse et les parois immobiles des canaux.
- Un écoulement de cisaillement turbulent, au centre des canaux.
- Des collisions.
- De la cavitation.

### 2.3 Etude des diamètres des gouttelettes

Notre objectif est de produire des émulsions stables dont le diamètre des gouttelettes d'huile est faible (<250 nm) pour envisager des injections intraveineuses (par analogie aux émulsions parentérales). Pour atteindre cet objectif, l'influence de la quantité de LIPOID S75 sur le diamètre et la stabilité des émulsions obtenues a été étudiée.

Dans le protocole choisi, au départ, notre formulation contient entre 0,25% et 1,4% massique de LIPOID S75 et 20% massique de Miglyol® 812 N par rapport à l'eau. Une pré-émulsion est formée à l'aide de l'Ultra-Turrax puis est passée dans le microfluidiseur trois fois à une pression de 30000 psi (207 MPa) pour former des gouttelettes de faible diamètre (Figure 121).



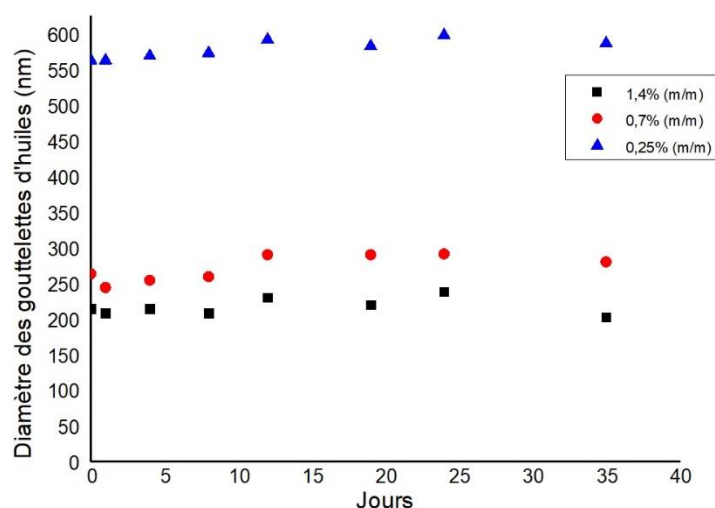


Figure 121: Mesure du diamètre des émulsions à différents pourcentages massiques de LIPOID S75 dans le temps.

Une diminution significative du diamètre des gouttelettes a été observée en augmentant le pourcentage de LIPOID S75. Pour 1,4% (m/m) de LIPOID S75, des diamètres de gouttelettes de l'ordre de 200 nm ont été obtenus à température ambiante et une stabilité d'au moins 40 jours a été observée.

Afin de tenter de diminuer le diamètre des émulsions, le nombre de passages au microfluidiseur a été augmenté en conservant la pression maximale de 30000 psi (Tableau 59).

Nombres de passage	Diamètres (nm) en intensité (Proportions %)
3	191±78 (100%)
6	185±68 (100%)

Tableau 59 : Comparaison des diamètres obtenus après trois ou six passages dans le microfluidiseur

Aucune diminution du diamètre n'a été constatée en augmentant le nombre de passages. Pour l'incorporation des nanoparticules, une quantité de 1,4% (m/m) de LIPOID S75 a été retenue ainsi qu'une pression de 30000 psi combinée à trois passages successifs au microfluidiseur ont été appliqués.

#### 2.4 Préparation d'émulsions hydrophobes incorporant des nanoparticules

Les conditions précédentes ont été appliquées mais le procédé nécessite néanmoins une étape supplémentaire de solubilisation des nanoparticules dans l'huile (Schéma 46, étape 2).



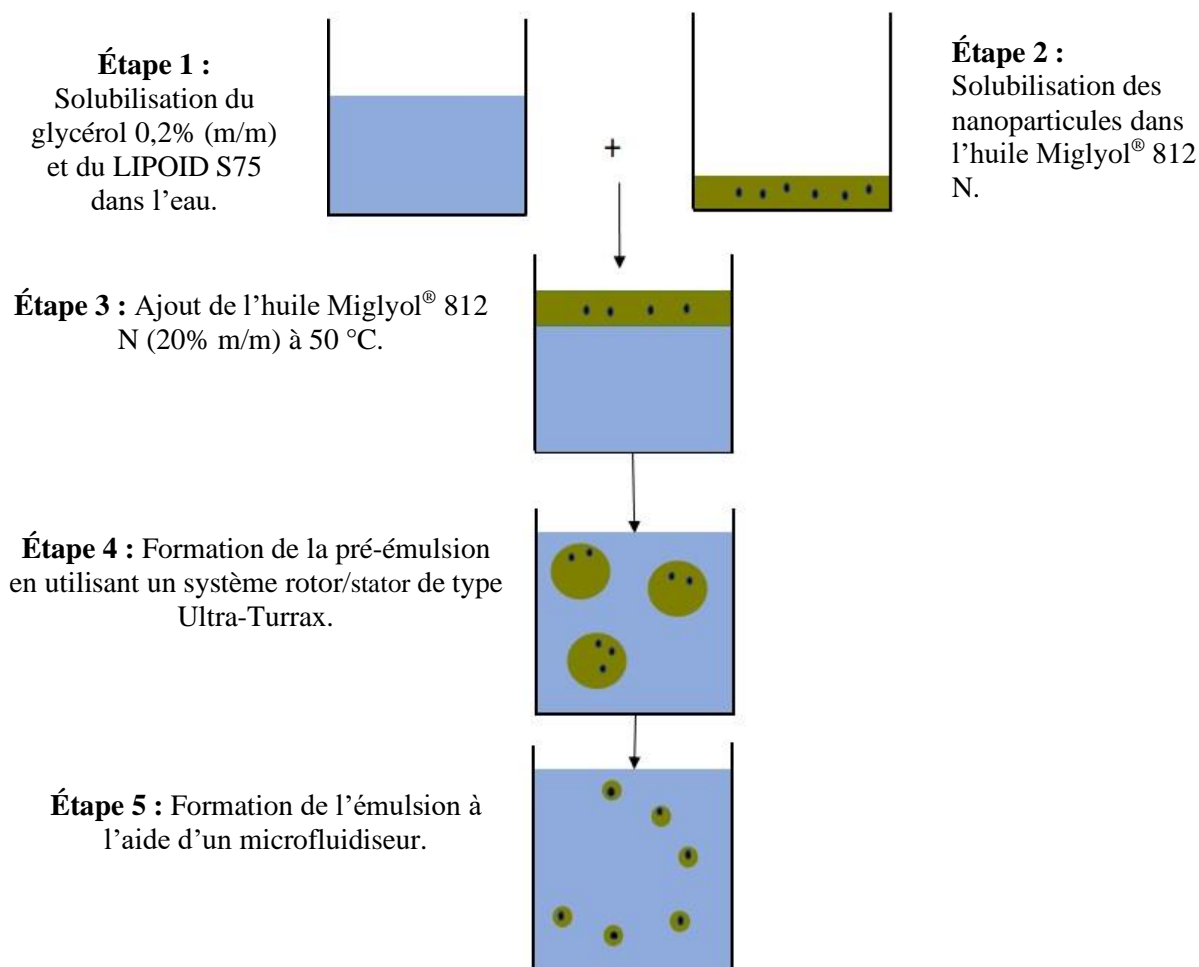


Schéma 46 : Formulation d'une émulsion hydrophobe incorporant des nanoparticules de bismuth.

Pour rappel, les nanoparticules hydrophobes sont synthétisées *via* une réaction d'échange de ligand à partir de nanoparticules revêtues de citrate synthétisées précédemment par un procédé continu (Schéma 47).

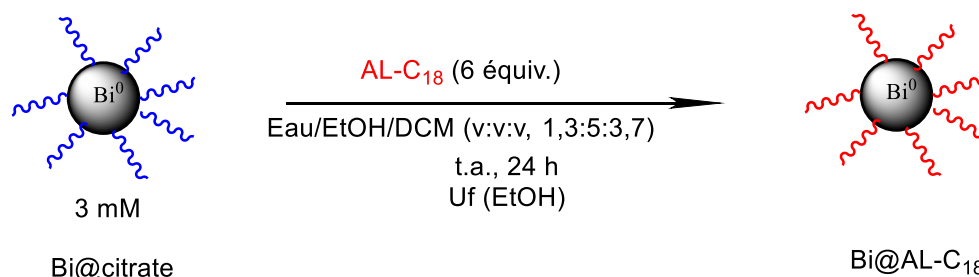


Schéma 47 : Echange de ligand avec l'acide (R)-lipoïque octadécylamine (en rouge) à partir d'une nanoparticule revêtue de citrate (en bleu).

Après une ultrafiltration dans l'éthanol, les nanoparticules sont lyophilisées pour éliminer toutes traces de solvant qui pourraient induire une dispersion des nanoparticules dans les deux



phases. Les nanoparticules sont ensuite solubilisées dans le Miglyol® 812 N à température ambiante pendant vingt-quatre heures sous forte agitation combinée à une irradiation sous ultrasons pendant dix minutes toutes les heures. Finalement, la solution est chauffée à 50 °C pendant dix minutes pour diminuer sa viscosité et faciliter son prélèvement.

Plusieurs essais de solubilisation des nanoparticules à différentes concentrations dans le Miglyol® 812 N ont été effectués afin d'apprécier visuellement la solubilité maximale des nanoparticules dans l'huile à température ambiante (Tableau 60).

Concentrations en nanoparticules	Solubilité des nanoparticules dans le Miglyol® 812 N à t.a.
9 mM	Oui
12 mM	Oui
18 mM	Non car l'huile se fige

Tableau 60 : Solubilité des nanoparticules dans le Miglyol® 812 N en fonction de leur concentration.

Cette étude montre que la solubilité maximale dans le Miglyol® 812 N est atteinte pour une concentration en nanoparticules de 12 mM à température ambiante. Une émulsion a été formulée à partir de cette concentration en nanoparticules puis caractérisée.

### 2.4.2 Test de déstabilisation accélérée des émulsions hydrophobes incorporant des nanoparticules

Les conditions utilisées pour la formulation de cette émulsion incorporant des nanoparticules sont illustrées dans le schéma 48.

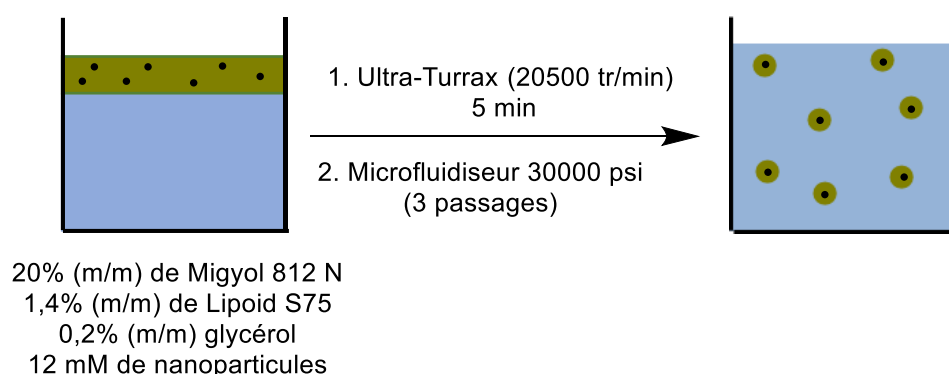


Schéma 48 : Emulsion hydrophobe contenant des nanoparticules.

Pour étudier la stabilité de cette émulsion, un test de déstabilisation accélérée a été réalisé. Ce test permet d'accélérer la déstabilisation des émulsions par utilisation de la centrifugation. L'expérience consiste à centrifuger l'échantillon à 14500 tr/min afin d'amener le système à



son équilibre thermodynamique de deux phases distinctes : phase huileuse et phase aqueuse. Après centrifugation, les nanoparticules peuvent se trouver soit en phase huileuse ou soit en phase aqueuse (Schéma 49).

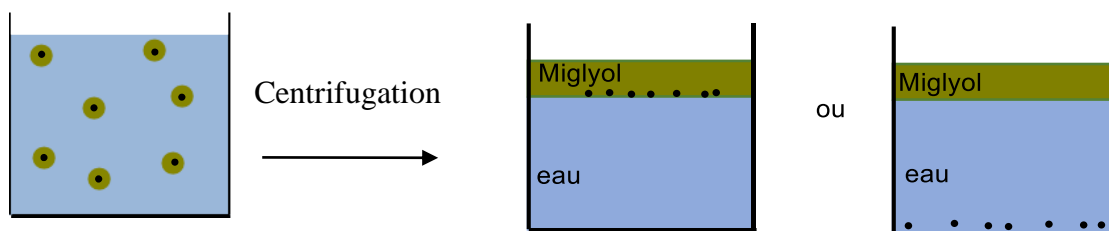


Schéma 49 : Comportement des nanoparticules à l'issue du test de déstabilisation accélérée.

Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau 61 suivant les étapes de formulation des émulsions et selon la présence ou non de LIPOID S75.

Étapes de formulation de l'émulsion	Tensio-actif : LIPOID S75	Constats
Ajout du Miglyol® 812 N contenant les nanoparticules (étape 3)	Présent	Les nanoparticules sont dans la phase huileuse
	Absent	Les nanoparticules sont dans la phase huileuse
Utilisation de l'Ultra-Turrax (étape 4)	Présent	<u>Les nanoparticules précipitent en phase aqueuse</u>
	Absent	Les nanoparticules sont dans la phase huileuse

Tableau 61 : Test de déstabilisation accélérée en fonction des étapes de formulation des émulsions hydrophobes incorporant des nanoparticules.

Les résultats du test de déstabilisation accélérée lors de l'étape de l'ajout du Miglyol® 812 N contenant les nanoparticules (Tableau 61, étape 3) montrent que l'agent de revêtement AL-C<sub>18</sub> est suffisamment hydrophobe pour que les nanoparticules soient solubilisées efficacement dans l'huile.



Néanmoins, de façon surprenante, lors de l'utilisation de l'Ultra-Turrax (Tableau 61, étape 4) et en présence de LIPOID S75, les nanoparticules passent en phase aqueuse après centrifugation.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat :

- La première hypothèse est que les gouttelettes d'huile formées à cette étape devraient être plus petites quand elles sont formées en présence du LIPOID S75 et qu'elles doivent donc incorporer une plus forte concentration en nanoparticules de bismuth. De ce fait, la densité de ces gouttelettes est augmentée et est plus importante que celles ne contenant aucune nanoparticule. Dès lors, cette augmentation de densité induirait une sédimentation ce qui expliquerait la présence de nanoparticules sédimentées dans la phase aqueuse lors du test de déstabilisation accélérée.
- Une deuxième hypothèse est que la tension interfaciale entre l'huile et l'eau est très faible. Par conséquent, lors de la centrifugation, les particules déforment l'interface huile-eau en raison de la contrainte de pesanteur ce qui les pousse vers le bas. Les particules passent alors dans l'eau entourées éventuellement d'une faible couche d'huile.
- La dernière hypothèse est qu'en présence d'un excès de LIPOID S75, une bicouche de tensio-actifs s'incorpore autour des nanoparticules lors de l'émulsification. Cette bicouche de tensio-actif permet d'augmenter la mouillabilité des nanoparticules dans l'eau (Figure 122).

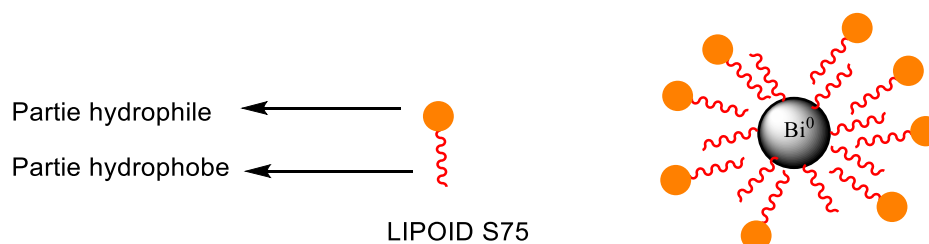


Figure 122: Bicouche de tensio-actifs autour de la nanoparticule.

Afin de tenter de limiter ces phénomènes d'instabilité, nous avons voulu utiliser un autre tensio-actif qui n'induisait pas la formation de bicouche. Notre choix s'est porté sur le poloxamère 188 qui est aussi inscrit à la pharmacopée et qui est utilisé dans le domaine pharmaceutique en tant qu'excipient et/ou émulsifiant.<sup>176,177</sup>



### 3 Émulsions hydrophobes stabilisées par le poloxamère 188

Les poloxamères sont des polymères triblocs comportant deux chaînes de PEG liées par un polypropylène glycol (PPG). Le poloxamère 188 comporte 80 unités de PEG et 27 unités de PPG de masse moléculaire centrée à 1750 Da (Figure 123).

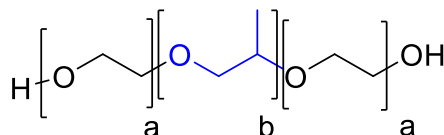


Figure 123 : Structure du poloxamère 188 ( $a=80$  et  $b=27$ ).

Pour une émulsion de type huile dans eau, le bloc central de PPG tend à s'adsorber à l'interface tandis que les deux chaînes de PEG s'étirent dans la phase aqueuse comme illustré dans la figure 124.

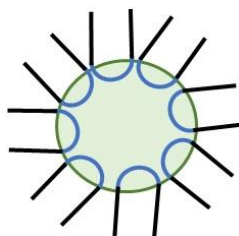


Figure 124 : Emulsion stabilisée par le poloxamère 188 (en noir le PEG et en bleu le PPG).

#### 3.1 Formulation de l'émulsion à l'aide du microfluidiseur

En se basant sur le protocole précédent, une pré-émulsion est formée à l'aide de l'Ultra-Turrax puis l'émulsion est obtenue en effectuant trois passages successifs dans le microfluidiseur à une pression de 30000 psi (207 MPa).

##### 3.1.1 Optimisation de la concentration en poloxamère 188 dans l'émulsion hydrophobe

Comme précédemment, nous avons étudié, dans une phase préliminaire, l'influence de la concentration en poloxamère 188 dans une gamme allant de 5% à 20% (m/m) par rapport à l'eau sur le diamètre de l'émulsion. Les diamètres des gouttelettes obtenues en faisant varier la quantité de poloxamère 188 sont présentés ci-dessous (Tableau 62).

Pourcentage massique (%) en poloxamère 188	5	10	15	20
--------------------------------------------	---	----	----	----



Diamètres (nm) des émulsions en intensité (proportions)	195± 82 (100%)	174± 78 (100%)	124± 48 (98%) 5318± 398 (2%)	117± 56 (92%) 3257± 1585 (8%)
---------------------------------------------------------	----------------	----------------	---------------------------------	----------------------------------

Tableau 62 : Diamètres des émulsions en fonction du pourcentage massique en poloxamère 188.

Le pourcentage massique maximal de poloxamère 188 qui conduit à une population homogène de gouttelettes est de 10%. En effet, au-dessus de cette concentration, des objets de l'ordre du micromètre sont observés. De ce fait, une émulsion a été réalisée en incorporant des nanoparticules en présence de 10% de poloxamère 188.

### 3.1.2 Evaluation de la stabilité des émulsions hydrophobes incorporant des nanoparticules

Les conditions utilisées pour la formulation de l'émulsion utilisant le poloxamère 188 sont issues de nos études préliminaires et sont illustrées par le schéma 50.

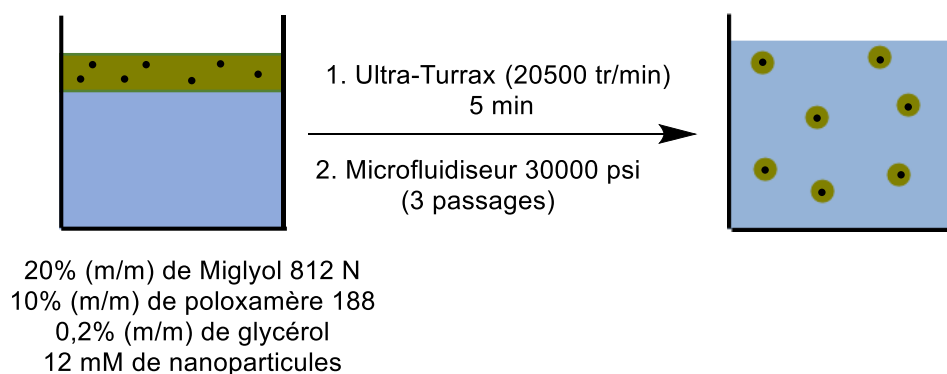


Schéma 50 : Conditions de formulation d'une émulsion hydrophobe contenant des nanoparticules et stabilisée par le poloxamère 188.

Après l'obtention de l'émulsion, plusieurs tests ont été réalisés.

#### 3.1.2.1 Test de Pickering

Comme présenté dans l'introduction de ce chapitre, une émulsion de Pickering est stabilisée par des nanoparticules solides. Nous avons donc voulu voir si nos nanoparticules de bismuth stabilisaient nos émulsions. Pour ce faire, le volume d'huile contenu dans l'émulsion ayant crémée a été comparé au volume totale d'huile dans les émulsions sans poloxamère contenant ou non des nanoparticules.

Les résultats sont présentés en reliant le pourcentage de crémage à savoir le rapport du volume de l'huile de l'émulsion ayant crémée par rapport au volume totale de l'huile, en fonction du temps (Figure 125).



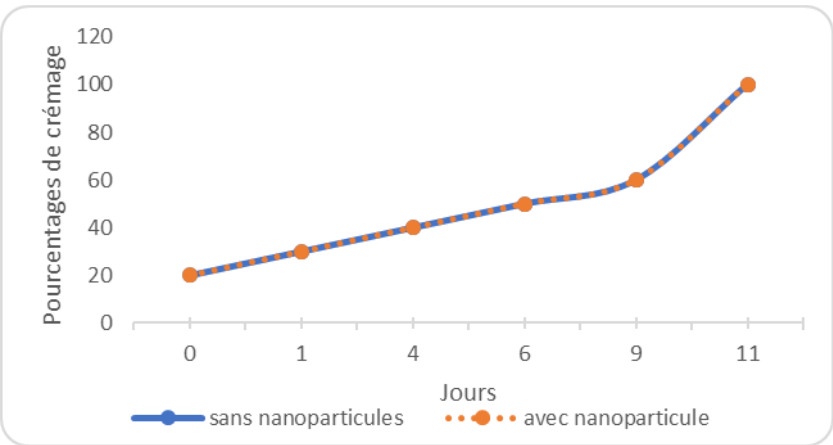


Figure 125 : Pourcentage de crémage en fonction du temps pour deux émulsions en présence et en absence de nanoparticules.

Comme le montre la figure 125, le pourcentage de crémage évolue de façon identique en fonction du temps en présence ou non de nanoparticules. Par conséquent, dans notre cas, les nanoparticules ne stabilisent pas l’émulsion et nous ne formons donc pas une émulsion de Pickering.

3.1.2.2 Test de déstabilisation accélérée

Ce test permet d’accélérer la déstabilisation des émulsions contenant les nanoparticules après centrifugation (Schéma 51).

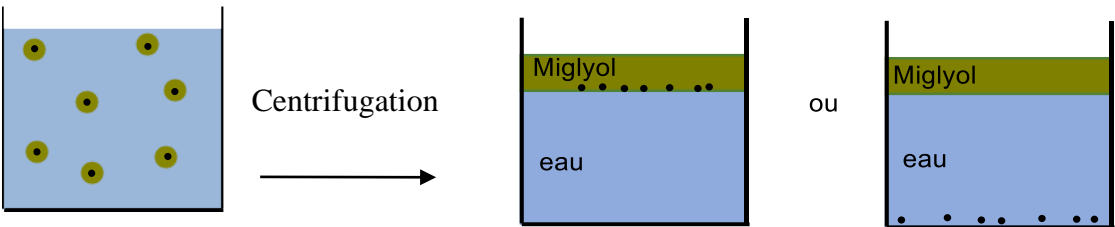


Schéma 51 : Test de déstabilisation accélérée d’une émulsion incorporant des nanoparticules.

Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau 63 selon les étapes de formulation des émulsions en présence ou en absence de poloxamère 188.

Étapes de la formulation de l’émulsion	Tensio-actif : Poloxamère 188	Constats
Ajout du Miglyol® 812 N contenant les nanoparticules (étape 3)	Présent	Les nanoparticules sont dans la phase huileuse
	Absent	Les nanoparticules sont dans la phase huileuse



Utilisation de l'Ultra-Turrax ( <b>étape 4</b> )	Présent	Les nanoparticules sont dans la phase huileuse
	Absent	Les nanoparticules sont dans la phase huileuse
Utilisation du Microfluidiseur ( <b>étape 5</b> )	Présent	<u>Les nanoparticules précipitent en phase aqueuse</u>
	Absent	<u>Les nanoparticules précipitent en phase aqueuse</u>

*Tableau 63 : Test de déstabilisation accélérée en fonction des étapes de formulation des émulsions hydrophobes stabilisées par du poloxamère 188 incorporant des nanoparticules*

Après avoir formulé la pré-émulsion à l'aide l'Ultra-Turrax, le test de déstabilisation accélérée a été réalisé. Contrairement aux résultats obtenus avec le tensio-actif LIPOID S75, les nanoparticules sont ici restées dans la phase huileuse. En effet, la structure du poloxamère ne permet pas d'induire une bicouche de tensio-actifs.

Cependant, après utilisation du microfluidiseur, les nanoparticules passent de la phase huileuse à la phase aqueuse. L'hypothèse est ici que l'utilisation du microfluidiseur crée des gouttelettes de petits diamètres (200 nm) et que celles-ci sont concentrées en nanoparticules de bismuth. De ce fait, leur densité moyenne est élevée ce qui favorise la sédimentation des gouttelettes dans la phase aqueuse lors du test de déstabilisation accélérée.

Pour pallier à ce phénomène de sédimentation et obtenir des émulsions stables (mais néanmoins grossières), nous avons décidé d'étudier plus en détail la pré-émulsion stabilisée par le poloxamère 188.

### *3.2 Pré-émulsion hydrophobe formée à l'aide de l'Ultra-Turrax*

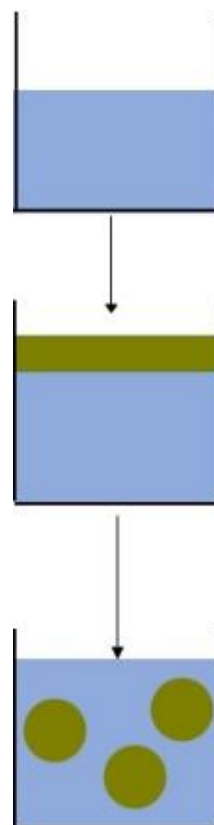
Les différentes étapes de formation des pré-émulsions sont identiques à celles décrites précédemment (Schéma 52). L'Ultra-Turrax a donc été utilisé à 20500 tr/min pendant 15 min, par contre la concentration en poloxamère a dû être réadaptée.



**Étape 1** : Solubilisation du glycérol 0,2% (m/m) et du poloxamère 188 sont ajoutés à l'eau.

**Étape 2** : Ajout de l'huile Miglyol 812 N (20% m/m) à 50 °C.

**Étape 3** : Formation de la pré-émulsion à l'aide de l'Ultra-Turrax (20500 tr/min pendant 15 min) .



*Schéma 52 : Etapes de formulation d'une pré-émulsion hydrophobe*

### 3.2.1 Optimisation de la concentration en poloxamère 188 dans la pré-émulsion hydrophobe.

La stabilité de la pré-émulsion formée à l'aide de l'Ultra-Turrax a été étudiée par observation visuelle en faisant varier le pourcentage massique du poloxamère 188 de 2,5% à 20% par rapport à l'eau. Pour déterminer la stabilité de ces pré-émulsions, la durée pendant laquelle les pré-émulsions ne subissent pas le phénomène de crémage a été évaluée et ceci pour chaque concentration en poloxamère (Tableau 64).

Pourcentage massique (%) en poloxamère 188	2,5	5	7,5	10	15	20
Durée avant d'observer le phénomène de crémage	10 jours	10 jours	10 jours	5 jours	Quelques heures	Quelques heures

*Tableau 64 : Stabilité visuelle en fonction de la quantité de poloxamère 188.*



D'après ces résultats, les pré-émulsions contenant 2,5% à 7,5% de poloxamère 188 sont stables 10 jours avant d'apercevoir le phénomène réversible de crémage. Ces pré-émulsions à différentes concentrations de poloxamère 188 ont été caractérisées par microscopie optique.

### 3.2.1.1 Caractérisations des pré-émulsions hydrophobes de concentrations variables en poloxamère 188

#### 3.2.1.1.1 Microscopie optique

Les images présentées ci-dessous ont été prises à l'aide d'un microscope optique avec un grandissement par x100 en immersion pour l'objectif et par x10 pour l'oculaire (Tableau 65).

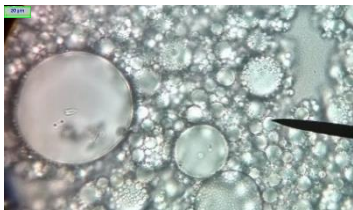
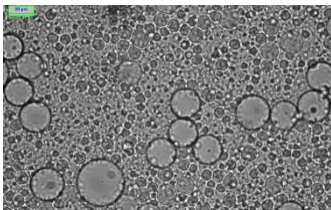
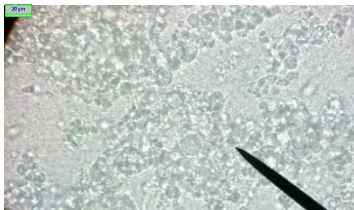
2,5% de poloxamère 188	3% de poloxamère 188	4% de poloxamère 188
 <p>La pré-émulsion est très grossière : la polydispersité est très élevée.</p>	 <p>La pré-émulsion est moins polydisperse. Les plus grosses gouttelettes mesurent 40 <math>\mu\text{m}</math>.</p>	 <p>La concentration en poloxamère 188 dans l'eau est très élevée. Des amas de gouttelettes sont observés.</p>

Tableau 65 : Résultats des observations réalisées au microscope optique.

Ces résultats de microscopie optique ont montré que la pré-émulsion obtenue avec 3% de poloxamère 188 est la moins polydisperse. En outre, avec cette pré-émulsion, aucun amas de petites gouttelettes n'a été observé. Afin de déterminer le diamètre moyen de cette pré-émulsion, une mesure de granulométrie a été réalisée.

#### 3.2.1.1.2 Granulométrie

La granulométrie permet de mesurer le diamètre des émulsions dans une gamme comprise entre 0,3 et 500  $\mu\text{m}$ . Pour chaque lot de pré-émulsions, trois mesures de granulométrie ont été effectuées. Les résultats sont récapitulés dans le tableau ci-dessous (Tableau 66).



Lots	Diamètres moyens par lots ( $\mu\text{m}$ )
1	3,73
2	3,63
3	3,92

Tableau 66: Diamètres des pré-émulsions provenant de différents lots.

Les résultats obtenus montrent que les diamètres des pré-émulsions sont reproductibles. Fort de ce résultat, nous avons étudié une pré-émulsion incorporant les nanoparticules de bismuth

### 3.2.2 Synthèse de la pré-émulsion hydrophobe incorporant des nanoparticules

Les conditions de formulation des pré-émulsions incorporant des nanoparticules sont illustrées par le schéma 53.

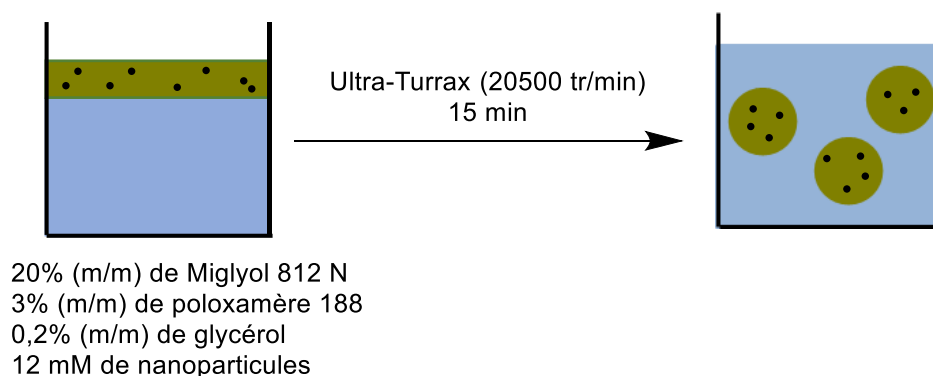


Schéma 53 : Conditions de formulation d'une pré-émulsion hydrophobe incorporant des nanoparticules.

Après l'incorporation des nanoparticules et la formulation de la pré-émulsion, différentes caractérisations ont été effectuées.

#### 3.2.2.1 Caractérisations des pré-émulsions hydrophobes incorporant des nanoparticules

##### 3.2.2.1.1 Granulométrie

Pour chaque lot de pré-émulsions, trois mesures de granulométrie ont été effectuées. Les résultats de ces mesures sont présentés ci-dessous (Tableau 67).

Lot	Diamètres moyennes par lots ( $\mu\text{m}$ )
1	3,71
2	3,70
3	3,67

Tableau 67: Diamètres des pré-émulsions incorporant des nanoparticules.



Les diamètres des pré-émulsions sont reproductibles et la comparaison des tableaux 66 et 67 montre que l'incorporation des nanoparticules n'induit pas de modification des diamètres des gouttelettes.

### 3.2.2.1.2 Microscopie optique

Les images de microscopie optique des pré-émulsions ont été prises à l'aide d'un microscope optique avec un grandissement par x100 en immersion pour l'objectif et par x10 pour l'oculaire (Figure 126).

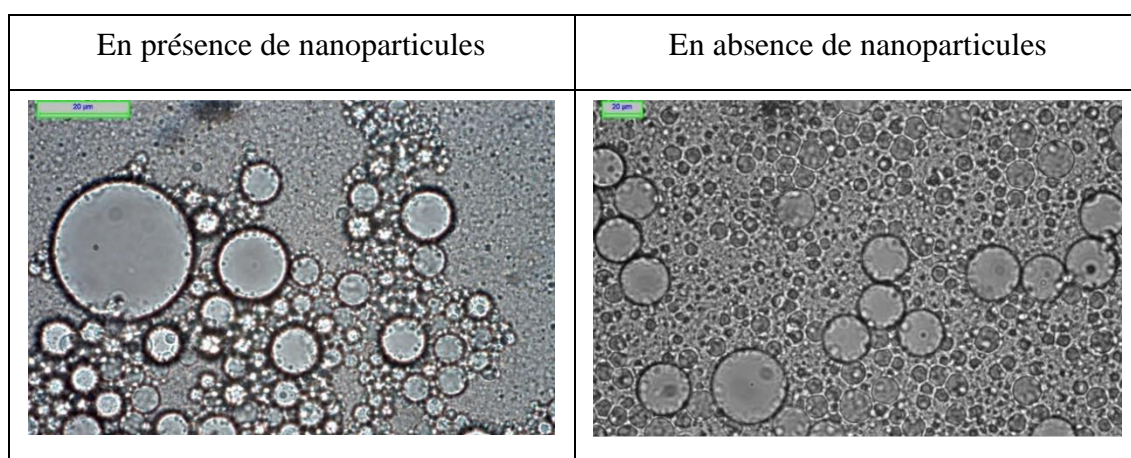


Figure 126: Observations de pré-émulsions contenant ou non des nanoparticules de bismuth réalisées à l'aide d'un microscope optique.

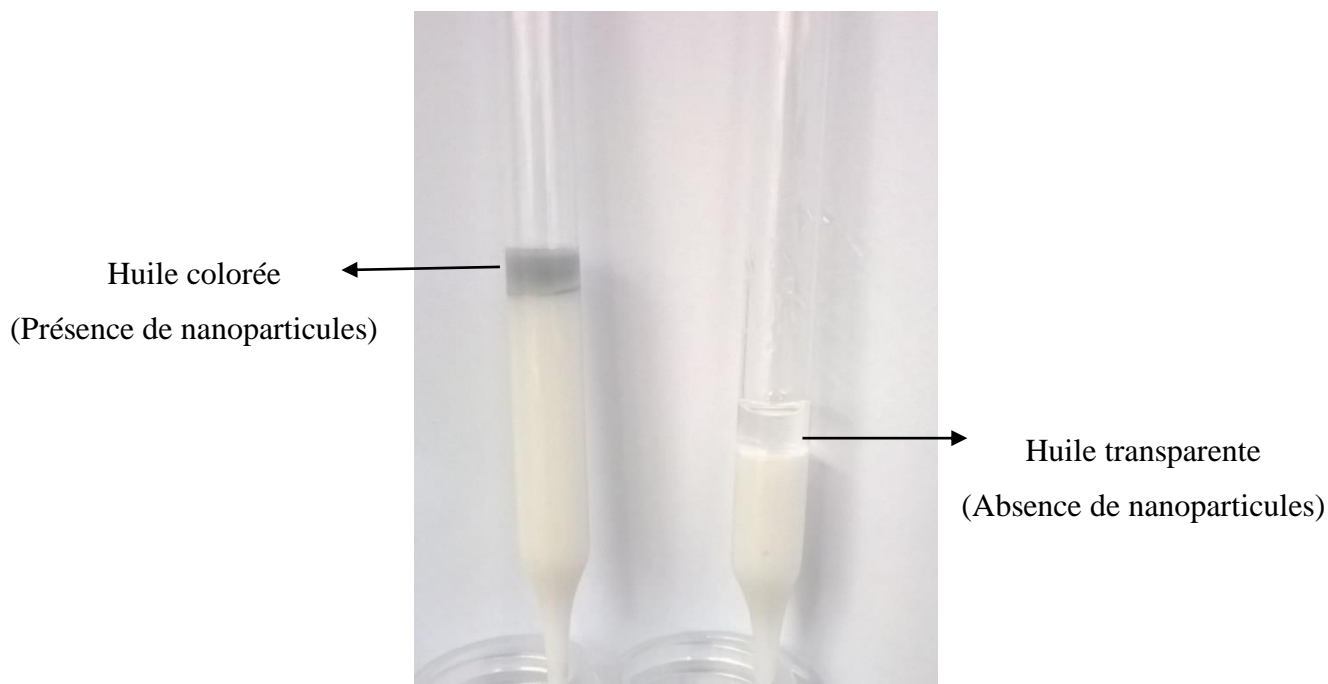
Les diamètres des gouttelettes en présence ou en absence de nanoparticules sont du même ordre de grandeur. Ces images de microscopie optique laissent supposer la présence de nanoparticules incorporées dans l'huile à l'interface de la pré-émulsion. Pour valider l'incorporation des nanoparticules dans la phase huileuse, nous avons caractérisé ces pré-émulsions *via* une observation visuelle du phénomène de crémage et par une analyse en Cryo-TEM.

### 3.2.2.1.3 Observation visuelle du phénomène de crémage

Un moyen indirect de mettre en évidence l'incorporation des nanoparticules dans les pré-émulsions est de comparer le crémage de deux pré-émulsions en présence et en absence de nanoparticules. En effet, lors du phénomène de crémage, l'huile se concentre en haut de l'échantillon alors que l'eau se concentre en bas. De ce fait, si la zone du haut est noire cela indique la présence de nanoparticules dans l'huile. Sur la figure 127 l'échantillon de gauche



est une pré-émulsion incorporant des nanoparticules et celui de droite est une pré-émulsion en absence de nanoparticules (contrôle).



*Figure 127: Suivi du phénomène de crémage pour une pré-émulsion incorporant des nanoparticules (à gauche) et sans nanoparticules (à droite).*

L'huile provenant de la pré-émulsion incorporant des nanoparticules (à gauche) est colorée ce qui indique la présence de nanoparticules dans l'huile.

Afin de visualiser la localisation des nanoparticules dans une gouttelette, la pré-émulsion a été caractérisée par Cryo-TEM. Cependant, cette pré-émulsion contient des gouttelettes de diamètres trop élevées pour les analyser en Cryo-TEM. Les grosses gouttelettes ont donc été retirées de l'échantillon par crémage afin de permettre l'observation des petites gouttelettes par Cryo-TEM.

### 3.2.2.1.4 Cryo-TEM

Après l'élimination des grosses gouttelettes d'huiles par crémage, la pré-émulsion a été caractérisée par Cryo-TEM au laboratoire de Chimie et Biologique des Membranes et des Nano-Objets (CBMN) à Bordeaux. La Cryo-TEM n'a pas donné de résultat satisfaisant à cause de la faible concentration en bismuth solubilisée dans l'huile et de la dilution nécessaire pour observer les émulsions en Cryo-TEM.



## 4 Émulsions perfluorées stabilisées par des phospholipides

En 1966, Clark et Gollan ont montré qu'une souris pouvait être oxygénée à l'aide d'une solution fluorée saturée en oxygène. Cette expérience a suscité l'intérêt des huiles fluorées dans le domaine biomédical.<sup>178</sup> Les huiles fluorées se caractérisent par une grande capacité à solubiliser des gaz et notamment l'oxygène. En effet, les interactions faibles de Van der Waals entre les molécules d'huile permettent la création de 'trous' qui peuvent contenir des molécules de gaz. Cette particularité est à l'origine de nombreux travaux pour développer des émulsions à partir de différentes huiles fluorées en tant que substituts du sang (transporteur d'oxygène).<sup>179</sup> Même si quelques émulsions fluorées (*Fluosol*®, *Oxypherol*®, *Perftoran*®) ont été commercialisées temporairement, les travaux n'ont cependant pas abouti à des produits performants car les problématiques de stabilité des émulsions à base d'huiles fluorées et de la demi-vie de ces émulsions dans l'organisme (dépendant de la masse moléculaire des huiles fluorées) n'ont pas été efficacement réglées.<sup>180</sup> Dans l'optique de réaliser des émulsions pour la radiosensibilisation, l'incorporation d'oxygène dans l'émulsion pourrait être avantageuse pour potentialiser la formation de radicaux hydroxyles.

A l'analyse de la littérature, nous avons choisi le système huile fluorée (PFOB, Schéma 54) et tensio-actif LIPOID S75 pour stabiliser des émulsions fluorées.

- Le PFOB est intéressant car il permet d'obtenir des émulsions fluorées caractérisées par un temps de rétention dans les organes relativement faible (~3 jours chez l'homme pour une dose de 2,7 g/kg). La vitesse d'excrétion rapide du PFOB est attribuée au caractère lipophile, plus marqué pour cette huile, apporté par l'atome de brome terminal.<sup>181</sup>

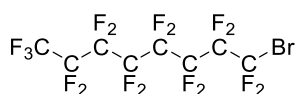
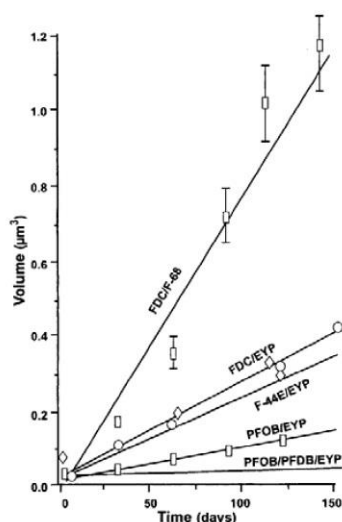


Schéma 54: Structure du PFOB.

- Les phospholipides (notamment issus du jaune d'œuf (EYP)) permettent d'obtenir les meilleures stabilités pour des émulsions à base de PFOB (notamment en comparaison au poloxamère 188) comme le montre la figure 128.<sup>179</sup>





FDC : la perfluorodécaline  
 F-68 : pluronic F68 (poloxamère 188)  
 EYP : phospholipides issus du jaune d'oeuf  
 PFOB : bromure de perfluorooctyl  
 PFDB : bromure de perfluorodécyl

Figure 128 : Evolution du volume des gouttelettes dans différents systèmes d'émulsions fluorées en fonction du temps.

#### 4.1 Préparation des émulsions perfluorées contenant des nanoparticules

Les conditions de préparation de nos émulsions perfluorées incorporant des nanoparticules sont illustrées ci-dessous et sont issues de nos études précédentes utilisant le Miglyol® 812 N (paragraphe 2.2) (Schéma 55).

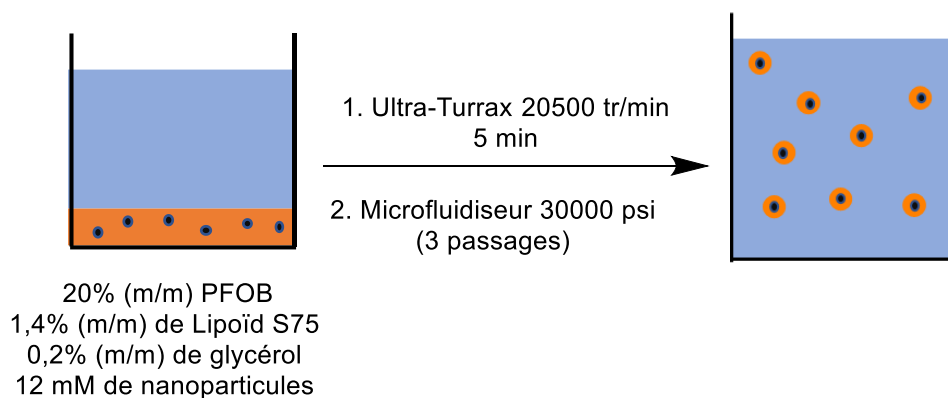


Schéma 55 : Conditions de formulation des émulsions perfluorées incorporant des nanoparticules.

##### 4.1.1 Solubilisation des nanoparticules dans l'huile perfluorée

Pour rappel, les nanoparticules polyfluorées sont synthétisées par échange de ligand à partir des nanoparticules revêtues de citrate synthétisées par un procédé en flux continu (Schéma 56).



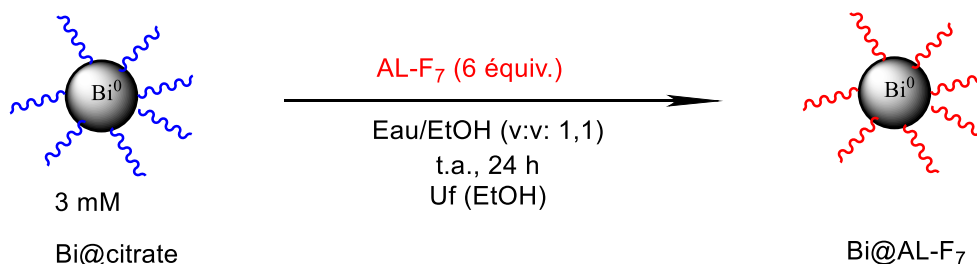


Schéma 56 : Echange de ligand avec l'acide (R)-lipoïque heptafluorobutylamine (en rouge) à partir d'une nanoparticule revêtue de citrate (en bleu).

Après une ultrafiltration dans l'éthanol, les nanoparticules sont lyophilisées pour éliminer toutes traces de solvant qui pourraient induire la dispersion des nanoparticules dans les deux phases. Les nanoparticules sont ensuite solubilisées dans le PFOB à température ambiante pendant vingt-quatre heures sous forte agitation.

#### 4.1.2 Caractérisations des émulsions contenant des nanoparticules

Les émulsions polyfluorées stabilisées par le LIPOID S75 contenant des nanoparticules ont été caractérisées par un test de déstabilisation accélérée.

##### 4.1.2.1 Test de déstabilisation accélérée

Après la centrifugation, les nanoparticules peuvent se trouver en phase huileuse ou en phase aqueuse. L'huile fluorée est plus dense que l'eau (Schéma 57).

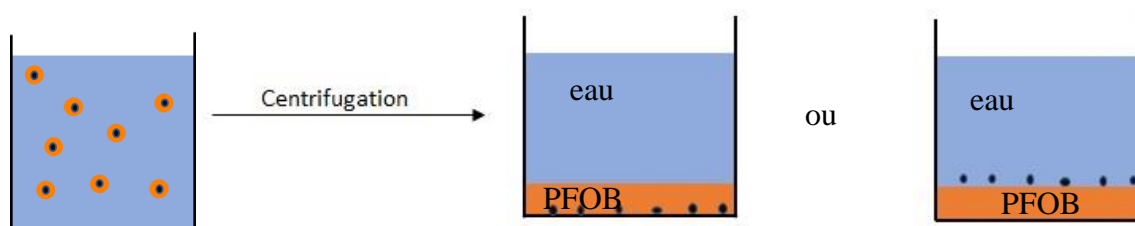


Schéma 57 : Test de déstabilisation accélérée d'une émulsion polyfluorée incorporant des nanoparticules

Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau 68.



Étapes de formulation de l'émulsion fluorée	Tensio-actif : LIPOID S75	Constats
<b>Étape 3</b> : Ajout du PFOB contenant les nanoparticules	Présent	<u>Les nanoparticules sont à l'interface des phases</u>
	Absent	<u>Les nanoparticules sont à l'interface des phases</u>

Tableau 68 : Résultats du test de déstabilisation accélérée à la troisième étape de la formulation des émulsions perfluorées incorporant des nanoparticules.

Les nanoparticules se mettent à l'interface de l'eau et de l'huile fluorée après centrifugation de l'échantillon (Figure 129). Ce résultat suggère que l'agent de revêtement AL-F<sub>7</sub> ne contient pas assez de fluor pour conserver les nanoparticules dans l'huile perfluorée après le test de déstabilisation accélérée.



Figure 129: Photo du test de déstabilisation accélérée lors de l'étape 3 de la formulation d'une émulsion perfluorée incorporant des nanoparticules.

Pour élaborer une émulsion perfluorée stable, il faut donc probablement augmenter le nombre de fluor de l'agent de revêtement afin d'améliorer sa fluorophilie.

## 5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons voulu incorporer des nanoparticules de bismuth dans différentes émulsions afin d'augmenter localement leur concentration dans une optique de leur utilisation en radiothérapie externe. Nous avons délibérément choisi des couples huile / tensio-actif décrits dans la pharmacopée.

Une étude approfondie du couple Miglyol®812 N / LIPOID S75 a été effectuée. Il s'est avéré que ce tensio-actif phospholipidique n'était pas adéquat. En effet, le test de déstabilisation



accélérée permet d'observer un phénomène de sédimentation lors de la formulation de la pré-émulsion *via* l'Ultra-Turrax. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette sédimentation mais nous n'avons pas été en mesure de les démontrer.

Nous avons alors changé de tensio-actif et étudié le couple Miglyol® 812 N / poloxamère 188. Des phénomènes de sédimentation lors du test de déstabilisation accélérée sont apparus pour des émulsions de diamètres inférieures à 200 nm formées à l'aide du microfluidiseur. Cela nous a conduit à étudier la pré-émulsion obtenue *via* l'Ultra-Turrax pour laquelle le phénomène de sédimentation n'est pas observé. Cette pré-émulsion a été caractérisée par microscopie optique et granulométrie et a un diamètre moyen de 3,7 µm. Nous avons démontré, de façon indirecte, l'incorporation des nanoparticules de bismuth dans l'huile Miglyol®812 N par observation visuelle du crémage.

Nous avons aussi testé un couple huile perfluorée PFOB / LIPOID S75. L'huile perfluorée se justifie par sa capacité à solubiliser l'oxygène. L'étude de cette formulation s'est très vite arrêtée car les nanoparticules de bismuth à revêtement polyfluoré que nous avons synthétisées se mettent à l'interface entre le PFOB et l'eau avant l'émulsification. Il serait donc nécessaire d'augmenter le nombre de fluor de l'agent de revêtement pour assurer la solubilité des nanoparticules de bismuth dans le PFOB.







## Chapitre 5 : Evaluation de la cytotoxicité et des effets radiosensibilisants des nanoparticules







## 1 Evaluation de la cytotoxicité

Les travaux visant à évaluer la cytotoxicité des nanoparticules ont été réalisés dans le laboratoire de biologie du Cnam, sous la supervision du docteur Olivier Sawoo.

Nous avons choisi de comparer la cytotoxicité de nos nanoparticules de bismuth métallique à revêtement citrate (Chapitre 2) avec des nanoparticules d'argent revêtues elles aussi de citrate et de même taille en TEM (5 nm). Ce choix se justifie car les nanoparticules d'argent sont utilisées en tant qu'agents antibactériens et antifongiques à large spectre dans différentes applications industrielles.<sup>182</sup>

Pour ce faire, nous avons synthétisé des nanoparticules d'argent suivant le protocole décrit par Agnihotri *et al.* (Schéma 58).<sup>183</sup>

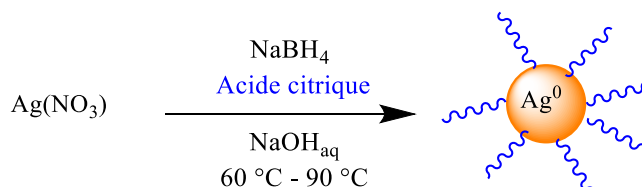


Schéma 58 : Conditions de synthèse pour effectuer des nanoparticules d'argent

Pour évaluer la viabilité cellulaire en présence des nanoparticules, des tests de cytotoxicité (dosage de la LDH et test MTT) ont été effectués sur trois lignées cellulaires différentes (A549, HT29 et THP1) soit

- à différentes concentrations (de 0 à 5 mM en argent ou bismuth) après 48 heures d'exposition des cellules aux nanoparticules
- à une concentration fixe (5 mM en argent ou bismuth) mais à des temps d'exposition variant de 0 à 72 heures

Les résultats démontrent que les nanoparticules d'argent sont significativement plus cytotoxiques que les nanoparticules de bismuth métallique à une concentration élevée (à partir de 2,5 mM pour les cellules HT29, A549 et à partir de 5 mM pour les cellules THP1) (Figure 130).



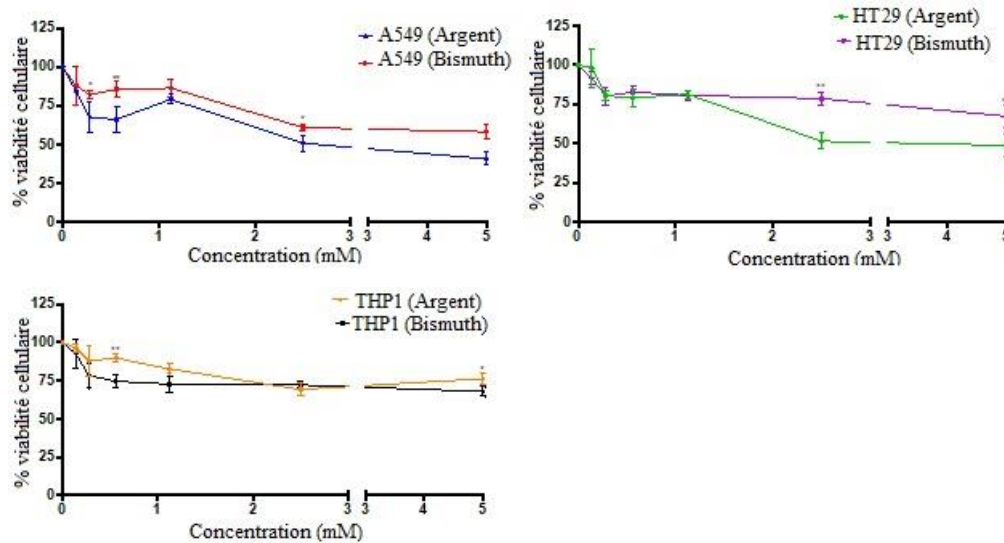


Figure 130: Viabilité cellulaire évaluée par un test MTT sur des cellules A549 (a), HT29 (b), THP1 (c) à différentes concentrations de nanoparticules d'argent ou de bismuth (0-5 mM) après 48 heures. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SD de 3 expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA et le test de Duncan. Les symboles \* ou \*\* représentent les différences statistiques par rapport à 0 mM dans les groupes argent ou bismuth. \*  $p < 0,01$  et \*\*  $p < 0,001$ .

La viabilité cellulaire des trois lignées cellulaires exposées à des nanoparticules d'argent ou de bismuth à 5 mM pendant différents temps a également été évaluée. Les dosages de la LDH ont montré que les nanoparticules de bismuth étaient moins cytotoxiques que les nanoparticules d'argent. On observe une diminution significative de la viabilité cellulaire uniquement à partir de 72 heures d'exposition pour les lignées cellulaires THP1 et HTT29 (Figure 131). A contrario, les nanoparticules de bismuth n'ont pas d'effet sur la viabilité des cellules A549.



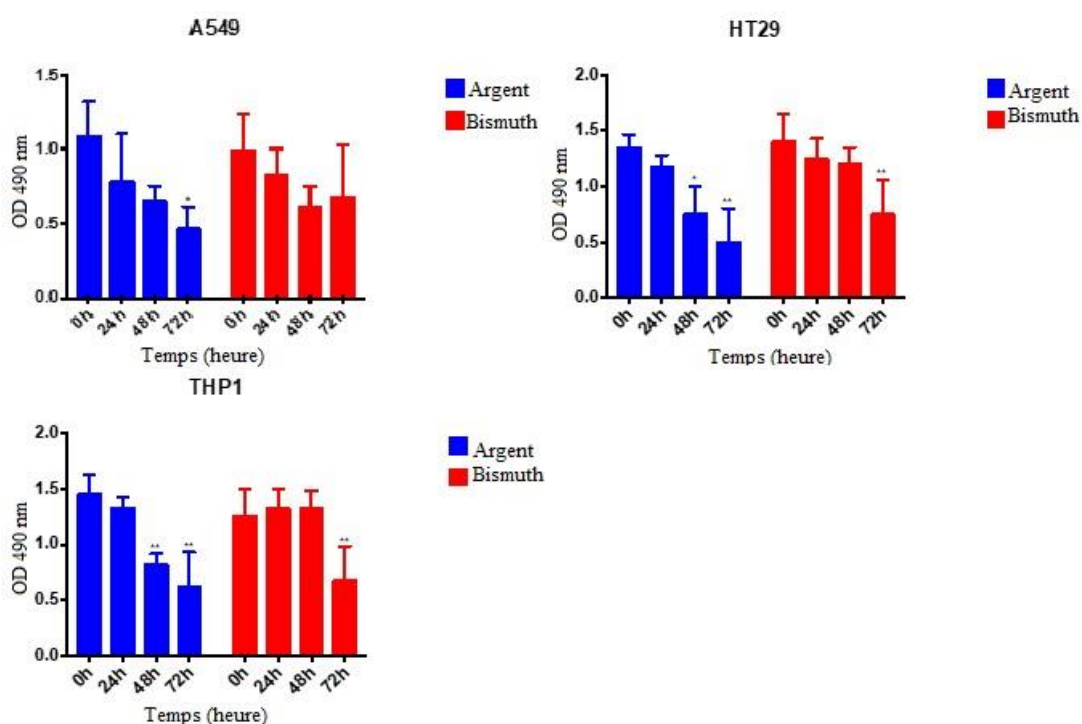


Figure 131: Viabilité cellulaire évaluée par dosage de la LDH sur des cellules A549 (a), HT29 (b), THP1 (c) après une exposition de 5 mM de nanoparticules d'argent ou de bismuth pendant différents temps (0, 24, 48 ou 72 heures). Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SD de 3 expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA et le test de multicomparaison de Tukey. Les symboles \* ou \*\* représentent des différences statistiques par rapport à 0h dans les groupes Argent ou Bismuth. \*  $p < 0,01$  et \*\*  $p < 0,001$

## 2 Evaluation des effets radiosensibilisants

### 2.1 Introduction

Les travaux sur la radiosensibilisation des nanoparticules de bismuth métallique ont été réalisés dans le Laboratoire de Chimie Physique (LCP) de Paris Sud, sous la supervision des docteurs Emilie Brun et Cécile Sicard. Certaines notions de la chimie sous rayonnement telles que la dose, le débit de dose et le rendement radiolytique doivent être expliqués en préambule afin d'analyser nos résultats.

#### 2.1.1 Notions et unités utilisées en chimie sous rayonnement

L'étude et la quantification des phénomènes chimiques sous rayonnement exigent de définir trois grandeurs.



- La dose est la grandeur mesurant la quantité d'énergie absorbée par un milieu irradié exprimé en Gray (Gy) qui correspond à  $1 \text{ J.kg}^{-1}$ .
- Le débit de dose est la dose absorbée par unité de temps en  $\text{Gy.s}^{-1}$ .
- Le rendement radiolytique est la quantité d'une espèce chimique produite ou consommée par unité déposée ( $\text{mol J}^{-1}$ ).

Dans notre étude, la production de radicaux hydroxyles par un rayonnement gamma de 1,2 MeV sera quantifiée.

### 2.1.2 Radiolyse de l'eau

Le corps humain est constitué d'environ 65% d'eau. La radiolyse de l'eau, induite par des rayonnements, produit des espèces très réactives qui provoquent des dommages irréversibles pouvant conduire à la mort cellulaire. Pour envisager des applications biologiques en présence de rayonnements, il est donc primordial de comprendre le phénomène de radiolyse de l'eau au sein de l'organisme. Ce mécanisme peut être divisé en trois étapes : une étape physique, une étape physico-chimique et une étape chimique (Figure 132).

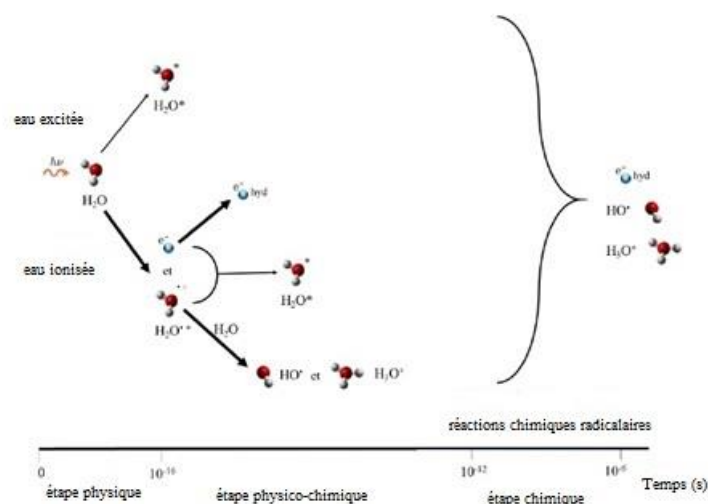


Figure 132: Les différentes étapes de la radiolyse de l'eau (les voies réactionnelles majeures sont décrites par des flèches épaisses).

#### 2.1.2.1 Étape physique

Lors de l'interaction du rayonnement avec les molécules d'eau, ces dernières passent de l'état fondamental à l'état excité (excitation) ou alors elles émettent un électron (ionisation). Cet électron émis possède une énergie de 9 eV et peut lui aussi provoquer d'autres ionisations.<sup>184</sup> Cette étape dure  $10^{-16}$  secondes post rayonnement.



### 2.1.2.2 Étape physico-chimique

Plusieurs réactions en cascade se déroulent lors de cette étape physico-chimique et durent de  $10^{-16}$  à  $10^{-12}$  secondes post rayonnement.

A l'état excité, les molécules d'eau ( $\text{H}_2\text{O}^*$ ) se dissocient en formant des radicaux libres. Néanmoins ce mécanisme contribue peu à la formation de radicaux. La production, de loin, la plus importante de radicaux provient des réactions entre l'eau et les molécules d'eau ionisées (Schéma 59).

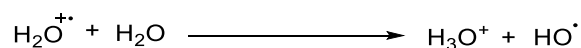


Schéma 59: Etape physicochimique de la radiolyse de l'eau

Quant aux électrons émis par l'eau ionisée, ils ne réagissent pas directement avec l'eau mais peuvent soit donner leur énergie *via* des processus d'excitation ou d'ionisation ou alors se thermaliser afin de se stabiliser par hydratation.

### 2.1.2.3 Étape chimique

Entre  $10^{-12}$  secondes et  $10^{-9}$  secondes post rayonnement, des réactions chimiques se déroulent en produisant une forte concentration locale de radicaux. Ces espèces radicalaires vont ensuite diffuser dans le milieu réactionnel pour atteindre une concentration homogène. C'est à partir de cette étape que la concentration en radicaux peut être mesurée.<sup>185</sup>

### 2.1.2.4 Le radical hydroxyle

Dans ce travail, nous avons évalué l'influence de nos nanoparticules de bismuth sur la production du radical hydroxyle après rayonnement. En effet, ce radical est connu comme étant la principale source d'altération de l'ADN lors d'une exposition d'un organisme vivant à un rayonnement gamma.<sup>186</sup> D'un point de vue chimique, le radical hydroxyle est l'espèce la plus oxydante de tous les produits de décomposition de l'eau et il réagit avec la plupart des substrats organiques à une vitesse de réaction très élevée.<sup>187</sup> Sa durée de vie en solution est de l'ordre de  $10^{-6}$  secondes et son parcours moyen est estimé à quelques nanomètres dans l'eau.<sup>188,189</sup> Dès lors, sa production est détectée de façon indirecte.



### 2.1.3 Détection indirecte du radical hydroxyle par la coumarine

Pour détecter le radical hydroxyle, nous avons utilisé un protocole mis au point par l'équipe du LCP.<sup>190</sup> Ce protocole se base sur la capacité de la coumarine à capter les radicaux hydroxyles afin de former différentes hydroxycoumarines (Schéma 60).

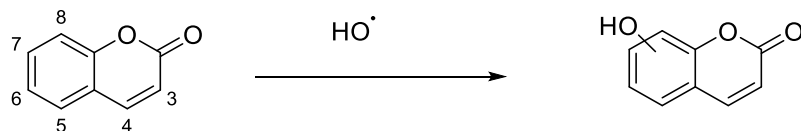


Schéma 60: Réaction des radicaux hydroxyles avec l'hydroxycoumarine

Parmi toutes les hydroxycoumarines formées, seule la 7-hydroxycoumarine a des propriétés de fluorescence. C'est donc cette espèce qui est dosée par fluorimétrie.

### 2.1.4 Irradiation des échantillons

Dans un premier temps, nous allons décrire les différentes étapes du protocole ont été détaillés à savoir l'irradiation par le rayonnement  $\gamma$ , la dosimétrie et la fluorimétrie puis dans un second temps, les résultats ont été discutés.

#### 2.1.4.1 Rayonnement gamma

Les irradiations *via* des rayons gamma ont été réalisées en utilisant une source continue de  $^{60}\text{Co}$ . Cet élément chimique se désintègre en  $^{60}\text{Ni}$  par l'émission d'un électron et de deux photons gamma (1,17 et 1,33 MeV). La source est équipée d'une table d'irradiation panoramique qui permet d'exposer plusieurs échantillons à la fois. Par conséquent, le débit de dose est influencé par la position de chaque échantillon autour de la source. Ainsi, une dosimétrie est effectuée pour chaque position afin de connaître la dose absorbée par l'échantillon à sa position propre (Figure 133). A titre d'exemple, les échantillons aux positions B1, C2 et F3 reçoivent des doses différentes.



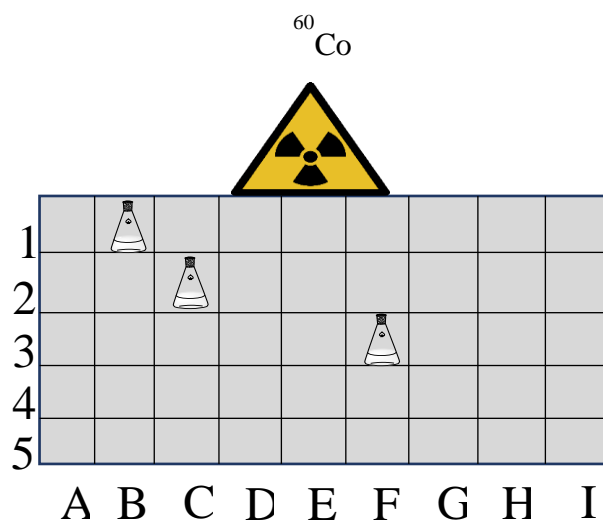


Figure 133: Table panoramique autour de la source de Cobalt 60.

#### 2.1.4.2 Dosimétrie

La dosimétrie de Fricke est effectuée pour évaluer le débit de dose à une position précise sur la table d'irradiation. Cette expérience consiste à doser par spectroscopie UV-Visible l'oxydation d'un sel ferreux en sel ferrique en fonction du temps d'irradiation pour chaque position comme illustré dans la figure 133. Pour tenir compte de l'auto oxydation des espèces, la différence d'absorbance entre l'échantillon irradié et non irradié est mesurée. La pente de la régression linéaire de cette différence d'absorbance correspond aux débits de dose pour chaque position. A titre d'exemple, pour les positions B1, C2 et F3 sur la table d'irradiation représentée dans la figure 134, les débits de dose sont de 3,5 Gy/min, de 3,4 Gy/min et de 2,8 Gy/min respectivement.



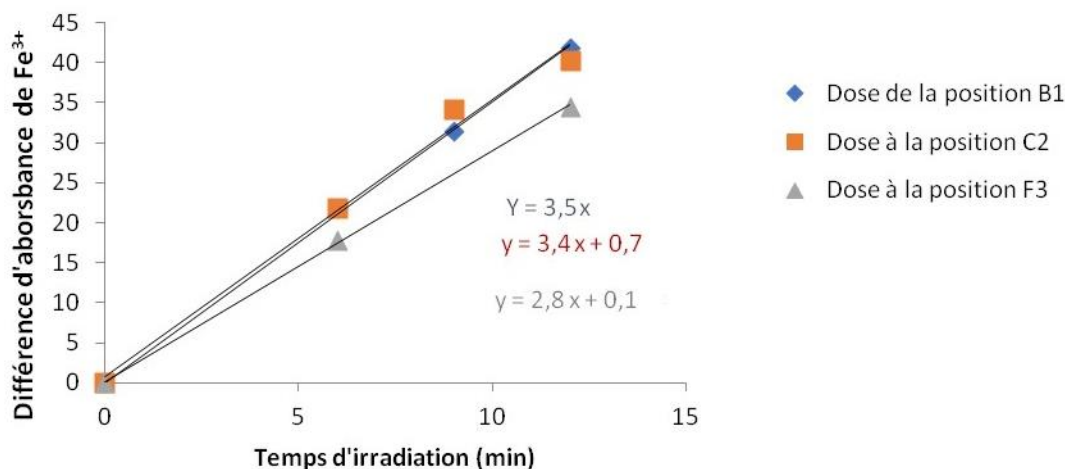


Figure 134 : Différence d'absorbance de  $\text{Fe}^{3+}$  avant et après l'irradiation en fonction du temps d'irradiation et selon les positions.

#### 2.1.4.3 Fluorimétrie de la 7-hydroxycoumarine

La présence de nanoparticules métalliques en solution interfère avec la fluorescence des molécules.<sup>191</sup> Par conséquent, il faut s'affranchir de ces interférences afin de quantifier la 7-hydroxycoumarine par fluorescence. Un protocole déjà utilisé dans le laboratoire LCP permet de s'en affranchir en augmentant la force ionique de la solution après l'irradiation à l'aide de fortes concentrations de NaCl. Cet ajout de sel provoque une sédimentation des nanoparticules qui sont alors séparées de la solution par un cycle de centrifugation. L'intensité de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine formée lors de l'irradiation est mesurée avec un fluorimètre à lecteur de plaque. Cette mesure de fluorescence permet d'accéder à la concentration en 7-hydroxycoumarine à l'aide d'une droite d'étalonnage réalisée à chaque expérience en présence d'une concentration de 0,5 M de coumarine (Tableau 69).

$I_{\text{fluorescence à 452 nm}}$	Droite d'étalonnage		[7-hydroxycoumarine] (nM)
665			10,0
1170			17,6
1918			28,9
2443			36,8
2888			43,5
3593			54,2

Tableau 69: Conversion de l'intensité de fluorescence en concentration de 7-hydroxycoumarine à l'aide d'une droite d'étalonnage.



A l'issue de ces mesures, le graphe représentant la concentration en 7-hydroxycoumarine en fonction de la dose d'irradiation peut être réalisé. Il permet ensuite de déterminer le rendement radiolytique pour une concentration en bismuth donnée à l'aide de la pente de la régression linéaire (Figure 135).

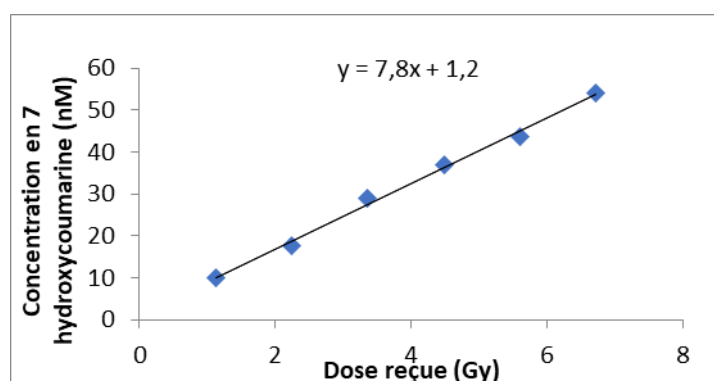


Figure 135: Concentration en 7-hydroxycoumarine formée en fonction de la dose reçue pour une concentration de 5  $\mu$ M en bismuth.

A titre d'exemple dans la figure 135, le rendement radiolytique de la 7-hydroxycoumarine est de 7,8 nmol/J pour une concentration de 5  $\mu$ M en bismuth.

#### 2.1.4.4 Récapitulatif des étapes pour obtenir le rendement radiolytique.

Les différentes étapes permettant d'obtenir le rendement radiolytique de la 7-hydroxycoumarine sont illustrées dans la figure 136 ci-dessous. Ainsi, ce rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine est déterminé à partir de l'intensité de fluorescence en fonction du temps d'irradiation à une concentration en bismuth fixée. Les expériences sont répétées pour différentes concentrations en bismuth.



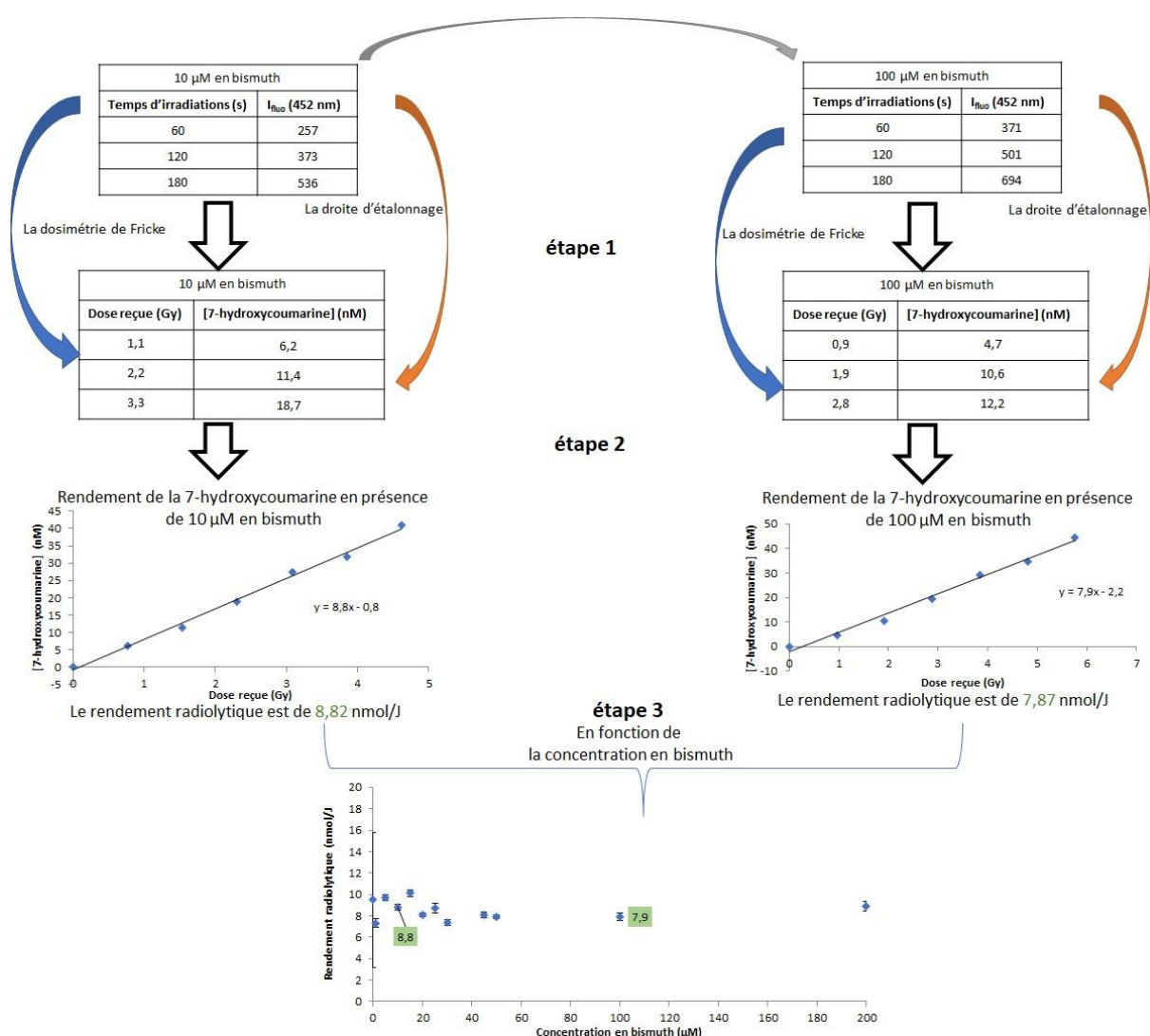


Figure 136: Récapitulatif des étapes pour obtenir le rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine à partir des données de fluorescence selon le temps d'irradiation de l'échantillon à différentes concentrations en bismuth.

La première étape est la conversion du temps d'irradiation en dose reçue par échantillon à l'aide de la dosimétrie de Fricke. Ensuite, l'intensité de fluorescence de la 7-hydroxycoumarine est convertie en concentration de 7-hydroxycoumarine en utilisant la droite d'étalonnage effectuée pour chaque expérience (Figure 136, étape 1).

La valeur du rendement radiolytique pour une concentration donnée en bismuth est alors obtenue par la pente de la régression linéaire du graphe représentant la concentration en 7 hydroxycoumarine formée en fonction de la dose reçue (Figure 136, étape 2).



Afin d'observer l'effet radiosensibilisant en fonction de la concentration en bismuth, la dernière étape consiste d'effectuer un graphe du rendement radiolytique en fonction de la concentration en bismuth (Figure 136, étape 3).

## 2.2 Les nanoparticules revêtues de citrate

Seules les nanoparticules revêtues de citrate et synthétisées en procédé flux continu ont été testées (Chapitre 2). Les autres nanoparticules (AL-PEG<sub>750</sub>-OMe) et les émulsions n'ont pas pu être évaluées par manque de temps. Pour rappel, la synthèse est illustrée dans le schéma ci-dessous.

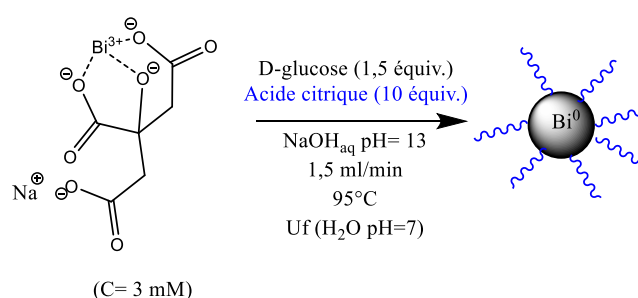


Schéma 61: Obtention des nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate par le procédé en continu.

### 2.2.1 Irradiation des nanoparticules revêtues de citrate formulées à pH=7

La première expérience consiste à irradier avec un rayonnement gamma des nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate à différentes concentrations en bismuth (de 0 à 200  $\mu\text{M}$ ) en présence d'une concentration de 0,5 M de coumarine. Ces nanoparticules sont initialement redispersées à pH=7. Les résultats sont reportés sur la Figure 137.

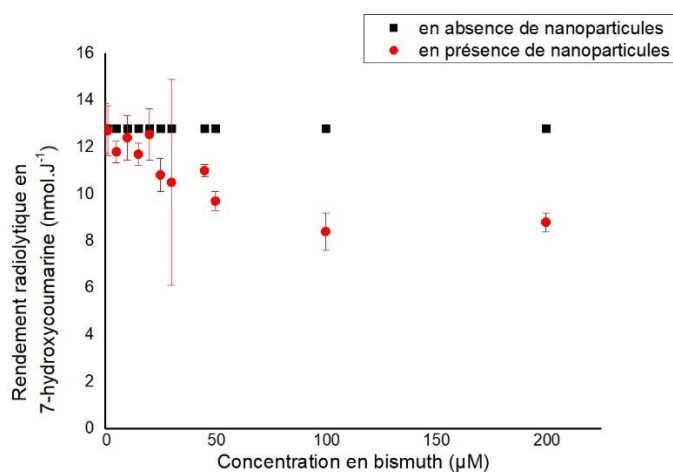


Figure 137: Rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine en présence de nanoparticules de bismuth métallique.



En absence de nanoparticules, le rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine est de 12,8 nmol/J alors qu'en présence de nanoparticules, le rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine diminue jusqu'à 8,4 nmol/J pour des concentrations croissantes de nanoparticules. Ces résultats montrent que la coumarine capte moins de radicaux en présence de nanoparticules de bismuth métallique.

Ce résultat inattendu pourrait être expliqué par la dégradation des nanoparticules sous irradiation. Afin de valider cette hypothèse, nous avons comparé les caractéristiques des nanoparticules avant et après irradiation.

### 2.2.1.1 Caractérisations des nanoparticules

Afin de montrer la dégradation éventuelle des nanoparticules lors de l'irradiation, un lot de nanoparticules plus concentré a été irradié à une dose plus élevée en gardant constant le rapport de la concentration en bismuth et de la dose délivrée.

#### 2.2.1.1.1 Diamètre en DLS

Le diamètre a été mesuré avant et après l'irradiation, les résultats sont présentés dans le tableau 70.

	Diamètres (nm) en nombre (proportion %)
Nanoparticules avant l'irradiation	55±25 (100%)
Nanoparticules après l'irradiation	45±18 (100%)

Tableau 70 : Diamètres des nanoparticules en DLS avant et après l'irradiation à pH=7.

Les résultats montrent que la variation du diamètre avant/après l'irradiation ne permet pas de conclure de façon certaine sur la diminution de la taille des nanoparticules après l'irradiation. D'autres techniques de caractérisation que la DLS sont nécessaires.

#### 2.2.1.1.2 Spectroscopie UV-Visible

Un spectre UV-Visible a été réalisé avant et après l'irradiation, les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 138).



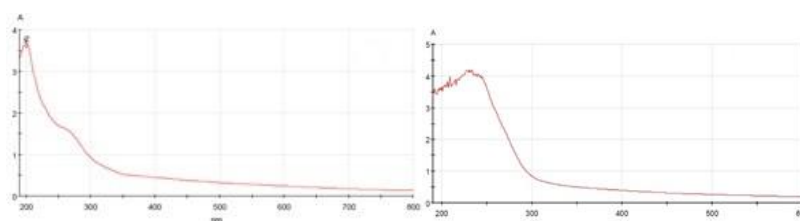


Figure 138: Spectre UV-visible des nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate avant (à gauche) et après l'irradiation à pH=7 (à droite).

En comparant les spectres UV-visibles des nanoparticules avant et après l'irradiation, on remarque la disparition de la bande plasmonique à 268 nm et l'apparition d'une autre bande centrée à 240 nm.

#### 2.2.1.1.3 Spectroscopie infrarouge

Un spectre infrarouge a été réalisé avant et après l'irradiation, les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 139).

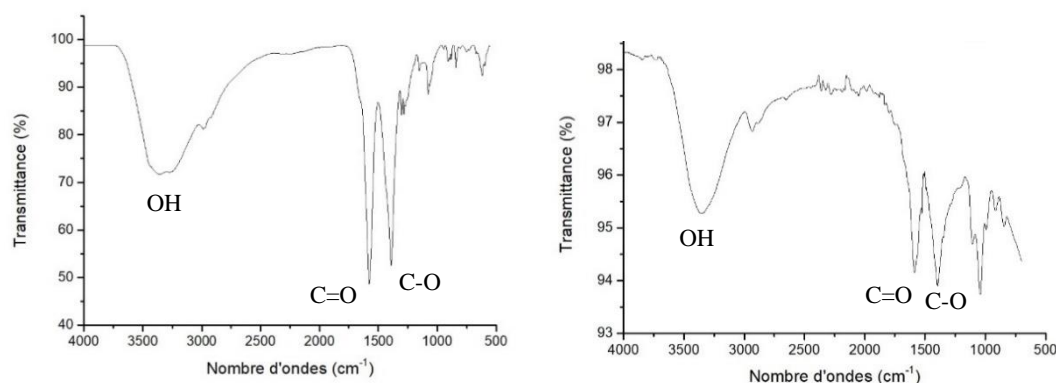


Figure 139: Spectres infrarouges des nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate avant (à gauche) et après l'irradiation à pH=7 (à droite).

Les deux spectres comportent les mêmes bandes. Néanmoins, les intensités relatives de ces bandes sont différentes. Pour confirmer cette différence d'intensité, une superposition des deux spectres infrarouges provenant de deux solutions de nanoparticules à 3 mM avant et après l'irradiation a été effectuée (Figure 140).



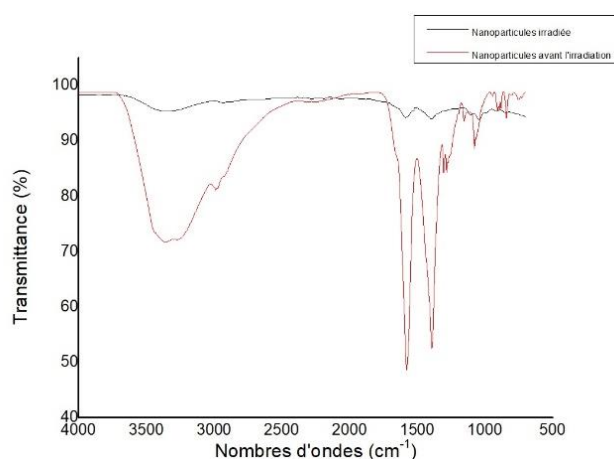


Figure 140: Superposition des spectres IR avant et après l'irradiation.

La superposition des spectres infrarouges permet d'observer une diminution de la quantité d'agents de revêtement citrate sur la nanoparticule après l'irradiation.

#### 2.2.1.1.4 Mesure du pH

Ce résultat peut s'expliquer par la décomposition du citrate en présence de radicaux hydroxyles. Dans la littérature, une étude a montré que le citrate subissait une décarboxylation en présence du radical hydroxyle pour donner, l'hydroxo-glutarate puis l'oxo-glutarate. Ce dernier composé n'est pas stable et se décompose en acétone et en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) (Schéma 62).<sup>192</sup>

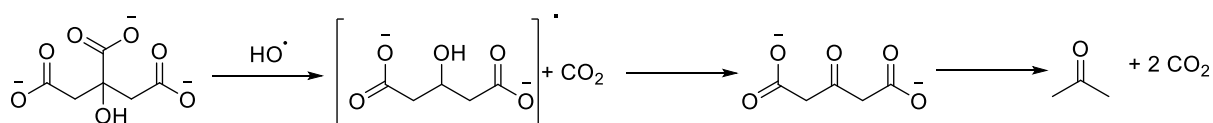


Schéma 62 : Réaction de l'oxydation du citrate en acétone.

Lors de cette cascade de réaction, le citrate libère trois molécules de CO<sub>2</sub> ce qui provoque une acidification du milieu réactionnel. Pour valider cette interprétation, une mesure du pH des solutions suivantes avant et après l'irradiation a été effectuée (Tableau 71) :

- Solution contenant 3 mM de nanoparticules
- Solution contenant 300 µM de citrate (concentration approximative de citrate dans la solution de nanoparticules)
- Eau (effet de la radiolyse de l'eau)



Solutions	pH mesuré
Nanoparticules avant l'irradiation	7,0
Nanoparticules après l'irradiation	5,5
Citrate avant l'irradiation	6,9
Citrate après l'irradiation	5,5
Eau avant l'irradiation	7,1
Eau après l'irradiation	7,0

Tableau 71 : Détermination du pH des différentes solutions avant et après l'irradiation.

La diminution de pH est plus importante en présence de nanoparticules ou de citrate alors que l'irradiation seule n'a pas d'effet sur le pH. Cela conforte l'hypothèse d'une décomposition du citrate par les radicaux hydroxyles et une dégradation des nanoparticules de bismuth métallique en Bi(III) à ce pH (la dégradation chimique des nanoparticules à pH=5 a été étudiée dans le chapitre 2).

#### 2.2.1.1.5 Test colorimétrique qualitatif

Pour valider une décomposition chimique des nanoparticules en Bi(III) post irradiation, un test qualitatif colorimétrique a été réalisé avant/après l'irradiation. Il consiste à rajouter une goutte de dithizone dans la solution. La coloration rouge indique que la dithizone est complexée au Bi (III) (test positif), par contre, la coloration bleue signifie que la dithizone n'est pas complexée au Bi (III) (test négatif). Les résultats sont présentés ci-dessous (Tableau 72).

Présence de Bi(III) avant l'irradiation	Négatif
Présence de Bi(III) après l'irradiation	Positif

Tableau 72 : Résultats du test de colorimétrie sur une solution de nanoparticules de bismuth métallique

Ce test confirme bien que les nanoparticules de bismuth métallique se dégradent pendant l'irradiation en libérant des ions Bi(III).

#### 2.2.1.2 Conclusion des essais d'irradiation à pH=7

L'interprétation des résultats que nous proposons est la suivante. Le citrate, utilisé comme agent de revêtement, se décompose par décarboxylation en présence des radicaux hydroxyles produits lors de l'irradiation ce qui provoque une diminution du pH. Cette variation



(acidification) du pH induit la dégradation des nanoparticules aboutissant à la libération d'ions Bi(III) en solution.

Pour éviter que la variation de pH induite par la décomposition du citrate ne conduise pas à des  $\text{pH} < 7$  et ainsi éviter la dégradation des nanoparticules, nous avons effectué l'irradiation des nanoparticules revêtues de citrate formulées à  $\text{pH}=10$ .

### 2.2.2 Irradiation des nanoparticules revêtues de citrate formulées à $\text{pH}=10$

Cette deuxième expérience consiste à irradier avec un rayonnement gamma des nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate à différentes concentrations en bismuth (de 0 à 200  $\mu\text{M}$ ) et en présence d'une concentration de coumarine à 0,5 M. Ces nanoparticules sont initialement formulées à  $\text{pH}=10$ . L'ajustement du pH a été effectué en ajoutant du NaOH 1 M. Les résultats sont portés sur un graphique montrant le rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine en fonction de la concentration en bismuth (Figure 141).

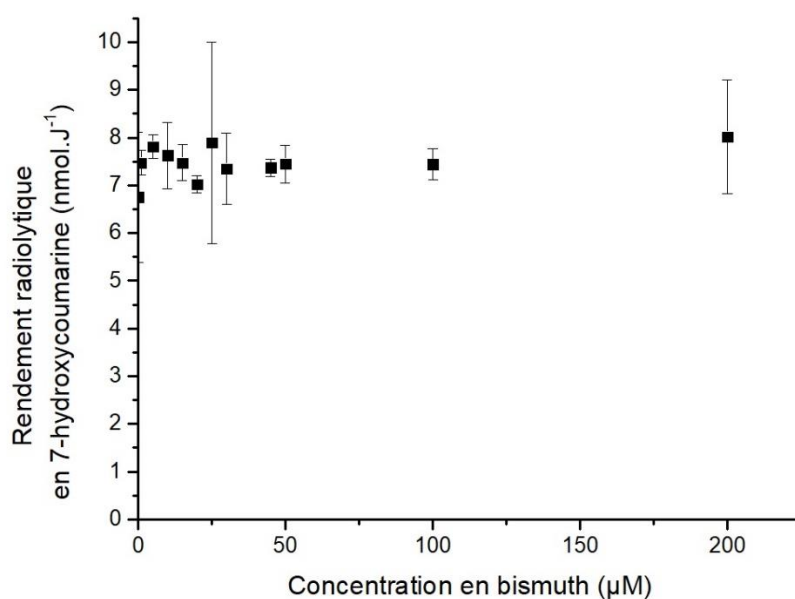


Figure 141: Rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine en présence de nanoparticules de bismuth métallique.

Le rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine, en absence de nanoparticules, est de 6,7 nmol/J alors qu'en présence de nanoparticules, le rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine ne dépasse pas la valeur de 8,0 nmol/J. Compte tenu de la variabilité des résultats, cette différence de rendement radiolytique n'est pas significative et ne permet pas



d'affirmer que les nanoparticules surproduisent des radicaux hydroxyles. Comme précédemment, une hypothèse plausible pour expliciter ce résultat est que le citrate capte les radicaux formés en présence de nanoparticules. Pour étudier cette hypothèse, les nanoparticules ont été caractérisées avant/après irradiation comme précédemment.

### 2.2.2.1 Caractérisations des nanoparticules

Afin de montrer la dégradation éventuelle des nanoparticules lors de l'irradiation, un lot de nanoparticules plus concentrées a été irradié à une dose plus élevée en gardant constant le rapport de la concentration en bismuth et de la dose délivrée.

#### 2.2.2.1.1 Diamètre en DLS

Le diamètre a été mesuré avant et après l'irradiation, les résultats sont présentés dans le tableau 73.

	Diamètres (nm) en nombre (proportion %)
Nanoparticules avant l'irradiation	$52 \pm 16 (100\%)$
Nanoparticules après l'irradiation	$44 \pm 12 (100\%)$

Tableau 73 : Diamètres des nanoparticules avant et après l'irradiation à pH=10.

Les résultats montrent que la variation du diamètre avant/après l'irradiation ne permet pas de conclure de façon certaine sur la diminution du diamètre des nanoparticules après l'irradiation. D'autres techniques de caractérisation que la DLS sont nécessaires.

#### 2.2.2.1.2 Spectroscopie UV-Visible

Un spectre UV-Visible a été réalisé avant/après l'irradiation, les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 142).

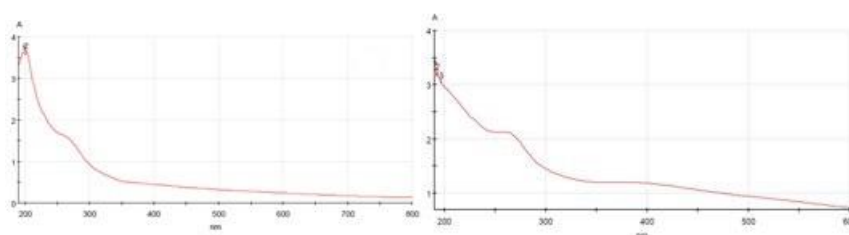


Figure 142 : Spectre UV-visible des nanoparticules revêtues de citrate formulées à pH=10 avant (à gauche) et après l'irradiation (à droite).



En comparant les deux spectres UV-Visible, une différence est visible entre les deux spectres. Pour mieux s'en apercevoir, la superposition des spectres UV-Visible a été effectuée (Figure 143).

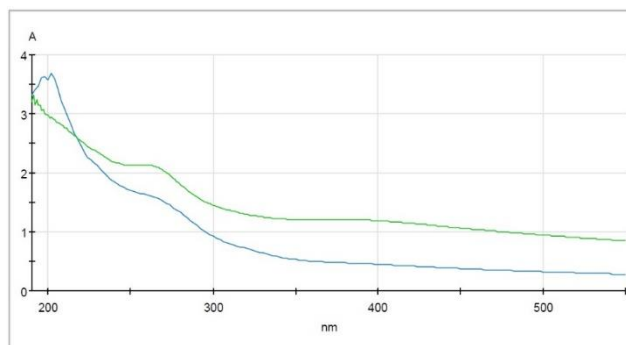


Figure 143: Comparaison des courbes UV-visible des nanoparticules revêtues de citrate formulées à pH=10 avant (en bleu) et après (en vert) l'irradiation.

D'après la superposition des courbes UV-visible, un déplacement du plasmon de 5 nm est observé. Ce déplacement pourrait être expliqué par une faible diminution du diamètre des nanoparticules.

#### 2.2.2.1.3 Mesures de pH

Afin de démontrer la captation des radicaux par le citrate et sa décomposition *via* une décarboxylation, des mesures de pH avant et après l'irradiation des solutions suivantes ont été réalisées (Tableau 74) :

- Solution contenant 3 mM de nanoparticules
- Solution contenant 300  $\mu$ M de citrate (concentration approximative de citrate dans la solution de nanoparticules)
- Eau (effet de la radiolyse de l'eau)

Solutions	pH
Nanoparticules avant l'irradiation	10,0
Nanoparticules après l'irradiation	8,3
Citrate avant l'irradiation	10,4
Citrate après l'irradiation	8,7
Eau avant l'irradiation	10,0
Eau après l'irradiation	9,9

Tableau 74 : Détermination du pH des différentes solutions avant et après l'irradiation.



Comme attendu, la variation de pH est plus importante en présence de nanoparticules ou de citrate en comparaison à l'effet de la seule radiolyse de l'eau. La variation de pH de la solution contenant les nanoparticules est importante. Néanmoins, le pH final est suffisamment basique pour ne pas provoquer une décomposition chimique des nanoparticules d'après nos études de stabilité (Chapitre 2). Un test de colorimétrie a quand même été effectué pour confirmer ce point.

### 2.2.2.1.4 Test colorimétrie qualitatif sur la présence de Bi(III)

Un test colorimétrie qualitatif à la dithizone a été réalisé avant et après l'irradiation pour observer une éventuelle dégradation des nanoparticules en Bi(III). (Tableau 75).

Présence de Bi(III) avant l'irradiation	Négatif
Présence de Bi(III) après l'irradiation	Négatif

*Tableau 75 : Résultats du test de colorimétrie des nanoparticules.*

Le test est négatif dans les deux cas. Les nanoparticules ne se dégradent pas en Bi(III) lors de l'irradiation car le pH reste assez basique pour ne pas provoquer cette dégradation.

### 2.2.2.2 Conclusion sur les essais d'irradiation à pH=10

Ces expériences démontrent qu'il n'y a pas de dégradation des nanoparticules formulées à pH=10 en Bi(III) et que les radicaux hydroxyles sont captés probablement par l'agent de revêtement citrate. Pour confirmer ce dernier point, une expérience d'irradiation du complexe de citrate de bismuth et de sodium dans les mêmes conditions a été réalisée.

### 2.2.3 Irradiation du complexe de citrate de bismuth et de sodium à pH=10

Cette dernière expérience consiste à irradier sous rayonnement gamma différentes concentrations du complexe citrate de bismuth et de sodium formulé à pH=10 en présence d'une concentration de coumarine à 0,5 M. L'ajustement du pH a été effectué par l'ajout de NaOH (1 M). Les résultats sont portés sur le graphique en montrant le rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine en fonction de la concentration en bismuth (Figure 144).



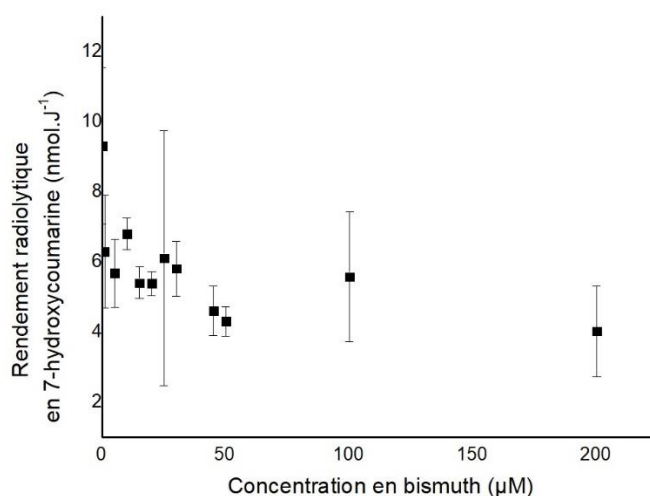


Figure 144 : Rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine en présence de citrate de bismuth et de sodium.

La figure 144 montre que la coumarine capte moins de radicaux en présence du complexe. En effet, en absence de complexe, le rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine est de 9,5 nmol/J alors qu'en présence de citrate de bismuth et de sodium, le rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine diminue jusqu'à 4,0 nmol/J. Comme discuté ci-dessus, ceci peut s'expliquer par une décomposition du citrate en présence de radicaux hydroxyles.

### 3 Conclusion

Dans cette partie, la quantification des radicaux hydroxyles a été réalisée afin de montrer un éventuel effet radiosensibilisant des nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate. L'expérience consistait à irradier à différentes concentrations de nanoparticules à l'aide d'un rayonnement gamma et de mesurer le rendement radiolytique en 7-hydroxycoumarine.

Lors de notre expérience à pH=7, une compétition de captation des radicaux a été mise en évidence entre la coumarine et l'agent de revêtement citrate. Cette captation par le citrate provoque une diminution de pH et par conséquent, une dégradation des nanoparticules. Pour éviter ce phénomène, l'expérience a été réalisée à pH=10. Nous avons montré alors que la compétition de captation était toujours présente, cependant, les nanoparticules ne se dégradaient pas.

L'effet radiosensibilisant des nanoparticules de bismuth métallique revêtues de citrate n'est donc pas démontré avec les expériences que nous avons menées. Afin de conclure, des expériences supplémentaires seront à mener *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, les expériences



consisteront à déterminer le pourcentage de survie cellulaire post irradiation en présence de nanoparticules. *In vivo*, les nanoparticules seront injectées par voie intratumorale et un suivi de la taille de la tumeur sera effectué après chaque irradiation pour observer un effet radiosensibilisant en comparant à des contrôles.











# Conclusion générale







## Conclusion générale

Ce travail de thèse s'est inscrit dans un contexte de valorisation des nanoparticules de bismuth métallique en tant que potentiels radiosensibilisateurs pour la radiothérapie externe. Trois ans auparavant, cet aspect était peu décrit mais depuis 2016, six publications ont confirmé ce potentiel *via* des études précliniques.<sup>58,63,67,81,124,125</sup>

Plusieurs objectifs successifs ont rythmé ce travail de thèse :

- La synthèse de nanoparticules de bismuth métallique dans des conditions vertes et leur caractérisation.
- L'élaboration d'un procédé productif en continu de nanoparticules.
- La conception de nanoparticules avec différents ligands pour accéder à des nanoobjets avec des propriétés hydrophiles ou hydrophobes ou fluorophiles.
- La stabilisation des nanoparticules hydrophiles dans le sérum physiologique.
- La formulation des nanoparticules hydrophobes ou fluorophiles dans des émulsions.
- La quantification de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules de bismuth métallique.

La première étape de ce travail a consisté à développer et fiabiliser la synthèse des nanoparticules de bismuth métallique par un procédé non continu en appliquant les six principes de la nanochimie verte. Après analyse de la littérature, une nouvelle synthèse verte et originale a été proposée avec l'eau comme solvant. Le citrate de bismuth et de sodium comme précurseur et le D-glucose en tant que réducteur vert ont été choisis car soluble dans l'eau. L'utilisation de l'eau et du D-glucose ont permis de suivre la conversion du Bi(III) en Bi(0) en mesurant la diminution du pH, Cette méthode n'a jamais été utilisée dans la littérature. Une comparaison des différents modes de chauffage et de la vitesse de conversion on pu aussi être obtenu grâce à la mesure du pH. Après la mise au point des conditions de synthèse verte, la purification a été étudiée car elle peut induire une déstabilisation des nanoparticules si le pH de la solution n'est pas contrôlé. Dans la littérature, les nanoparticules sont purifiées généralement par centrifugation. Dans une optique de montée en échelle, la technologie d'ultrafiltration a été sélectionnée pour purifier les nanoparticules. Après optimisation des paramètres de synthèse et de purification, nous avons démontré la reproductibilité de nos conditions expérimentales vertes (Chapitre 1).

Dans un second temps, nous avons transposé cette synthèse initiale en procédé non continu sous irradiation microonde en procédé continu afin d'améliorer la productivité. Le premier procédé au laboratoire a été développé en procédé continu sous irradiation microondes. Pour ce faire, un réacteur en téflon a été usiné puis inséré dans la cavité du microonde. Le passage



## Conclusion générale

en procédé continu a nécessité de modifier les conditions initiales de synthèse pour éviter les phénomènes d'emballement et protéger le matériel utilisé. Moyennant ces modifications, nous avons obtenus des nanoparticules de bismuth métallique de diamètre plus faible en TEM et DLS en comparaison au procédé non continu (Chapitre 2). Partant du principe que les échanges de chaleur et de masse sont rapides en flux continu, nous avons testé des conditions de procédé continu sous chauffage conventionnel thermique. Les nanoparticules obtenues ont été identiques en diamètre à celles obtenues en procédé continu sous irradiation microonde. Ce deuxième procédé continu a permis de simplifier la mise en œuvre du protocole et de produire une quantité plus importante de nanoparticules de façon reproductible.

Pour continuer cette démarche d'amélioration de la productivité, tout en assurant une reproductibilité des caractéristiques des nanoparticules obtenues, nous élaborons actuellement un montage expérimental en flux continu utilisant une pompe péristaltique et permettant potentiellement d'améliorer les débits d'un facteur trois (Figure 148). L'optimisation des résultats de ce nouveau système en flux continu se fera *via* la méthodologie des plans d'expériences. Ce développement s'accompagnera aussi de la mise à l'échelle de l'étape d'ultrafiltration à l'aide du matériel Pall.



Figure 145: Procédé en continu à haut débit

Les nanoparticules synthétisées en procédé flux continu sous chauffage thermique conventionnel ont été caractérisées par des techniques permettant de confirmer leurs diamètres (TEM, DLS), la nature de leur surface (potentiel zêta, infrarouge, UV-Visible, XPS) et la stabilité chimique. Une étude DOSY a aussi montré que l'agent de revêtement citrate était adsorbé faiblement à la surface des nanoparticules.

Après de stabiliser et fonctionnaliser nos nanoparticules en vue de les utiliser dans différentes applications, une stratégie d'échange de ligands a été développée. A notre connaissance, aucun ligand organique n'est connu pour avoir une forte interaction avec la surface des nanoparticules de bismuth métallique. De ce fait, plusieurs ligands ont été testés et le meilleur résultat a été obtenu avec le (*R*)-lipoate de sodium en termes de stabilité colloïdale à pH=7.



## Conclusion générale

Grâce à plusieurs techniques (spectroscopie UV-Visible, TGA, infrarouge) les nanoparticules revêtues de (*R*)-lipoate de sodium ont été caractérisées et l'échange complet a été mis en évidence entre le citrate et le dérivé de l'acide (*R*)-lipoïque. La forte interaction du (*R*)-lipoate de sodium avec la surface des nanoparticules a été également déterminée par une étude DOSY. A notre connaissance, la démonstration expérimentale d'un échange total de ligand par des nanoparticules de bismuth n'a jamais été décrite.

Ces nanoparticules ont ensuite été fonctionnalisées pour modifier la physicochimie de leur surface. Pour ce faire, l'acide (*R*)-lipoïque a été couplé avec différents PEG de longueurs variables, des chaînes hydrophobes ou polyfluorées. Ces différents agents de revêtements ont permis d'accéder à des nanoparticules hydrophiles, hydrophobes ou fluorophiles. Nous avons caractérisé ces nouvelles nanoparticules par des techniques permettant de confirmer leurs diamètres (TEM, DLS) et la nature de leur surface (potentiel zêta, IR, spectroscopie UV-Visible). Les nanoparticules hydrophiles revêtues de PEG<sub>750</sub> ont montré une stabilité (induite par effet stérique) dans le sérum physiologique (9 g/L de NaCl) suffisante pour envisager une utilisation *in vivo* dans des applications biomédicales. La modification des agents de revêtement pourrait apporter une stabilisation électrostatique supplémentaire pour encore renforcer encore la stabilité des nanoparticules en milieu physiologique.

Enfin nous envisageons la synthèse de dérivés fonctionnalisés de l'acide (*R*)-lipoïque par des biovecteurs (mimant le Sialyl lewis<sup>X</sup>, l'acide folique par exemple) pour accéder à des nanoparticules de bismuth métallique ciblant spécifiquement des récepteurs surexprimés dans différentes pathologies.

Les nanoparticules hydrophobes et polyfluorées obtenues après l'échange de ligand ont été formulées dans différentes émulsions. À notre connaissance, ces systèmes d'émulsion n'ont jamais été décrits et pourrait permettre d'augmenter la concentration locale en nanoparticules pour induire des effets radiosensibilisants efficaces. Le couple Miglyol<sup>®</sup> 812 N/poloxamère 188 a été utilisé. Mais des phénomènes de sédimentation ont été observés après le passage dans le microfluidiseur. De ce fait, nous nous sommes recentrés sur la caractérisation et la compréhension de la formulation de la pré-émulsion *via* Ultra-Turrax qui elle ne sédimente pas. La présence de nanoparticules de bismuth métallique a été démontrée indirectement dans l'huile *via* le phénomène crémage. En perspective, il faudrait étudier d'autres systèmes huile/tensioactifs inscrits dans la pharmacopée pour obtenir des émulsions fines et stables.

La formulation dans l'huile perfluorée PFOB n'a pas donné les résultats attendus. En effet, les nanoparticules n'étaient pas assez fluorophiles, elles ne sont restées dans cette huile. Une



## Conclusion générale

modification des agents de revêtement avec une augmentation du nombre de groupements fluorés sera à envisager pour faciliter la solubilité des nanoparticules dans le PFOB.

La dernière partie de ce travail a consisté à quantifier la production de radicaux hydroxyles en irradiant les nanoparticules de bismuth métallique par un rayonnement gamma. Nous n'avons pu tester, à ce jour, que les nanoparticules avec un revêtement citrate. Les premières expériences menées sur des nanoparticules formulées à pH=7 ont montré une réaction radicalaire entre les radicaux formés et le citrate présent sur les nanoparticules accompagnées de l'acidification du milieu provoquant la dégradation des nanoparticules. Les expériences suivantes ont été réalisées avec des nanoparticules formulées à pH=10 pour ne pas dégrader les nanoparticules. L'effet radiosensibilisant de nos nanoparticules de bismuth métallique n'est pas significatif. Suite à ces résultats préliminaires, des études en collaboration sont envisagées pour mieux comprendre et essayer d'augmenter l'effet radiosensibilisant *in vitro* et *in vivo*.

A ce jour, seul la radiosensibilisation des nanoparticules de bismuth métallique a été étudiée. Pour valoriser le potentiel théranostique de nos nanoparticules, plusieurs études collaboratives sont en cours et visent à

- Montrer le potentiel bactéricide de nos particules en collaboration avec le laboratoire Intechmer-Cnam à Cherbourg et le laboratoire de Bactériologie Hygiène au CHU de Poitiers.
- Evaluer la performance diagnostique en scanner CT de nos nanoparticules en collaboration avec le Centre de Microscopie et d'Imagerie Moléculaire (CMMI) à Gosselies en Belgique.



# Material & Methods







### 1 Material & methods: Material of organic synthesis

All reagents were obtained from commercial sources unless otherwise noted, and used as received. Heated experiments were conducted using thermostatically controlled oil baths and were performed under an atmosphere oxygen-free in oven-dried glassware when necessary. All reactions were monitored by analytical Thin Layer Chromatography (TLC) which was performed on aluminum sheets precoated silica gel plates (60 F254, Merck). TLC plates were visualized using irradiation with light at 254 nm. Flash column chromatography was carried out when necessary using silica gel 60 (particle size 0.040-0.063 mm, Merck).

The structure of the products prepared by different methods was checked by comparison of NMR, IR and MS data.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded on a Bruker BioSpin GmbH spectrometer 400 MHz, at room temperature. Chemical shifts were reported in  $\delta$  units, parts per million (ppm). Coupling constants ( $J$ ) were measured in hertz (Hz). Splitting patterns were designed as followed: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; qu, quintuplet; m, multiplet; br, broad; td, triplet of doublets. Various 2D techniques and DEPT experiments were used to establish the structures and to assign the signals. GC-MS analyses were performed with an Agilent 6890N instrument equipped with a dimethyl polysiloxane capillary column (12 m x 0.20 mm) and an Agilent 5973N MS detector-column temperature gradient 80-300°C (method 80): 80°C (1 min); 80°C to 300°C (12.05°C/min); 300°C (2 min). Fourier transform infrared (FT-IR) spectra were measured on a Perkin Elmer FT-IR spectrometer. Nanoparticles (2 mg) were mixed with KBr (10 mg). The spectra were recorded with a resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$  on 64 scans.

Different machines were used such as Biofuge Primo centrifugation (Instrument Heraeus) and HETO powerdry LL3000 freeze-dryer (ThermoFisher) to centrifuge and to freeze dry respectively. Measurements and pH adjustments were performed on a 702SM (Metrohm) titrimeter with a combined glass electrode. The microwave system used was a CEM Discover Microwave Synthesizer (CEM Corporation, USA). To emulsion syntheses, Ultra-Turrax system used was a Ultra-Turrax T15 (James & Kunckel) at 20,500 rpm and Microfluidizer system was a Microfluidic<sup>®</sup> LV1.



## 2 Material & methods : Nanoparticles characterisations

- **Dynamic light scattering and measurement of zêta potential**

Dynamic Light Scattering (DLS) measurements were performed on a Malvern ZetaSizer ZEN3600 instrument equipped with a 633 nm laser (scattering angle 175°) at 25°C. The measurements were performed by analysis in a cuvette ZEN0118 (200 µl) of a bismuth nanoparticles solution (1 mM) diluted in water (RI 1.33, viscosity 0.8872). An instrumental algorithm was used to supply hydrodynamic diameters as number distributions (bismuth RI 2.145, absorption 2.988). The measurements were presented with the average size of nanoparticles ± standard deviation.

- **Granulometry**

The measurements were performed on Cilas 920 instrument. Emulsion (1mL) was added in a tank (ENSAM, Dr. S. Baiz).

- **UV-visible Spectroscopy**

UV-visible absorption spectra were collected using a Genesys 10UV Scanning UV spectrometer (Thermo spectronic) on a bismuth nanoparticles solution (1mM).

- Degradation at pH=7 and at pH=5

The pH of nanoparticle solution (1 mM) was adjusted to pH=7 versus pH=5, then this solution was monitored daily by UV-visible spectroscopy for absorbance evolution.

- Degradation under oxidative stress

The nanoparticle solution (1 mM) was adjusted to pH=7 under oxidative atmosphere was monitored daily by UV-visible spectroscopy for absorbance evolution.

- **Thermogravimetry**

Thermal stability and composition analysis were carried out on a TGA Q500 type measuring instrument (TA instruments, USA) under a nitrogen flow of 50 mL / min. The temperature was increased from 25 to 400 °C with a temperature gradient of 10 ° C / min (ENSAM, Dr. M. Gervais).

The coating agent number per nanoparticle was estimated by the next equation:

$$n_{ligand} = \frac{\text{Percentage weight of citrate (\%)}}{\text{Percentage weight of bismuth (\%)}} * \frac{M^{nanoparticule}}{M^{ligand}}$$

where the molecular weight of nanoparticle ( $M_w$ ) was estimated from:



$$M^{nanoparticle} = \rho * N_A * \frac{4}{3} * \pi * r_{nanoparticle}^3$$

$N_A$ : Avogadro number

$\rho$  : density of bismuth (9790 kg/m<sup>3</sup>)

$r$  : the radius of nanoparticle.

Nanoparticles	Coating agents number on nanoparticles	Coating agents number per nm <sup>2</sup>	Nanoparticles area
Discontinuous process	2913	7	380
Continuous process under conventional thermal heating	86	3	28
Continuous process under microwaves irradiation	30	1	30
AL-PEG <sub>17</sub> -OMe	842	18	46
AL-C <sub>18</sub>	1559	34	45
AL-F <sub>7</sub>	1084	24	45

- **X-ray diffraction (XRD)**

The rhombohedral crystallinity was determined by using the X-ray Diffractometer (XRD: D5000 Siemens diffractometer) equipped with Cu K $\alpha$  as X-ray radiation ( $\lambda = 0.15406$  nm). Diffractograms were interpreted using the Debye-Sherrer formula (D5000 Siemens Data Viewer software) to estimate the rhombohedral structure of bismuth nanoparticles. The scattering intensities were measured over an angular range of  $20^\circ < 2\theta < 80^\circ$  for all samples. One measurement was recorded every  $0.05^\circ$  during 25 seconds. The measurements were recorded at room temperature. (Inorganic and Analytic Chemistry Laboratory, University of Mons, Pr. R. Snyders).

- **X-ray photoelectron spectrometry**

The XPS analyses were carried out on XPS Phi Versa Probe 5000 spectrometer. The pressure in the XPS analysis chamber was around of  $1.10^{-9}$  Torr. The RX source was monochromatized and the line used was the line Al K $\alpha$  (E =1486.7 eV). The power applied to the RX source was 50W. The beam voltage was 15000V and a neutralizer using a flood gun and an argon gun was used (2.4 eV, 20 mA). Quantification was based on the areas of the photoelectron peaks areas (IA for a given element A) after subtraction of the continuous background approximated by a Shirley baseline (Inorganic and Analytic Chemistry Laboratory, University of Mons, Pr. R. Snyders).



- **Transmission Electron Microscopy**

Images were taken on Philips CM120 transmission electron microscope operating at 80 kV. Microscopy analyses were performed as follows: 200 $\mu$ L droplets of the colloidal dispersion were cast onto formvar/carbon-coated copper grids (400 mesh) for a few minutes. From the TEM images, the bismuth nanoparticles diameter distribution was determined from recorded images with ImageJ software version 1.48 (at least 300 counted particles). The measurements were presented with the average size of nanoparticles  $\pm$  standard deviation.

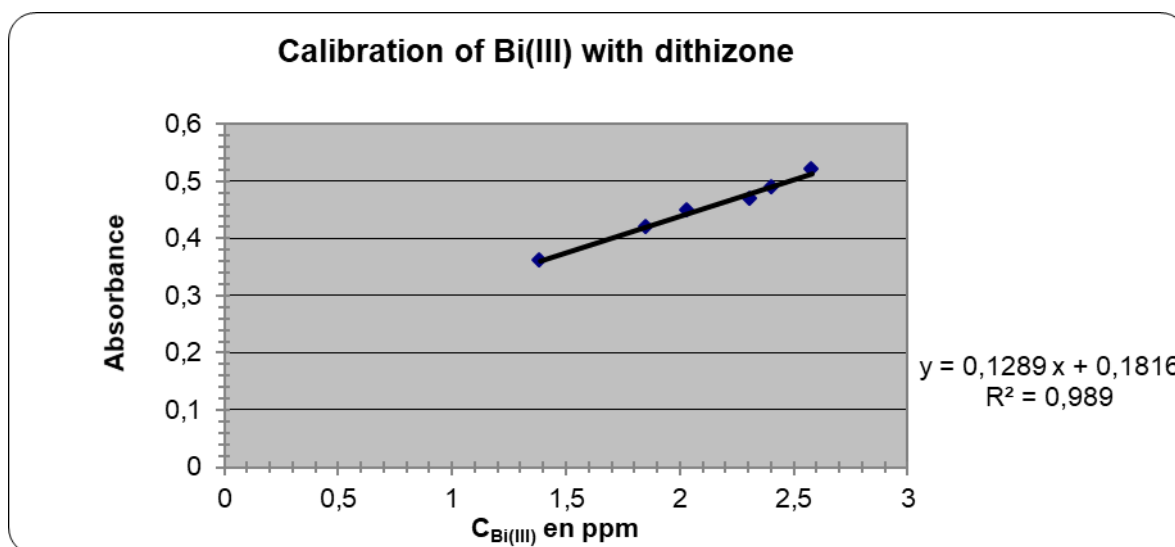
Cryo-TEM images were recorded on a Microscope TecnaiF20 G2 operating at an accelerating 200 kV voltage. A drop of diluted solution was placed on a carbon coated copper grid (300 mesh), which was beforehand treated to make the surface hydrophobic. The drop size was reduced with a filter paper until to obtain a thin film. The grid was then plunged in liquid nitrogen and subsequently in liquid ethane, at a temperature near liquid nitrogen temperature (-183°C). At this temperature, the grid was transferred to a cryo-holder which was introduced into the high-vacuum column of the microscope.

- **Formation efficiency of bismuth nanoparticles**

UV-visible calibration line

Bismuth (20 mg,  $9.7 \cdot 10^{-2}$  mmol) was solubilized in HCl solution (0.1 M, 1L). From this bismuth solution, several volumes 0.7; 0.9; 1; 1.15; 1.25 and 1.5 mL were collected and transferred in six volumetric flasks. In every solution, HCl solution (1M) was added until final volume (1.5 mL). To complete, these last solutions buffers (1 mL) at pH 4 was added to six previous solutions. A freshly prepared dithizone solution 10% (w / v) in ethanol (1 mL) was also added. To reach a total volume of 10 ml, distilled water (6.5 mL) was added. To compare, a white solution without bismuth was prepared with HCl solution (0.1 M, 1.5 mL), buffer solution (1 mL), ethanol (1 mL) and water (6.5 mL).





#### Digestion and evaluation of bismuth yield:

Bismuth nanoparticles (2 mg) were solubilized in a HCl solution (1 M, 5 mL). The reaction mixture was under MW irradiation for 2 hours at reflux. Distilled water (90 mL) was added to dilute the HCl solution 0.1M (100 mL). This solution absorbance was measured by UV-visible spectroscopy.

$$N * \frac{4}{3} \pi r_{\text{sphère}}^3 * 0.524 = N_A * n \frac{4}{3} \pi r_{\text{Bi}}^3 * rdt$$

$r_{\text{sphère}}$  : nanosphere radius

0.524 : compactness of a rhombohedral structure

$N_A$  : Avogadro's number

$n$  : number of moles bismuth atoms introduced *via* the precursor

$r_{\text{Bi}}$  : atomic radius of bismuth (160 pm)

$rdt$  : yield valued by UV-visible spectroscopy and ICP

Nanoparticles	Nanoparticle's number per milliliter	Nanoparticle's concentration ( $\mu\text{M}$ )
Discontinuous process	$1,36 \cdot 10^{15}$	45
Continuous process under conventional thermal heating	$3,47 \cdot 10^{17}$	7,2
Continuous process under microwaves irradiation	$3,14 \cdot 10^{17}$	6,5
AL-PEG <sub>17</sub> -OMe	$3,12 \cdot 10^{17}$	6,5



- **Inductively Coupled Plasma (ICP-AES)**

Each bismuth nanoparticles solution (5, 10, and 25  $\mu\text{L}$ ) was dissolved in mixture of concentrated nitric acid and water (1 mL, 1:1). The final volume of 10 mL was achieved by addition of deionized water. Elemental analysis was performed using inductively coupled plasma-absorption emission spectroscopy (Inorganic and Analytic Chemistry Laboratory, University of Mons, Pr. R. Snyders).

- **Diffusion Ordered Spectroscopy**

DOSY-NMR measurements were conducted on a Bruker Avance 500MHz spectrometer. A STE-LED (stimulated echo longitudinal eddy current delay) standard sequence with a diffusion time of 250 ms, a gradient pulse length of 1 ms and 16 gradients from 2% to 95% of the gradient (53G/cm) was used (RMN, molecular imaging Laboratory, University of Mons, Pr. S. Laurent).

- **Sterilization test**

A bismuth nanoparticles solution (4 mM) with a citrate buffer (2 mM) at pH 7 and a solution of mannitol (300 mM) were prepared. A part of solution (2 mL) was collected and introduced into vials to be sterilized by autoclaved FEDEGARI model FOM/B (Pharma physic). The sterilization method was to heat to 121 °C for 15 minutes.

- **Optical microscopy**

An epifluorescence microscope LeicaDMRB using Cy3 and DAPI-specific filters at 100, 400 and 1000 magnifications were used. Images were captured by using a Leica DFC 300 FX camera and FW 4000 software (Leica microsystemes SAS, Rueil-Malmaison, France).

- **Turbiscan**

The measurements were performed on Turbiscan formulation instrument with a bismuth nanoparticles solution (3 mM) diluted in water (10mL) at 37 °C. (NMR, molecular imaging Laboratory, University of Mons, Pr. S. Laurent).

## 3 Material & methods : Protocols

- *Product*

Bismuth citrate (Alfa Aesar, >94%), D-glucose (Sigma, 99.5%), citric acid (Labosi, >98%) lipoic acid (TCI, >97%), bismuth chloride (Acros, >99%), bismuth subnitrate (Aldrich),



bismuth acetate (alfa Aesar, >99%) bismuth citrate ammonium (fluka >99%), dithizone (TCI, >85%), dicyclohexylcarbodiimide (Alfa Aesar, 98%), *N,N*-diméthyl-4-aminopyridine (Aldrich, >97%), octadecylamine (TCI, >95%), decylamine (TCI, 98%), 1H,1H-heptafluorobutylamine (TCI, 95%), 1H,1H-pentafluoropropylamine (TCI, 97%), 1H,1H-trifluoroethamine (TCI, 98%), polyethylene glycol monomethylether 750 (Alfa Aesar), polyethylene glycol monomethylether 2000 (TCI), polyethylene glycol monomethylether 1000 (TCI), polyethylene glycol monomethylether 550 (Alfa Aesar), polyethylene glycol monomethylether 350 (Sigma), Poloxamer 188 (Alfa Aesar), glycerol (Alfa Aesar, 99.5%), LIPOID S75 (LIPOID), Miglyol® 812 N (IOI Oleochemical), PFOB (Interchim).

### ○ *Experiments described in chapter 1*

- **Synthesis of metallic bismuth nanoparticles in batch by thermal activation**

Bismuth citrate (1 eq, 0.05 mmol, 20 mg) and D-glucose (1.7 eq, 0.08 mmol, 16 mg) were solubilized in NaOH solution (1 M, 5mL). The pH was measured and the solution was heated to 120 °C during 2h30. At the end of the reaction, pH was again controlled and a pH jump was observed. The reaction medium was acidified to pH 10 with a nitric acid solution (1 M). The nanoparticles were isolated by centrifugation (three washings during 45 min, 30 min and 30 min). A washing solution at pH = 10 was allowed to purify bismuth nanoparticles.

- **Synthesis of metallic bismuth nanoparticles in batch under microwaves irradiation**

Bismuth citrate (1 eq, 0.05 mmol, 20 mg) and D-glucose (1.7 eq, 0.08 mmol, 16 mg) were solubilized in NaOH solution (1 M, 5 mL). The pH was measured and the reaction was carried out under MW irradiation at 75 W at 120 °C for 2 min 10. At the end of the reaction, pH was again controlled and a pH jump was observed. The reaction medium was acidified to pH 10 with a nitric acid solution (1 M). Ultrafiltration was performed on a 5 kDa cellulose filter (Merck®). A washing solution at pH = 10 was allowed to purify bismuth nanoparticles. The conductivity value of the filtrate was identical to wash water value (approximately 40 µS/cm).

### ○ *Experiments described in chapter 2*

- **Synthesis of bismuth metallic nanoparticles in continuous flow under microwave activation from bismuth citrate**



Protocol for continuous flow under microwave irradiation with valve 1 ° (conicity 1°).

In a conical flask, citric acid (10 eq, 3 mmol, 570 mg) was dissolved in distilled water (76 mL). The pH was adjusted by using an aqueous solution of NaOH (5 M) in order to obtain a pH = 13.1 and a total volume of 80 mL. Bismuth citrate (1 eq, 0.3 mmol, 120 mg) and D-glucose (3 eq, 0.9 mmol, 162 mg) were added and solubilized with the previous solution. The pH was remeasured and must be equal to 13. The solution was then pumped by a HPLC pump at a flow rate of 0.75 mL/min and then irradiated in the microwave with a power of 25W and a set temperature of 140 ° C. The Teflon tubing in which solution was introduced was maintained by Teflon support. Flow controller (valve 1 conicity 1°) installed at the end of Teflon tubing was set the flow rate of 1 turn. Bismuth nanoparticles were isolated by ultrafiltration on a 30 kDa filter (Merck®) and washed with water at pH=7.

Protocol for continuous flow under microwave irradiation with valve 3 (conicity 3°).

In a conical flask, citric acid (10 eq, 3 mmol, 570 mg) was dissolved in distilled water (76 mL). The pH was adjusted by using an aqueous solution of NaOH (5 M) in order to obtain a pH = 13.1 and a total volume of 80 mL. Bismuth citrate (1 eq, 0.3 mmol, 120 mg) and D-glucose (3 eq, 0.9 mmol, 162 mg) were added and solubilized with the previous solution. The pH was remeasured and must be equal to 13. The solution was then pumped by a HPLC pump at a flow rate of 1.3 mL/min and then irradiated under microwave with a power of 25 W and a set temperature of 140 ° C. The Teflon tubing in which solution was introduced was maintained by Teflon support. Flow controller (valve 3: conicity 3°) installed at the end of Teflon was set the flow rate of 1 turn. Bismuth nanoparticles were isolated by ultrafiltration on a 30 kDa filter (Merck®) and washed with water at pH=7.

- **Synthesis of bismuth metallic nanoparticles in continuous flow under thermal activation from bismuth citrate**

Protocol for continuous flow under thermal activation with valve 1 ° (conicity 1°).

In a conical flask, citric acid (10 eq, 3 mmol, 570 mg) was dissolved in distilled water (76 mL). The pH was adjusted by using an aqueous solution of NaOH (5 M) in order to obtain a pH= 13.1 and a total volume of 80 mL. Bismuth citrate (1 eq, 0.3 mmol, 120 mg) and D-glucose (3 eq, 0.9 mmol, 162 mg) were added and solubilized with the previous solution. The pH was remeasured and must be equal to 13. The solution introduced in a water batch heated to 95 °C and was then pumped by a HPLC pump at a flow rate of 0.75 mL/min. The Teflon



tubing in which solution was introduced was maintained by Teflon support. Flow controller (valve 1) installed at the end of Teflon tubing was set the flow rate of 1 turn. Bismuth nanoparticles were isolated by ultrafiltration on a 30 kDa filter (Merck®) and washed with water at pH=7.

Protocol for continuous flow under thermal activation with valve 3 ° (conicity 3°).

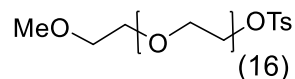
In a conical flask, citric acid (10 eq, 3 mmol, 570 mg) was dissolved in distilled water (76 mL). The pH was adjusted by using an aqueous solution of NaOH (5 M) in order to obtain a pH = 13.1 and a total volume of 80 mL. Bismuth citrate (1 eq, 0.3 mmol, 120 mg) and D-glucose (3 eq, 0.9 mmol, 162 mg) were added and solubilized with the previous solution. The pH was remeasured and must be equal to 13. The solution introduced in a water bath heated to 95 °C was then pumped by a HPLC pump at a flow rate of 1.5 mL/min. The Teflon tubing in which solution was introduced was maintained by Teflon support. The flow controller (valve 3) installed at the end of Teflon tubing was set the set to a flow rate of 1 turn. Bismuth nanoparticles were isolated by ultrafiltration on a 30 kDa filter (Merck®) and washed with water at pH=7.



○ *Experiments described in chapter 3*

● **Hydrophilic molecules**

- Tosylation of polyethylene monomethylether 750 (1<sup>st</sup> step)



The commercially available HO-PEG<sub>17</sub>-OMe (1 eq., 2.62 mmol, 2.00 g) was dissolved in pyridine (10 mL) under argon then *p*-toluenesulphonyl chloride was added (2 eq., 5.24 mmol, 1.00 g). The solution was stirred under argon at room temperature during 24h.

The pyridine was evaporated with toluene (3x10 mL) as cosolvent then the crude was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 mL). The reaction mixture was washed with HCl 1M (50 mL), NaHCO<sub>3</sub> saturated solutions (50 mL) and brine (50 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The product obtained was a yellow oil which was engaged in the next reaction without further purification.

**TLC:** Eluent DCM/MeOH (9/1) R<sub>f</sub> = 0.65

M = 905 g/mol

m = 1.74g

● **n=23: Methoxypolyethylene glycol tosylate 1000**

The same procedure was followed from the commercially available HO-PEG<sub>23</sub>-OMe.

M = 1155 g/mol

m = 1.68 g

The product obtained was a yellow oil engaged in the next step.

● **n=12: Methoxypolyethylene glycol tosylate 550**

The same procedure was followed from the commercially available HO-PEG<sub>12</sub>-OMe.

M = 705 g/mol

m = 1.24 g

The product obtained was a yellow oil engaged in the next step.

● **n=8: Methoxypolyethylene glycol tosylate 350**

The same procedure was followed from the commercially available HO-PEG<sub>8</sub>-OMe.

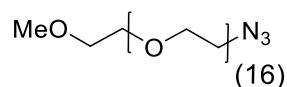
M = 509 g/mol

m = 0.94 g

The product obtained was a yellow oil engaged in the next step.



➤ Substitution by azide group (2<sup>nd</sup> step)



The monotosylate TsO-PEG<sub>17</sub>-OMe (1 eq., 1.87 mmol, 1.70 g) was dissolved in anhydrous acetonitrile (25 mL) under argon then sodium azide (1.5 eq., 2.9 mmol, 190 mg) was added to the previous solution. The reaction mixture, monitored by TLC, was stirred at reflux for 42 h. The acetonitrile was evaporated under reduced pressure without heating. The residue was quenched in H<sub>2</sub>O (60 mL). The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL). The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O (2 x 100 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The product obtained was a colorless oil which was engaged in the next reaction without further purification.<sup>149</sup>

**TLC:** Eluent DCM/MeOH (9/1) R<sub>f</sub>= 0.6

M= 792 g/mol

Yield= 96% on 1.70 g

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.69-3.60 (m, 64 H, CH<sub>2</sub>-O), 3.56-3.52 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-O), 3.40-3.37 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.37-3.36 (s, 3 H, O-CH<sub>3</sub>).

- **n=23: Methoxypolyethylene glycol azide 1000**

The same procedure was followed from the TsO-PEG<sub>23</sub>-OMe.

M= 1042 g/mol

Yield= 86% on 1.45 g

The product obtained was a colorless oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.73-3.58 (m, 88 H, CH<sub>2</sub>-O), 3.57-3.53 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-O), 3.41-3.38 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.38-3.36 (s, 3 H, O-CH<sub>3</sub>).

- **n=12: Methoxypolyethylene glycol azide 550**

The same procedure was followed from the TsO-PEG<sub>12</sub>-OMe.

M= 592 g/mol

Yield>100% on 1.08 g

The product obtained was a colorless oil.



**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.69-3.59 (m, 44H, CH<sub>2</sub>-O), 3.55-3.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.40-3.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.37-3.36 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>).

- **n=8: Methoxypolyethylene glycol azide 350**

The same procedure was followed from the TsO-PEG<sub>8</sub>-OMe.

M= 392 g/mol

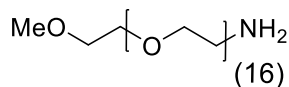
Yield= 96% on 1.31 g

The product obtained was a colorless oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.69-3.60 (m, 28H, CH<sub>2</sub>-O), 3.56-3.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.40-3.38 (2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.38-3.36 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>).



➤ Staudinger reduction (3<sup>rd</sup> step)



The monoazide N<sub>3</sub>-PEG<sub>17</sub>-OMe (1 eq., 2.68 mmol, 2.12 g) was diluted in 1M HCl solution (3 mL) and then cooled to 0°C and stirred. Triphenylphosphine (2 eq., 5.35 mmol, 1.40 g) was solubilized in ethyl acetate (17 mL) and added dropwise into the previous reaction mixture. The reaction was then allowed to warm up to room temperature and was stirred for one week. The reaction was monitored by TLC. The biphasic mixture was separated and the aqueous layer was washed with ethyl acetate. Then, the aqueous layer is basified with KOH (pH=14) and extracted with DCM (3x 80 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. The product obtained was a white oil which was engaged in the next reaction without further purification.<sup>149</sup>

**TLC:** Eluent DCM/MeOH (9/1) R<sub>f</sub>= 0.1

Yield= 94% on 1.40 g

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.68-3.60 (m, 62H, CH<sub>2</sub>-O), 3.55-3.49 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 3.37 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.87 (dd, *J* = 5.1 Hz, 5.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>).

- **n=23 : Methoxypolyethylene glycol amine 1000**

The same procedure was followed from the N<sub>3</sub>-PEG<sub>23</sub>-OMe.

M= 1016 g/mol

Yield= 82% on 0.49 g

The product obtained was a white oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.72-3.53 (m, 86H, CH<sub>2</sub>-O), 3.51-3.47 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 3.39 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.52-2.43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>).

- **n=12 : Methoxypolyethylene glycol amine 550**

The same procedure was followed from the N<sub>3</sub>-PEG<sub>12</sub>-OMe.

M= 566 g/mol

Yield= 90% on 1.82 g

The product obtained was a white oil.



**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.66-3.59 (m, 42H, CH<sub>2</sub>-O), 3.55-3.51 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 3.37 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.88 (dd, *J*= 5.0 Hz, 5.2 Hz 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>).

- **n=8 : Methoxypolyethylene glycol amine 350**

The same procedure was followed from the N<sub>3</sub>-PEG<sub>8</sub>OMe.

M= 366 g/mol

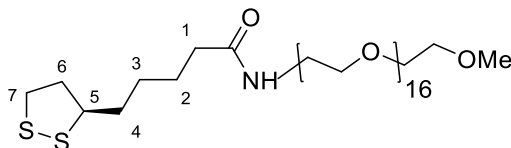
Yield= 81% on 1.9 g

The product obtained was a white oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.70-3.59 (m, 26H, CH<sub>2</sub>-O), 3.58-3.50 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 3.37 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.90 (dd, *J*= 5.0 Hz, 5.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)



➤ Peptidic coupling of methoxypolyethylene glycol amine (4<sup>th</sup> step)



The amine H<sub>2</sub>N-PEG<sub>17</sub>-OMe (1 eq., 1.68 mmol, 1.29 g), DMAP (0.2 eq., 0.35 mmol, 0.04 g) and DCC (1 eq., 1.76 mmol, 0.36 g) were solubilized in anhydrous dichloromethane (6 mL). The mixture was stirred under argon and cooled to 0°C with an ice bath. The lipoic acid (1 eq., 1.7 mmol, 0.36 g) was dissolved in dichloromethane (2 mL) and then added to the previous solution. The reaction mixture was stirred for 2h at 0°C and for 45h at room temperature.

The reaction was monitored by TLC. After this time, the resulting mixture was filtered through a pad of celite which was washed with ethyl acetate (200 mL). The combined filtrate was concentrated under vacuum. The crude product was purified on silica gel using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH as eluent (98:2 to 85:15).<sup>149</sup>

**TLC:** Eluent DCM/MeOH (9/1) R<sub>f</sub>= 0.6

M= 792 g/mol

Yield= 60% on 1.29 g

The product obtained was a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.70-3.55 (m, 63H, CH<sub>2</sub>-O, H<sub>5</sub>), 3.55-3.49 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 3.46-3.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHCO), 3.35 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.19-3.04 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 2.49-2.38 (m, 1H, H<sub>6b</sub>), 2.16 (t, 2H, *J* = 7.4Hz, H<sub>1</sub>), 1.94-1.83 (m, 1H, H<sub>6a</sub>), 1.72-1.58 (m, 4H, H<sub>2</sub> and H<sub>4</sub>), 1.49-1.38 (m, 2H, H<sub>3</sub>).

➤ **n=45 : (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(methoxypolyethylene glycol 2000) pentanamide**<sup>193</sup>

M= 2188 g/mol

Yield= 65% on 0.70 g

The product obtained was a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.74-3.57 (m, 175H, CH<sub>2</sub>-O, H<sub>5</sub>), 3.57-3.51 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 3.49-3.41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHCO), 3.37 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.20-3.07 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 2.50-2.40 (m, 1H, H<sub>6b</sub>), 2.18 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, H<sub>1</sub>), 1.94-1.84 (m, 1H, H<sub>6a</sub>), 1.75-1.61 (m, 4H, H<sub>2</sub> and H<sub>4</sub>), 1.52-1.40 (m, 2H, H<sub>3</sub>).

• **n=23 : (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(methoxypolyethylene glycol 1000) pentanamide**<sup>194</sup>



M= 1188 g/mol

Yield= 45% on 1.70 g

The product obtained is a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.67-3.52 (m, 87H, CH<sub>2</sub>-O, H<sub>5</sub>), 3.52-3.46 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 3.43-3.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHCO), 3.32 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.16-3.00 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 2.46-2.34 (m, 1H, H<sub>6b</sub>), 2.18 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, H<sub>1</sub>), 1.90-1.79 (m, 1H, H<sub>6a</sub>), 1.71-1.55 (m, 4H, H<sub>2</sub> and H<sub>4</sub>), 1.48-1.35 (m, 2H, H<sub>3</sub>).

- **n=12 (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(methoxypolyethylene glycol 550) pentanamide**<sup>195</sup>

M= 738 g/mol

Yield= 46% on 0.92 g

The product obtained was a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 3.70-3.57 (m, 43H, CH<sub>2</sub>-O, H<sub>5</sub>), 3.57-3.52 (dd, 4H, *J* = 5.1 Hz, CH<sub>2</sub>-O), 3.46-3.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHCO), 3.37 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.20-3.06 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 2.50-2.41 (m, 1H, H<sub>6b</sub>), 2.19 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, H<sub>1</sub>), 1.95-1.85 (m, 1H, H<sub>6a</sub>), 1.77-1.60 (m, 4H, H<sub>2</sub> and H<sub>4</sub>), 1.54-1.40 (m, 2H, H<sub>3</sub>).

- **n=8 : (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(methoxypolyethylene glycol 350 ) pentanamide**

M= 538 g/mol

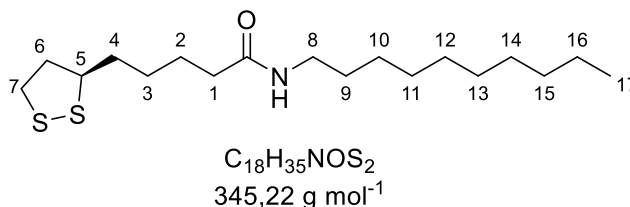
Yield= 39% on 0.50 g

The product obtained was a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** ppm 3.71-3.60 (m, 27H, CH<sub>2</sub>-O, H<sub>5</sub>), 3.58-3.52 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 3.49-3.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHCO), 3.37 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.21-3.07 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 2.51-2.41 (m, 1H, H<sub>6b</sub>), 2.19 (t, 2H, *J* = 7.9 Hz, H<sub>1</sub>), 1.95-1.86 (m, 1H, H<sub>6a</sub>), 1.74-1.61 (m, 4H, H<sub>2</sub> and H<sub>4</sub>), 1.51-1.40 (m, 2H, H<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 172.9 (C=O), 71.9, 70.5, 69.9 (CH<sub>2</sub>-O), 58.9 (O-CH<sub>3</sub>), 56.4 (C<sub>5</sub>), 40.1 (C<sub>6</sub>), 39.0 (CH<sub>2</sub>-NHCO), 38.3 (C<sub>7</sub>), 36.1 (C<sub>1</sub>), 34,6 (C<sub>2</sub> or C<sub>4</sub>), 28.8 (C<sub>3</sub>), 25.3 (C<sub>2</sub> or C<sub>4</sub>).



➤ **Hydrophobic molecules**➤ **(R)-N-decyl-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide**

Decamine (1 eq., 2.4 mmol, 381 mg), DMAP (0.2 eq., 0.48 mmol, 58 mg) and DCC (1 eq., 2.4 mmol, 500 mg) were solubilized in anhydrous dichloromethane (10 mL). The mixture was stirred under argon and cooled to 0°C with an ice bath. The lipoic acid (1 eq., 2.4 mmol, 500 mg) was dissolved in dichloromethane (2 mL) and then added to the previous solution. The reaction mixture was stirred for 2h at 0°C and for 24h at room temperature.

The reaction was monitored by TLC. After this time, the resulting mixture was filtered through a pad of celite which was washed with ethyl acetate (200 mL). The combined filtrate was concentrated under vacuum. The crude product was purified on silica gel using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  as eluent (99/1). The product was obtained in a 38% yield (0,5 g) as a yellow oil.

**TLC:** Eluent DCM/MeOH (95/5)  $R_f = 0.64$

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  ppm 5.43 (br s, 1H, NH), 3.60-3.52 (m, 1H,  $\text{H}_5$ ), 3.23 (dd, 2H,  $J = 6.7 \text{ Hz}, 13 \text{ Hz}$ ,  $\text{H}_8$ ), 3.20-3.06 (m, 2H,  $\text{H}_7$ ), 2.50-2.39 (m, 1H,  $\text{H}_{6b}$ ), 2.16 (td, 2H,  $J = 1.2 \text{ Hz}, 7.7 \text{ Hz}$ ,  $\text{H}_1$ ), 1.95-1.85 (m, 1H,  $\text{H}_{6a}$ ), 1.76-1.58 (m, 4H,  $\text{H}_2$  and  $\text{H}_4$ ), 1.53-1.39 (m, 4H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_9$ ), 1.35-1.18 (m, 14H,  $\text{H}_{10-16}$ ), 0.87 (t, 3H,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ ,  $\text{H}_{17}$ ).

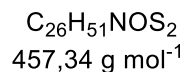
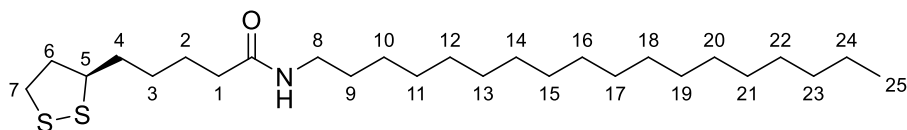
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  ppm 172.6 ( $\text{C=O}$ ), 56.5 ( $\text{C}_5$ ), 40.3 ( $\text{C}_6$ ), 39.6 ( $\text{C}_8$ ) 38.5 ( $\text{C}_7$ ), 36.6 ( $\text{C}_1$ ), 34.7 ( $\text{C}_2$  or  $\text{C}_4$ ), 31.9 ( $\text{CH}_2$  alkyls $_{10-16}$ ), 29.7, 29.6 ( $\text{C}_3$  and  $\text{C}_9$ ), 29.6, 29.3, 28.9 ( $\text{CH}_2$  alkyls $_{10-16}$ ), 26.9 ( $\text{CH}_2$  alkyls $_{10-16}$ ), 25.4 ( $\text{C}_2$  or  $\text{C}_4$ ), 22.7 ( $\text{CH}_2$  alkyls $_{10-16}$ ), 14.1 ( $\text{C}_{17}$ ).

**GC-MS:**  $[\text{M}]^+$ : 345

**IR:**  $\nu_{\text{N-H}}$ :  $3308 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$ :  $2921 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C=O}}$ :  $1634 \text{ cm}^{-1}$  and  $1535 \text{ cm}^{-1}$ .



➤ (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-octadecylpentanamide



Octadecylamine (1 eq., 3.7 mmol, 1.00 g), DMAP (0.2 eq., 0.9 mmol, 0.11 g) and DCC (1 eq., 3.7 mmol, 0.76 g) were solubilized in anhydrous dichloromethane (35 mL). The mixture was stirred under argon and cooled to 0°C with an ice bath. The lipoic acid (1 eq., 3.7 mmol, 0.76 g) was dissolved in dichloromethane (5 mL) and then added to the previous solution. The reaction mixture was stirred for 2h at 0°C and for 24h at room temperature.

The reaction was monitored by TLC. After this time, the resulting mixture was filtered through a pad of celite which was washed with ethyl acetate (200 mL). The combined filtrate was concentrated under vacuum. The crude product was purified on silica gel using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  as eluent (99/1). The product was obtained in a 60% yield (1 g) as a yellow oil.

**TLC:** Eluent DCM/MeOH (95/5)  $R_f = 0.7$

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  ppm 5.41 (br s, 1H, NH), 3.60-3.51 (m, 1H,  $\text{H}_5$ ), 3.23 (dd, 2H,  $J = 6.7$  Hz, 13 Hz,  $\text{H}_8$ ), 3.19-3.07 (m, 2H,  $\text{H}_7$ ), 2.50-2.40 (m, 1H,  $\text{H}_{6b}$ ), 2.16 (td, 2H,  $J = 1.3$  Hz, 8.0 Hz,  $\text{H}_1$ ), 1.95-1.86 (m, 1H,  $\text{H}_{6a}$ ), 1.73-1.61 (m, 4H,  $\text{H}_2$  and  $\text{H}_4$ ), 1.54-1.40 (m, 4H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_9$ ), 1.35-1.20 (m, 30H,  $\text{H}_{10-24}$ ), 0.87 (t, 3H,  $J = 6.9$  Hz,  $\text{H}_{25}$ ).

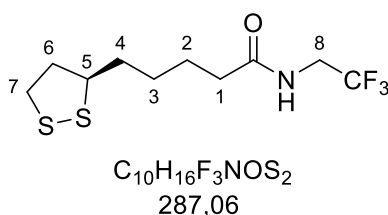
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  ppm 172.6 (C=O), 56.5 ( $\text{C}_5$ ), 40.3 ( $\text{C}_6$ ), 39.6 ( $\text{C}_8$ ) 38.5 ( $\text{C}_7$ ), 36.6 ( $\text{C}_1$ ), 34.7 ( $\text{C}_2$  or  $\text{C}_4$ ), 31.9 ( $\text{CH}_2$  alkyles $_{10-24}$ ), 29.7, 29.6 ( $\text{CH}_2$  alkyles $_{10-24}$ ), 29.6, 29.5 ( $\text{C}_3$  et  $\text{C}_9$ ), 29.4, 29.3, 28.9, 26.9 ( $\text{CH}_2$  alkyles $_{10-24}$ ), 25.4 ( $\text{C}_2$  or  $\text{C}_4$ ), 22.7 ( $\text{CH}_2$  alkyle $_{10-24}$ ), 14.2 ( $\text{C}_{25}$ ).

**IR:**  $\nu_{\text{N-H}}$ : 3307  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$ : 2917  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C=O}}$ : 1633  $\text{cm}^{-1}$  and 1536  $\text{cm}^{-1}$ .



• **Polyfluorinated molecules**

➤ (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(2,2,2-trifluoroethyl)pentanamide



2,2,2-trifluoroethylamine (1 eq., 2.4 mmol, 250 g), DMAP (0.2 eq., 0.6 mmol, 74 mg) and DCC (1 eq., 2.4 mmol, 500 mg) were solubilized in anhydrous dichloromethane (10 mL). The mixture was stirred under argon and cooled to 0°C with an ice bath. The lipoic acid (1 eq., 2.4 mmol, 500 mg) was dissolved in dichloromethane (2 mL) and then added to the previous solution. The reaction mixture was stirred for 2h at 0°C and for 24h at room temperature.

The reaction was monitored by TLC. After this time, the resulting mixture was filtered through a pad of celite which was washed with ethyl acetate (200 mL). The combined filtrate was concentrated under vacuum. The crude product was purified on silica gel using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  as eluent (99/1). The product was obtained in a 46% yield (0.5 g) as a yellow oil.

**TLC:** Eluent DCM/MeOH (95/5)  $R_f$  = 0.56

**$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  ppm 5.79 (m, 1H, NH), 3.97-3.87 (m, 2H,  $\text{H}_8$ ), 3.60-3.52 (m, 1H,  $J$  = 6.4 Hz,  $\text{H}_5$ ), 3.22-3.08 (m, 2H,  $\text{H}_7$ ), 2.51-2.41 (m, 1H,  $\text{H}_{6b}$ ), 2.26 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H,  $\text{H}_1$ ), 1.96-1.86 (m, 1H,  $\text{H}_{6a}$ ), 1.76-1.64 (m, 4H,  $\text{H}_2$  and  $\text{H}_4$ ), 1.53-1.41 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  ppm 172,8 (C=O), 124.1 (q,  $J$  = 276.6 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 56.4 ( $\text{C}_5$ ), 40.53 (q,  $J$  = 34.4 Hz,  $\text{C}_8$ ), 40.3 ( $\text{C}_6$ ), 38.5 ( $\text{C}_7$ ), 36.1 ( $\text{C}_1$ ), 34.6 ( $\text{C}_2$  or  $\text{C}_4$ ), 28.7 ( $\text{C}_3$ ), 25.1 ( $\text{C}_2$  or  $\text{C}_4$ ).

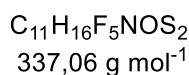
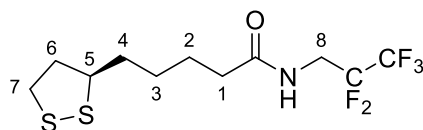
**$^{19}\text{F}$ -NMR (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  ppm -72.5 ( $\text{CF}_3$ )

**LC-MS:**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : 310

**IR:**  $\nu_{\text{N-H}}$  : 3305  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$  : 2927  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{C=O}}$  : 1662  $\text{cm}^{-1}$  and 1558  $\text{cm}^{-1}$  ;  $\nu_{\text{C-F}}$  : 1146  $\text{cm}^{-1}$ .



➤ (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)pentanamide



2,2,3,3,3-pentafluoropropylamine (1 eq., 1.2 mmol, 0.25 g), DMAP (0.5 eq., 0.6 mmol, 0.73 g) and DCC (1 eq., 1.2 mmol, 0.25 g) were solubilized in anhydrous dichloromethane (7 mL). The mixture was stirred under argon and cooled to 0°C with an ice bath. The lipoic acid (1 eq., 1.21 mmol, 0.25 g) was dissolved in dichloromethane (3 mL) and then added to the previous solution. The reaction mixture was stirred for 2h at 0°C and for 45h at room temperature

The reaction was monitored by TLC. After this time, the resulting mixture was filtered through a pad of celite which was washed with ethyl acetate (200 mL). The combined filtrate was concentrated under vacuum. The crude product was purified on silica gel using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH as eluent (99/1). The product was obtained in a 60% yield (0.25 g) as a yellow oil.

**TLC:** Eluent DCM/MeOH (95/5) R<sub>f</sub> = 0.6

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 5.69 (m, 1H, NH), 3.98 (td, 2H, *J* = 6.4 Hz, 15.0 Hz, H<sub>8</sub>), 3.57 (qu, 1H, *J* = 6.4 Hz, H<sub>5</sub>), 3.22-3.07 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 2.50-2.41 (m, 1H, H<sub>6b</sub>), 2.27 (td, 2H, *J* = 1.1 Hz, 7.9 Hz, H<sub>1</sub>), 1.96-1.86 (m, 1H, H<sub>6a</sub>), 1.76-1.64 (m, 4H, H<sub>2</sub> et H<sub>4</sub>), 1.53-1.41 (m, 2H, H<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 172.8 (C=O), 56.4 (C<sub>5</sub>), 40.3 (C<sub>6</sub>), 38.6 (t, *J* = 24.2 Hz, C<sub>8</sub>), 38.5 (C<sub>7</sub>), 36.1 (C<sub>1</sub>), 34.6 (C<sub>2</sub> or C<sub>4</sub>), 28.7 (C<sub>3</sub>), 25.1 (C<sub>2</sub> or C<sub>4</sub>).

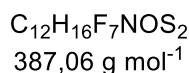
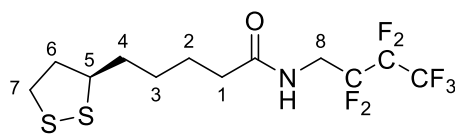
**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm -84.1 (CF<sub>3</sub>), -121.9 (CF<sub>2</sub>).

**GC-MS:** [M]<sup>+</sup> : 337

**IR:** ν<sub>N-H</sub> : 3309 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>Csp<sup>3</sup>-H</sub> : 2916 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>C=O</sub> : 1660 cm<sup>-1</sup> and 1550 cm<sup>-1</sup> ; ν<sub>CF<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub></sub> : 1342 cm<sup>-1</sup> ; ν<sub>C-F<sub>2</sub></sub> : 1188 cm<sup>-1</sup> ; ν<sub>C-F<sub>3</sub></sub> : 1147 cm<sup>-1</sup>.



➤ (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-N-(2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutyl)pentanamide



2,2,3,3,4,4,4-heptafluoropropylamine (1 eq., 1.2 mmol, 250 mg), DMAP (0.2 eq., 0.3 mmol, 40 mg) and DCC (1 eq., 1.2 mmol, 206 g) were solubilized in anhydrous dichloromethane (10 mL). The mixture was stirred under argon and cooled to 0°C with an ice bath. The lipoic acid (1 eq., 1.2 mmol, 257 mg) was dissolved in dichloromethane (2 mL) and then added to the previous solution. The reaction mixture was stirred for 2h at 0°C and for 45h at room temperature

The reaction was monitored by TLC. After this time, the resulting mixture was filtered through a pad of celite which was washed with ethyl acetate (200 mL). The combined filtrate was concentrated under vacuum. The crude product was purified on silica gel using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH as eluent (99/1). The product was obtained in a 65% yield (0.2 g) as a yellow oil.

**TLC:** Eluent DCM/MeOH (95/5) R<sub>f</sub>= 0.66

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 5.70 (m, 1H, NH), 4.02 (td, 2H, *J* = 6.4 Hz, 15,7 Hz, H<sub>8</sub>), 3.57 (qu, 1H, *J* = 6.4 Hz, H<sub>5</sub>), 3.22-3.08 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 2.51-2.41 (m, 1H, H<sub>6b</sub>), 2.28 (td, 2H, *J* = 1.0 Hz, 7.9 Hz, H<sub>1</sub>), 1.96-1.85 (m, 1H, H<sub>6a</sub>), 1.76-1.63 (m, 4H, H<sub>2</sub> et H<sub>4</sub>), 1.54-1.41 (m, 2H, H<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm 172.9 (C=O), 56.3 (C<sub>5</sub>), 40.2 (C<sub>6</sub>), 38.7 (t, *J*= 23.1 Hz, (C<sub>8</sub>), 38.5 (C<sub>7</sub>), 36.1 (C<sub>1</sub>), 34.6 (C<sub>2</sub> or C<sub>4</sub>), 28.7 (C<sub>3</sub>), 25.1 (C<sub>2</sub> or C<sub>4</sub>).

**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ ppm -80.7 (CF<sub>3</sub>), -119.1, -127.7 (CF<sub>2</sub>).

**GC-MS:** [M]<sup>+</sup> : 387

**IR:** ν<sub>N-H</sub>: 3317 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>Csp<sup>3</sup>-H</sub>: 2918 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>C=O</sub>: 1657 cm<sup>-1</sup> and 1549 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>CF<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub></sub>: 1355 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>C-F<sub>2</sub></sub>: 1214 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>C-F<sub>2</sub></sub>: 1181 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>C-F<sub>3</sub></sub>: 1115 cm<sup>-1</sup>.



- **Exchange of Coating - Modification of bismuth metallic nanoparticles at room temperature with lipoic acid**

The modification of bismuth nanoparticles surface was carried out according to the following protocol. Lipoic acid (3 eq,  $4.5 \cdot 10^{-5}$  mol, 9 mg) was added to a solution of nanoparticles (5 mL, 3 mM,  $1.5 \cdot 10^{-5}$  mol, 3 mg) at pH=10. The solution was stirred for 24h at room temperature, then bismuth nanoparticles coated by lipoic acid were isolated after ultrafiltration on 30 kDa filter (Merck®) and washed with water at pH=7.

- **Coating Exchange - modification of bismuth metallic nanoparticles at room temperature with PEG lipoic acid**

The modification of bismuth nanoparticles surface was carried out according to the following protocol. AL-PEG<sub>750</sub>-OMe compound (5 eq,  $7.5 \cdot 10^{-5}$  mol, 70 mg) was added to a solution of nanoparticles (5 mL, 3 mM,  $1.5 \cdot 10^{-5}$  mol, 3 mg) at pH=7. The solution was stirred at room temperature during 24h. Then the bismuth nanoparticles coated by AL-PEG<sub>750</sub>-OMe were isolated after ultrafiltration on 30 kDa filter (Merck®) and washed with water at pH=7.

- **Coating Exchange - modification of bismuth metallic nanoparticles at room temperature with octadecylamine lipoic acid**

The modification of bismuth nanoparticles surface was carried out according to the following protocol. The lipoic acid-octadecylamine compound (6 eq,  $9.0 \cdot 10^{-5}$  mol, 41 mg) solubilized in dichloromethane (5 mL) was then added to a mixture of ethanol (10 mL) and nanoparticles solution (5 mL, 3 mM,  $1.5 \cdot 10^{-5}$  mol, 3 mg) at pH=7. The reactional mixture was stirred for 24h. Then the nanoparticles were purified by ultrafiltration on 30 kDa filter (Merck®) and washed with ethanol. Then solvents were evaporated under vacuum to get a powder after freeze dry.

- **Coating Exchange - modification of bismuth metallic nanoparticles at room temperature with heptafluorobutamine lipoic acid**

The modification of bismuth nanoparticles surface was carried out according to the following protocol. The lipoic-heptafluorobutamine compound (6 eq,  $9.0 \cdot 10^{-5}$  mol, 34 mg) solubilized in ethanol (5 mL) was then added to a nanoparticle's solution (5 mL, 3 mM,  $1.5 \cdot 10^{-5}$  mol, 3 mg)



at pH=7. The reactional mixture was stirred for 24h. Then the nanoparticles were purified by ultrafiltration on 30 kDa filter (Merck®) and washed with ethanol. Then solvents were evaporated under vacuum to get a powder after freeze dry.

### ○ Experiments described in chapter 4

- **A hydrophibic emulsion with nanoparticle in miglyol stabilized by Lipoid 75**

In a bottle, glycerol (0.012 mL, 0.2%) and Lipoid 75 (70 mg, 1.4%) were solubilized in water (4.8 mL) and the solution was heated at 50 °C. In another bottle, lipophilic bismuth metallic nanoparticles (0.02 mmol, 6 mg) were solubilized in miglyol (1.075 mL) at room temperature during 24h. The aqueous solution was added to the oil solution at 50 °C. This mixture was then stirred by using Ultra-Turrax T15 (James & Kunckel) at 20,500 rpm at room temperature.

- **A hydrophibic emulsion with nanoparticle in miglyol stabilized by P188**

In a bottle, glycerol (0.012 mL, 0.2%) and poloxamer P188 (240 mg, 5%) were solubilized in water (4.8 mL) and the solution was heated at 50 °C. In another bottle, lipophilic bismuth metallic nanoparticles (6 mg) were solubilized in miglyol (1.075 mL) at room temperature during 24h. The aqueous solution was added to the oil solution at 50 °C. This mixture was then stirred by using Ultra-Turrax T15 (James & Kunckel) at 20,500 rpm during 5min at room temperature. The pre-emulsion was introduced in three times in microfluidizer (Microfluidic® LV1).

- **Determination of creaming oil percentage**

The volume of creaming oil was determined by measurement of the height of creamed oil

$$V = 2\pi r^2 h$$

r : radius of bottle is 0,6 mm

Height of oil creamed	Volume of creamed oil (m <sup>3</sup> )	V/V <sub>total oil</sub>
2 mm	4,5 10 <sup>-7</sup>	20%
4 mm	9,04 10 <sup>-7</sup>	40%
6 mm	1,35 10 <sup>-6</sup>	60%
8 mm	1,80 10 <sup>-6</sup>	80%
10 mm (total oil)	2,2610 <sup>-6</sup>	100%

- **A hydrophibic pre-emulsion with nanoparticle in miglyol stabilized by P188**



In a bottle, glycerol (0.012 mL) and poloxamer P188 (144 mg, 3%) were solubilized in water (4.8 mL) and the solution was heated at 50 °C. In another bottle, lipophilic bismuth metallic nanoparticles (6 mg) were solubilized in miglyol (1.075 mL) at room temperature during 24h. The aqueous solution was added to the oil solution at 50°C. This mixture was then stirred by using Ultra-Turrax T15 (James & Kunckel) at 20,500 rpm during 15 min at room temperature.

- **A perfluorinated with nanoparticle in PFOB stabilized by Lipoid 75**

In a bottle, glycerol (0.012 mL, 0.2%) and Lipoid 75 (70 mg, 1.4%) were solubilized in water (4.8 mL) and the solution was heated at 50°C. In another bottle, lipophilic bismuth metallic nanoparticles (6 mg) were solubilized in PFOB (1 mL) at room temperature. The aqueous solution was added to the oil solution at 50°C. This mixture was then stirred by using Ultra-Turrax T15 (James & Kunckel) at 20,500 rpm at room temperature.

- *Experiments described in chapter 5*

- **Toxicity test**

### Cell Culture

Three cells lines (HT29, A549, and THP1) were used to assess the bismuth and silver nanoparticles cytotoxicity. THP-1, a human monocytic leukemia cell line, were cultured in RPMI 1640 supplemented with heat inactivated 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 1% of antibiotic solution (100 U/mL penicillin and streptomycine 100 µg/mL), (Gibco). HT29, a colorectal adenocarcinoma adherent cell line and A549, a human-derived lung adenocarcinoma cell line, were both maintained as monolayer cultures in DMEM + Glutamax® medium supplemented with 10% FBS and 1% of antibiotic solution (100 U/mL penicillin and streptomycin 100 µg/mL), at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For adherent cell lines, cells were detached when nearly confluent using 0.025% trypsin for 5 min at 37°C. All cell lines were obtained from ATCC and were routinely screened for mycoplasma infection by PCR.

### MTT and LDH assay

Cytotoxic effect of bismuth or silver nanoparticles was assessed by MTT reduction assay (life technologies). A549, HT29, and THP1 cells were plated in 96 wells culture plates at a density of  $1.0 \times 10^5$  cells/mL. After 24h, plated cells were exposed to silver or bismuth nanoparticles



at varying concentrations or for different amount of time. After the incubation period, MTT assay was performed as described in the instruction manual. Results were presented as % cell viability relative to negative control (cells incubated with culture medium plus 0.1% of DMSO), calculated according to the following equation (where OD is the optical density):

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{OD sample}/\text{OD control}) \times 100$$

The LDH level was evaluated using a commercial kit according to the manufacturer's instructions. Briefly, 100  $\mu\text{L}$  of cell supernatant treated with a dosage of different concentrations of silver or bismuth nanoparticles were moved to a new 48-well plate and mixed with 100  $\mu\text{L}$  of assay solution. After 30 min of incubation, optical density was determined at 490 nm using a plate reader

Three independent experiments were conducted for both assay, each on different days and run in duplicates. For positive controls, H2O2 or Triton X-100 treated cells were used for MTT or LDH assay respectively.

### Statistical analysis

Statistics were performed using Prism GraphPad 7.0 software and the results were presented as a mean  $\pm$  standard deviation (SD) based on three independent experiments. Significant differences ( $p < 0.01$ ) were assessed either by one-way or two-way ANOVA, followed by a post-hoc Tukey's multiple comparison test whenever ANOVA identified significant results for test effects.

The assumptions of normality and the analysis of the variance were confirmed by the Shapiro-Wilk's and Levene's test, respectively.

### • **Hydroxyl radicals quantification**

Hydroxyl radicals were quantified by measuring coumarin hydroxylation. Coumarin solution (0.5 mM) was irradiated in the presence of nanoparticles in a concentration range from 0 to 200  $\mu\text{M}$ . Quantification of 7-hydroxycoumarin fluorescence was performed on a Synergy H1 microplate reader at 25 °C. Excitation was set at 326 nm at pH 7 and at 366 nm at pH 10 and emission maximum detected at 452 nm. Before any analysis, nanoparticles were removed



## Material & Methods

from the samples by addition of NaCl solution (10% (w/v)) to induce nanoparticles aggregation and the by centrifugation to remove gold aggregates.











# Références







## Références

- (1) ISO/TS 80004-1. 2016.
- (2) ISO/TS 80004-2:2015.
- (3) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford Univ. 1998.*
- (4) Anastas, P.; Zimmerman, J. B. Sustainability Requires Objectives at the Molecular, Product, Process, and System Levels. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37 (5), 94A-101A. <https://doi.org/10.1021/es032373g>.
- (5) Dahl, J. A.; Maddux, B. L. S.; Hutchison, J. E. Toward Greener Nanosynthesis. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (6), 2228–2269. <https://doi.org/10.1021/cr050943k>.
- (6) Hutchison, J. E. The Road to Sustainable Nanotechnology: Challenges, Progress and Opportunities. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, 4 (11), 5907–5914. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02121>.
- (7) DeMello, J.; DeMello, A. Microscale Reactors: Nanoscale Products. *Lab on a Chip* **2004**, 4 (2), 11–15. <https://doi.org/10.1039/b403638g>.
- (8) Lamer, V. K.; Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72 (11), 4847–4854. <https://doi.org/10.1021/ja01167a001>.
- (9) Baghbanzadeh, M.; Carbone, L.; Cozzoli, P. D.; Kappe, C. O. Microwave-Assisted Synthesis of Colloidal Inorganic Nanocrystals. *Angew. Chemie* **2011**, 50 (48), 11312–11359. <https://doi.org/10.1002/anie.201101274>.
- (10) Kappe, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angew. Chemie* **2004**, 43 (46), 6250–6284. <https://doi.org/10.1002/anie.200400655>.
- (11) Shahbazali, E.; Hessel, V.; Noël, T.; Wang, Q. Metallic Nanoparticles Made in Flow and Their Catalytic Applications in Organic Synthesis. *Nanotechnol. Rev.* **2013**, 3 (1), 65–86. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2013-0017>.
- (12) Derjaguin, B.; Landau, L. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. *Prog. Surf. Sci.* **1993**, 43 (1–4), 30–59. [https://doi.org/10.1016/0079-6816\(93\)90013-1](https://doi.org/10.1016/0079-6816(93)90013-1).
- (13) Gomez, C.; Hallot, G.; Port, M. Bismuth Metallic Nanoparticles. *Inorganic Framework as Smart Nanomedicines* **2018**, 1–699. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813661-4.00010-9>.
- (14) Stokes, K. J.; Fanf, J.; O'Connor, C. J. Synthesis and Properties of Bismuth Nanocrystals. *18th International Conference on Thermoelectrics* **1999**.



- (15) Stubenrauch, C.; Wielpütz, T.; Sottmann, T.; Roychowdhury, C.; DiSalvo, F. J. Microemulsions as Templates for the Synthesis of Metallic Nanoparticles. *Colloids Surf. A* **2008**, *317*, 328–338. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.10.031>.
- (16) Brüttsch, L.; Feldmann, C. One-Pot Photoinitiated Synthesis and Phase-Transfer Separation of Bismuth Nanoparticles. *ZAAC* **2017**, *643* (23), 2045–2049. <https://doi.org/10.1002/zaac.201700328>.
- (17) Petsom, K.; Kopwitthaya, A.; Horphathum, M.; Kaewkhao, J.; Sangwaranatee, N. The Effect of Additive Chemicals on Synthesis of Bismuth Nanoparticles. *Mater. Today* **2018**, *5* (6), 14057–14062. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.02.061>.
- (18) Silvestre, F.; Aubry, J.; Benvegna, T.; Brendlé, J.; Durand, M.; Lavergne, A.; Len, C.; Molinier, V.; Mouloungui, Z.; Plusquellec, D. Agroressources Pour Une Chimie Durable. *Actual. Chim.* **2010**, 338–339, 28–40.
- (19) Fang, J.; Stokes, K. L.; Wiemann, J. A.; Zhou, W. L.; Dai, J.; Chen, F.; O'Connor, C. J. Microemulsion-Processed Bismuth Nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. B* **2001**, *B83*, 254–257. [https://doi.org/10.1016/S0921-5107\(01\)00528-1](https://doi.org/10.1016/S0921-5107(01)00528-1).
- (20) Fang, J.; Stokes, K. L.; Zhou, W. L.; Wiemann, J. A.; Dai, J.; O'. Colloidal Bismuth Nanoparticles: Synthesis and Uv-Vis Absorption. *Clust. Nanostructure Interfaces* **2000**, 91–96.
- (21) Fang, J.; Stokes, K. L.; Wiemann, J.; Zhou, W. Nanocrystalline Bismuth Synthesized via an in Situ Polymerization-Microemulsion Process. *Mater. Lett.* **2000**, *42* (1), 113–120. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(99\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(99)00169-X).
- (22) Foos, E. E.; Stroud, R. M.; Berry, A. D.; Snow, A. W.; Arnistead, J. P. Synthesis of Nanocrystalline Bismuth in Reverse Micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9656–9657. <https://doi.org/10.1021/ja01861a077>.
- (23) Yan, L.; Gu, Z.; Zheng, X.; Zhang, C.; Li, X.; Zhao, L.; Zhao, Y.; Yan, L.; Gu, Z.; Zheng, X.; et al. Elemental Bismuth-Graphene Heterostructures for Photocatalysis from Ultraviolet to Infrared Light Elemental Bismuth-Graphene Heterostructures for Photocatalysis from Ultraviolet to Infrared Light. *ACS Catal.* **2017**, *7* (10), 7043–7050. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b02170>.
- (24) Chakravarty, S.; Unold, J.; Shuboni-mulligan, D. D.; Blanco-fernandez, B.; Shapiro, E. M. Surface Engineering of Bismuth Nanocrystals to Counter Dissolution. *Nanoscale* **2016**, *8* (27), 13217–13222. <https://doi.org/10.1039/c6nr02171a>.
- (25) Bi, H.; He, F.; Dong, Y.; Yang, D.; Dai, Y.; Xu, L.; Lv, R.; Gai, S.; Yang, P.; Lin, J.



- Bismuth Nanoparticles with “ Light ” Property Served as Multi-Functional Probe for X-Ray Computed Tomography and Fluorescence Imaging. *Chem. Mater.* **2018**, *30* (10), 3301–3307. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.8b00565>.
- (26) Winter, H.; Christopher-Alliso, E.; Brown, A. L.; Goforth, A. M. Aérobic Method for the Synthesis of Nearly Size-Monodisperse Bismuth Nanoparticles from a Redox Non-Innocent Precursor. *Nanotechnology* **2019**, *29* (15), 155603–155626.
- (27) Hu, J.; Hong, Y.; Muratore, C.; Voevodin, A. A. In Situ Transmission Electron Microscopy of Solid – Liquid Phase Transition of Silica Encapsulated Bismuth Nanoparticles. *Nanoscale* **2011**, *3*, 3700–3704. <https://doi.org/10.1039/c1nr10394f>.
- (28) Wang, F.; Buhro, W. E. An Easy Shortcut Synthesis of Size-Controlled Bismuth Nanoparticles and Their Use in the SLS Growth of High- Quality Colloidal Cadmium Selenide Quantum Wires. *Small* **2010**, *6* (4), 573–581. <https://doi.org/10.1002/sml.200902077>.
- (29) Wei, B.; Zhang, X.; Zhang, C.; Jiang, Y.; Fu, Y. Y.; Yu, C.; Sun, S. K.; Yan, X. P. Facile Synthesis of Uniform-Sized Bismuth Nanoparticles for CT Visualization of Gastrointestinal Tract in Vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (20), 12720–12726. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03640>.
- (30) Carotenuto, G.; Hison, C. L.; Capezzuto, F.; Palomba, M.; Perlo, P.; Conte, A. P. Synthesis and Thermoelectric Characterisation of Bismuth Nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* **2009**, *11*, 1729–1738. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9541-6>.
- (31) Wang, F.; Tang, R.; Yu, H.; Gibbons, P. C.; Buhro, W. E. Size- and Shape-Controlled Synthesis of Bismuth Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2008**, *20* (11), 3656–3662. <https://doi.org/10.1021/cm8004425>.
- (32) Richards, V. N.; Shields, S. P.; Buhro, W. E. Nucleation Control in the Aggregative Growth of Bismuth Nanocrystals. *Chem.* **2011**, *23*, 137–144. <https://doi.org/10.1021/cm101957k>.
- (33) Yamera, M.; Kovalenko, M. V.; Hesser, G.; Talapin, D. V.; Heiss, W. Highly Monodisperse Bismuth Nanoparticles and Their Three-Dimensional Superlattices. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15158–15159.
- (34) Schulz, S.; Heimann, S.; Wölper, C.; Assenmacher, W.; Wo, C.; Assenmacher, W. Synthesis of Bismuth Pseudocubes by Thermal Decomposition of Bi<sub>2</sub>Et<sub>4</sub>. *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 2032–2039.
- (35) Wang, Y.; Chen, J.; Chen, L.; Chen, Y.; Wu, L. Shape-Controlled Solventless



- Syntheses of Nano Bi Disks and Spheres. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 1578–1584. <https://doi.org/10.1021/cg9010949>.
- (36) Wang, Z.; Jiang, C.; Huang, R.; Peng, H.; Tang, X. Investigation of Optical and Photocatalytic Properties of Bismuth Nanospheres Prepared by a Facile Thermolysis Method. *J. Phys Chem. C* **2014**, *118*, 1155–1160.
- (37) Wang, C.; Sun, Z.; Ma, L.; Su, M. Simultaneous Detection of Multiple Biomarkers with over Three Orders of Concentration Difference Using Phase Change Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (6), 2215–2219. <https://doi.org/10.1021/ac103102h>.
- (38) Kong, F.; Ning, W.; Wang, A.; Liu, Y.; Tian, M. Convenient Solvothermal Synthesis of Nanoscale 0-2D Bi without Surfactants and Templates. *J. Alloys Compd.* **2018**, *737*, 484–489. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.12.109>.
- (39) Kim, J. H.; Lee, J. H. Synthesis of Spherical Bismuth Nanoparticles by Two-Step Heating of Tetraethylene Glycol Containing Solid Bismuth(III) Carbonates. *Mater. Chem. Phys.* **2015**, *153*, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.01.019>.
- (40) Tian, F.; Zhao, H.; Li, G.; Dai, Z.; Liu, Y.; Chen, R. Modification with Metallic Bismuth as Efficient Strategy for the Promotion of Photocatalysis: The Case of Bismuth Phosphate. *ChemSusChem.* **2016**, *9* (13), 1579–1585. <https://doi.org/10.1002/cssc.201600489>.
- (41) Estrada Flores, M.; Santiago Jacinto, P.; Reza San Germán, C. M.; Rendón Vázquez, L.; Borja Urby, R.; Cayetano Castro, N. Surfactant-Free Synthesis of Metallic Bismuth Spheres by Microwave-Assisted Solvothermal Approach as a Function of the Power Level. *Front. Mater. Sci.* **2016**, *10* (4), 394–404. <https://doi.org/10.1007/s11706-016-0356-6>.
- (42) Safardoust-Hojaghan, H.; Salavati-Niasari, M.; Hassan Motaghedifard, M.; Mostafa Hosseinpour-Mashkani, S. Synthesis of Micro Sphere-like Bismuth Nanoparticles by Microwave Assisted Polyol Method; Designing a Novel Electrochemical Nanosensor for Ultra-Trace Measurement of Pb 2+ Ions. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 4676–4684. <https://doi.org/10.1039/c5nj00532a>.
- (43) Goia, C.; Matijević, E.; Goia, D. V. Preparation of Colloidal Bismuth Particles in Polyols. *J. Mater. Res. Technol* **2005**, *20*, 1507–1514. <https://doi.org/10.1557/JMR.2005.0194>.
- (44) Wu, J.; Yang, H.; Li, H.; Lu, Z.; Yu, X.; Chen, R. Microwave Synthesis of Bismuth



- Nanospheres Using Bismuth Citrate as a Precursor. *J. Alloys Compd.* **2010**, 498 (2), 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2010.03.165>.
- (45) Wang, Y.; Xia, Y. Bottom-up and Top-down Approaches to the Synthesis of Monodispersed Spherical Colloids of Low Melting-Point Metals. *Nano Lett.* **2004**, 4 (10), 2047–2050. <https://doi.org/10.1021/nl048689j>.
- (46) Wang, Y.; Kim, K. S. Large-Scale Polyol Synthesis of Single-Crystal Bismuth Nanowires and the Role of NaOH in the Synthesis Process. *Nanotechnology* **2008**, 19 (26), 265303. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/26/265303>.
- (47) Chen, Y.; Gong, R.; Zhang, W.; Xu, X.; Fan, Y.; Liu, W. Synthesis of Single-Crystalline Bismuth Nanobelts and Nanosheets. *Mater. Lett.* **2005**, 59 (8–9), 909–911. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2004.09.046>.
- (48) Li, J.; Fan, H.; Chen, J.; Liu, L. Synthesis and Characterization of Poly(Vinyl Pyrrolidone)-Capped Bismuth Nanospheres. *Colloids Surf. A* **2009**, 340 (1–3), 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.03.007>.
- (49) Wu, J.; Qin, F.; Lu, Z.; Yang, H.-J.; Chen, R. Solvothermal Synthesis of Uniform Bismuth Nanospheres Using Poly(N-Vinyl-2-Pyrrolidone) as a Reducing Agent. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, 6 (1), 66. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-66>.
- (50) Cheng, G.; Wu, J.; Xiao, F.; Yu, H.; Lu, Z.; Yu, X.; Chen, R. Synthesis of Bismuth Micro- and Nanospheres by a Simple Refluxing Method. *Mater. Lett.* **2009**, 63 (26), 2239–2242. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.045>.
- (51) Zou, C. D.; Gao, Y. L.; Yang, B.; Zhai, Q. J. Melting and Undercooling of Bismuth Nanocrystals by Solvothermal Synthesis. *Phys. B Condens. Matter* **2009**, 404 (21), 4045–4050. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2009.07.158>.
- (52) Wang, W. Z.; Poudel, B.; Ma, Y.; Ren, Z. F. Shape Control of Single Crystalline Bismuth Nanostructures. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110 (51), 25702–25706. <https://doi.org/10.1021/jp063474e>.
- (53) Kitamura, N.; Hirao, N.; Takahashi, K.; Uchiyama, H.; Kozuka, H. Effect of Additives on the Formation of Bismuth Nanoparticles by Polyol Process. *J. Ceram. Soc. Jpn* **2014**, 122 (1430), 917–919. <https://doi.org/10.2109/jcersj2.122.917>.
- (54) Zhang, M. L.; Feng, C.; Zhang, W. X.; Luan, X. W.; Jiang, J.; Li, L. F. Synthesis of Bismuth Nanoparticles by a Simple One-Step Solvothermal Reduction Route. *Appl. Mech. Mater.* **2013**, 423–426 (3), 155–158. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.423-426.155>.



- (55) Hossain, M.; Luo, Y.; Sun, Z.; Wang, C.; Zhang, M.; Fu, H.; Qiao, Y.; Su, M. Biosensors and Bioelectronics X-Ray Enabled Detection and Eradication of Circulating Tumor Cells with Nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *38* (1), 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.020>.
- (56) Luo, Y.; Wang, C.; Qiao, Y.; Hossain, M.; Ma, L.; Su, M. In Vitro Cytotoxicity of Surface Modified Bismuth Nanoparticles. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23* (10), 2563–2573. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4716-1>.
- (57) Luo, Y.; Hossain, M.; Wang, C.; Qiao, Y.; An, J. J.; Ma, L.; Su, M. Targeted Nanoparticles for Enhanced X-Ray Radiation Killing of Multidrug-Resistant Bacteria. *Nanoscale* **2013**, *5* (2), 687. <https://doi.org/10.1039/c2nr33154c>.
- (58) Lei, P.; An, R.; Zhang, P.; Yao, S.; Song, S.; Dong, L.; Xu, X.; Du, K.; Feng, J. Ultrafast Synthesis of Ultrasmall Poly (Vinylpyrrolidone) - Protected Bismuth Nanodots as a Multifunctional Theranostic Agent for In Vivo Dual-Modal CT / Photothermal-Imaging-Guided Photothermal Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (35), 0–10. <https://doi.org/10.1002/adfm.201702018>.
- (59) Hamood, S. A.; Aldahan, Z. T. Bismuth (0) Nanoparticle as Anti-Breast Cancer Agent Synthesis And. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* **2016**, *7* (4), 809–816.
- (60) Branca, M.; Corps, K.; Ciuculescu-Pradines, D.; Coppel, Y.; Lecante, P.; Amiens, C. Insights into the Chemistry of Bismuth Nanoparticles. *New j. Chem.* **2017**. <https://doi.org/10.1039/C7NJ01308F>.
- (61) Jeromiyas, N.; Elaiyappillai, E.; Kumar, A. S.; Huang, S. T.; Mani, V. Bismuth Nanoparticles Decorated Graphenated Carbon Nanotubes Modified Screen-Printed Electrode for Mercury Detection. *J. Taiwan Inst. Chem. E* **2019**, *95*, 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.08.030>.
- (62) Bindewald, E. H.; Schibelbain, A. F.; Papi, M. A. P.; Neiva, E. G. C.; Zarbin, A. J. G.; Bergamini, M. F.; Marcolino-Júnior, L. H. Design of a New Nanocomposite between Bismuth Nanoparticles and Graphene Oxide for Development of Electrochemical Sensors. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *79*, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.033>.
- (63) Yu, N.; Wang, Z.; Zhang, J.; Liu, Z.; Zhu, B.; Yu, J.; Zhu, M.; Peng, C.; Chen, Z. Thiol-Capped Bi Nanoparticles as Stable and All-in-One Type Theranostic Nanoagents for Tumor Imaging and Thermoradiotherapy. *Biomaterials* **2018**, *161*, 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.047>.



- (64) Yang, C.; Guo, C.; Guo, W.; Zhao, X.; Liu, S.; Han, X. Multifunctional Bismuth Nanoparticles as Theranostic Agent for PA/CT Imaging and NIR Laser-Driven Photothermal Therapy. *ACS Appl. Mater. interfaces* **2018**, *1* (2), 820–830. <https://doi.org/10.1021/acsanm.7b00255>.
- (65) Brown, A. L.; Naha, P. C.; Benavides-Montes, V.; Litt, H. I.; Goforth, A. M.; Cormode, D. P. Synthesis, X-Ray Opacity, and Biological Compatibility of Ultra-High Payload Elemental Bismuth Nanoparticle X-Ray Contrast Agents. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (7), 2266–2274. <https://doi.org/10.1021/cm500077z>.
- (66) Deng, J.; Xu, S.; Hu, W.; Xun, X.; Zheng, L.; Su, M. Tumor Targeted, Stealthy and Degradable Bismuth Nanoparticles for Enhanced X-Ray Radiation Therapy of Breast Cancer. *Biomaterials* **2018**, *154*, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.048>.
- (67) Li, Z.; Liu, J.; Hu, Y.; Li, Z.; Fan, X.; Sun, Y.; Besenbacher, F.; Chen, C.; Yu, M. Biomaterials Biocompatible PEGylated Bismuth Nanocrystals: “ All-in-One ” Theranostic Agent with Triple-Modal Imaging and Efficient in Vivo Photothermal Ablation of Tumors. *Biomaterials* **2017**, *141*, 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.06.033>.
- (68) Gomez, L.; Sebastian, V.; Irusta, S.; Ibarra, A.; Arruebo, M.; Santamaria, J. Scaled-up Production of Plasmonic Nanoparticles Using Microfluidics: From Metal Precursors to Functionalized and Sterilized Nanoparticles. *Lab on a Chip* **2014**, *14* (2), 325–332. <https://doi.org/10.1039/c3lc50999k>.
- (69) Deng, J.; Xun, X.; Zheng, W.; Su, Y.; Zheng, L.; Wang, C.; Su, M. Sequential Delivery of Bismuth Nanoparticles and Doxorubicin by Injectable Macroporous Hydrogels for Combined Anticancer Kilovoltage X-Ray Radio- and Chemo-Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (47), 7966–7973. <https://doi.org/10.1039/c8tb02284d>.
- (70) Pastor, A. Synthèse de Nanoparticules de Bismuth à Visée Théranostique. *Mémoire Ingénieur, CNAM* **2016**, Confidentiel.
- (71) Gomez, C.; Hallot, G.; Pastor, A.; Laurent, S.; Brun, E.; Sicard-Roselli, C.; Port, M. Metallic Bismuth Nanoparticles: Towards a Robust, Productive and Ultrasound Assisted Synthesis from Batch to Flow-Continuous Chemistry. *Ultrason. Sonochem.* **2019**, *56*, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.04.012>.
- (72) Son, J. S.; Park, K.; Han, M. K.; Kang, C.; Park, S. G.; Kim, J. H.; Kim, W.; Kim, S. J.; Hyeon, T. Large-Scale Synthesis and Characterization of the Size-Dependent



- Thermoelectric Properties of Uniformly Sized Bismuth Nanocrystals. *Angew. Chemie* **2011**, 50 (6), 1363–1366. <https://doi.org/10.1002/anie.201005023>.
- (73) Swy, E. R.; Schwartz-Duval, A. S.; Shuboni, D. D.; Latourette, M. T.; Mallet, C. L.; Parys, M.; Cormode, D. P.; Shapiro, E. M. Dual-Modality, Fluorescent, PLGA Encapsulated Bismuth Nanoparticles for Molecular and Cellular Fluorescence Imaging and Computed Tomography. *Nanoscale* **2014**, 6 (21), 13104–13112. <https://doi.org/10.1039/C4NR01405G>.
- (74) Fang, J.; Stokes, K. L.; Zhou, W. L.; Wang, W.; Lin, J. Self-Assembled Bismuth Nanocrystallites. *Chem. Commun.* **2001**, No. 18, 1872–1873. <https://doi.org/10.1039/b106105b>.
- (75) Fanfair, D.; Korgel, B. Bismuth Nanocrystal-Seeded III-V Semiconductor Nanowire Synthesis. *Cryst. Growth Des.* **2005**, 5, 1971–1976. <https://doi.org/10.1021/cg0502587>.
- (76) Warren, S. C.; Jackson, A. C.; Cater-Cyker, Z. D.; DiSalvo, F. J.; Wiesner, U. Nanoparticle Synthesis via the Photochemical Polythiol Process. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (33), 10072–10073. <https://doi.org/10.1021/ja0733639>.
- (77) Wang, Y. W.; Hong, B. H.; Kim, K. S. Size Control of Semimetal Bismuth Nanoparticles and the UV-Visible and IR Absorption Spectra. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109 (15), 7067–7072. <https://doi.org/10.1021/jp046423v>.
- (78) Balan, L.; Schneider, R.; Billaud, D.; Fort, Y.; Ghanbaja, J. A New Synthesis of Ultrafine Nanometre-Sized Bismuth Particles. *Nanotechnology* **2004**, 15 (8), 940–944. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/15/8/011>.
- (79) Cui, Z.; Zhang, Y.; Li, S.; Ge, S. Preparation and Photocatalytic Performance of Bi Nanoparticles by Microwave-Assisted Method Using Ascorbic Acid as Reducing Agent. *Catal. Commun.* **2015**, 72, 97–100. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2015.09.024>.
- (80) Velasco-Arias, D.; Zumeta-Dubé, I.; Díaz, D.; Santiago-Jacinto, P.; Ruiz-Ruiz, V. F.; Castillo-Blum, S. E.; Rendón, L. Stabilization of Strong Quantum Confined Colloidal Bismuth Nanoparticles, One-Pot Synthesized at Room Conditions. *J. Phys. Chem. C* **2012**, 116 (27), 14717–14727. <https://doi.org/10.1021/jp304170k>.
- (81) Yu, X.; Li, A.; Zhao, C.; Yang, K.; Chen, X.; Li, W. Ultrasmall Semimetal Nanoparticles of Bismuth for Dual Modal Computed Tomography/Photoacoustic Imaging and Synergistic Thermoradiotherapy. *ACS Nano* **2017**, 11 (4), 3990–4001. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00476>.



- (82) Eastman, H. E.; Jamieson, C.; Watson, A. J. B.; Craig, J.; Watson, A. J. B. Development of Solvent Selection Guides. *Aldrichimica Acta* **2015**, 48 (2), 2015.
- (83) Rodríguez-luis, O. E.; Hernández-delgadillo, R.; Pineda-aguilar, N.; Vargas-villarreal, J.; González-salazar, F.; Garza-gonzález, J. N.; Hernández-garcía, M. E.; Chellam, S.; Cabral-romero, C.; Odontología, F. De; et al. Effect of Bismuth Lipophilic Nanoparticles (BisBAL NPs) on *Trichomonas Vaginalis* Growth. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2017**, 17, 4618–4622. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.13743>.
- (84) Hernandez-delgadillo, R.; Badireddy, A. R.; Zaragoza-magaña, V.; Sánchez-nájera, R. I.; Chellam, S.; Cabral-romero, C. Effect of Lipophilic Bismuth Nanoparticles on Erythrocytes. *J. Nanomater.* **2015**.
- (85) Rene, H.; Badireddy, A. R.; José, M. J.; Francisco, C. J.; Israel, M. G.; Isela, S. R.; Chellam, S.; Claudio, C.-R.; Juan José, M.-S.; Juan Francisco, C.-C.; et al. Cytotoxic Effect of Lipophilic Bismuth Dimercaptopropanol Nanoparticles on Epithelial Cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, 16 (1), 203–209. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10735>.
- (86) Badireddy, A. R.; Chellam, S.; Marinakos, S. M.; Wiesner, M. R. Lipophilic Nano-Bismuth Inhibits Bacterial Growth , Attachment , and Biofilm Formation. *Inst. Civ. Eng.* **2013**, 1 (SI3), 181–189.
- (87) Hernandez-Delgadillo, R.; Velasco-arias, D.; Diaz, D.; Arevalo-Niño, K.; Garza-Enriquez, M.; De la Garza-Ramos, M. A.; Cabral-romero, C.; Niño-Arevalo, K.; A de la Garza-Ramos, M.; Cabral-romero, C.; et al. Zerovalent Bismuth Nanoparticles Inhibit *Streptococcus Mutans* Growth and Formation of Biofilm. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, 7, 2109–2113. <https://doi.org/10.2147/ijn.s29854>.
- (88) Mntungwa, N.; Pullabhotla, V. S. R. R.; Revaprasadu, N. A Simple Route to Bismuth Nanoparticles in the Form of Dots , Branched Nanorods and Self Assembled Cubes. *Mater. Lett.* **2013**, 92, 220–223. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.10.069>.
- (89) Vera-Robles, L. I.; Escobar-Alarcón, L.; Picquart, M.; Hernández-Pozos, J. L.; Haro-Poniatowski, E. A Biological Approach for the Synthesis of Bismuth Nanoparticles: Using Thiolated M13 Phage as Scaffold. *Langmuir* **2016**, 32 (13), 3199–3206. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04369>.
- (90) Borovikova, L. N.; Polyakova, I. V.; Korotkikh, E. M.; Lavrent'ev, V. K.; Kipper, A. I.; Pisarev, O. A. Synthesis and Stabilization of Bismuth Nanoparticles in Aqueous Solutions. *Russ. J. Phys. Chem. A* **2018**, 92 (11), 2253–2256. <https://doi.org/10.1134/s0036024418110055>.



- (91) Hostler, S. R.; Qu, Y. Q.; Demko, M. T.; Abramson, A. R.; Qiu, X.; Burda, C. Thermoelectric Properties of Pressed Bismuth Nanoparticles. *Superlattices Microstruct.* **2008**, *43* (3), 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2007.10.001>.
- (92) Qin, F.; Wang, R.; Li, G.; Tian, F.; Zhao, H.; Chen, R. Highly Efficient Photocatalytic Reduction of Cr(VI) by Bismuth Hollow Nanospheres. *Catal. Commun.* **2013**, *42*, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2013.07.039>.
- (93) Yang, H.; Li, J.; Lu, X.; Xi, G.; Yan, Y. Reliable Synthesis of Bismuth Nanoparticles for Heavy Metal Detection. *Mater. Res. Bull.* **2013**, *48* (11), 4718–4722. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.08.008>.
- (94) Wang, M.; Cui, Z.; Xue, Y.; Yan, A.; Yu, X.; Song, X.; Li, H. Preparation of Nano-Bismuth with Different Particle Sizes and the Size Dependent Electrochemical Thermodynamics. *Electroanalysis* **2019**, *31* (7), 1316–1323. <https://doi.org/10.1002/elan.201800870>.
- (95) Zhang, X.; Hou, X.; Zhang, Q.; Cai, Y.; Liu, Y.; Qiao, J. Polyethylene Glycol Induced Reconstructing Bi Nanoparticle Size for Stabilized CO<sub>2</sub> Electroreduction to Formate. *J. Catal.* **2018**, *365*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2018.06.019>.
- (96) Ma, D.; Zhao, Y.; Zhao, J.; Li, Y.; Lu, Y. Aqueous Synthesis of Hierarchical Bismuth Nanobundles with High Catalytic Activity to Organic Dyes. *Superlattices and microstructures* **2015**, *83*, 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2015.03.052>.
- (97) Reverberi, A. Pietro; Varbanov, P. S.; Lauciello, S.; Salerno, M.; Fabiano, B. An Eco-Friendly Process for Zerovalent Bismuth Nanoparticles Synthesis. *J. Clean. Prod.* **2018**, *198*, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.011>.
- (98) Brown, A. L.; Goforth, A. M. PH-Dependent Synthesis and Stability of Aqueous, Elemental Bismuth Glyconanoparticle Colloids: Potentially Biocompatible X-Ray Contrast Agents. *Chem. Mater.* **2012**, *24* (9), 1599–1605. <https://doi.org/10.1021/cm300083j>.
- (99) Fu, R.; Xu, S.; Lu, Y.-N.; Zhu, J.-J. Synthesis and Characterization of Triangular Bismuth Nanoplates. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5* (4), 1379–1385.
- (100) Ma, D.; Zhao, J.; Zhao, Y.; Hao, X.; Li, L.; Zhang, L.; Lu, Y.; Yu, C. Synthesis of Bismuth Nanoparticles and Self-Assembled Nanobelts by a Simple Aqueous Route in Basic Solution. *Colloids Surf. A* **2012**, *395*, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.055>.
- (101) Xia, F.; Xu, X.; Li, X.; Zhang, L.; Zhang, L.; Qiu, H.; Wang, W.; Liu, Y.; Gao, J.



- Preparation of Bismuth Nanoparticles in Aqueous Solution and Its Catalytic Performance for the Reduction of 4-Nitrophenol. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, 53 (26), 10576–10582. <https://doi.org/10.1021/ie501142a>.
- (102) Ma, D.; Zhao, J.; Zhao, Y.; Hao, X.; Lu, Y. An Easy Synthesis of 1D Bismuth Nanostructures in Acidic Solution and Their Photocatalytic Degradation of Rhodamine B. *Chem. Eng. J.* **2012**, 209, 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.08.021>.
- (103) Wang, Y.; Zhao, J.; Zhao, X.; Tang, L.; Li, Y.; Wang, Z. A Facile Water-Based Process for Preparation of Stabilized Bi Nanoparticles. *Mater. Res. Bull.* **2009**, 44 (1), 220–223. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2008.03.026>.
- (104) Gutiérrez, M.; Henglein, A. Nanometer-Sized Bi Particles in Aqueous Solution: Absorption Spectrum and Some Chemical Properties. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100 (18), 7656–7661. <https://doi.org/10.1021/jp953774o>.
- (105) Dai, Y.; Song, Y. Facile Synthesis and Shape Control of Bismuth Nanoflowers Induced by Surfactants. *Chem. Phys. Lett.* **2014**, 591, 126–129. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.11.018>.
- (106) Jiao, L.; Li, Q. Q.; Deng, J.; Okosi, N.; Xia, J.; Su, M. Nanocellulose Templated Growth of Ultra-Small Bismuth Nanoparticles for Enhanced Radiation Therapy. *Nanoscale* **2018**, 10 (14), 6751–6757. <https://doi.org/10.1039/c7nr06462d>.
- (107) Brown, A. L.; Naha, P. C.; Benavides-montes, V.; Litt, H. I.; Goforth, A. M.; Cormode, D. P. Synthesis, X - Ray Opacity, and Biological Compatibility of Ultra-High Payload Elemental Bismuth Nanoparticle X - Ray Contrast Agents. *Chem. Mater.* **2014**, 26, 2266–2274.
- (108) McClements, D. J. Nanoemulsions versus Microemulsions: Terminology, Differences, and Similarities. *Soft Matter* **2012**, 8 (6), 1719–1729. <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>.
- (109) Brochette, P. Emulsification-Élaboration Et Étude Des Émulsions. *Tech. l'Ingénieur* **2013**, 1–28.
- (110) Li, Q.; Jonas, U.; Zhao, X. S.; Kappl, M. The Forces at Work in Colloidal Self Assembly: A Review on Fundamental Interactions between Colloidal Particles. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* **2008**, No. 3, 258–261. <https://doi.org/10.1002/apj>.
- (111) Ivano, I. B.; Dekker, M. Thin Liquid Film: Fundamentals and Applications. *AIChE* **1989**, 35 (8), 1403–1404.
- (112) Sancey, L.; Lux, F.; Kotb, S.; Roux, S.; Dufort, S.; Bianchi, A.; Crémillieux, Y.; Fries,



- P.; Coll, J. L.; Rodriguez-Lafrasse, C.; et al. The Use of Theranostic Gadolinium-Based Nanoprobes to Improve Radiotherapy Efficacy. *Br. J. Radiol.* **2014**, 87 (1041), 1–15. <https://doi.org/10.1259/bjr.20140134>.
- (113) Khan, F. M.; Gibbons, J. P. *The Physics of Radiation Therapy*, Lippincott.; 2010.
- (114) Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M. The Use of Gold Nanoparticles to Enhance Radiotherapy in Mice. *Phys. Med. Biol.* **2004**, 49, N309–N315. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/18/N03>.
- (115) Seino, S.; Kinoshita, T.; Otome, Y.; Okitsu, K.; Nakagawa, T.; Yamamoto, T. A. Magnetic Composite Nanoparticle of Au/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Synthesized by Gamma-Ray Irradiation. *Chem. Lett.* **2003**, 32 (8), 690–691. <https://doi.org/10.1246/cl.2003.690>.
- (116) nhtheraguix.com.
- (117) www.nanobiotix.com.
- (118) Yang, S.; Li, Z.; Wang, Y.; Fan, X.; Miao, Z.; Hu, Y.; Li, Z.; Sun, Y.; Besenbacher, F.; Yu, M. Multifunctional Bi @ PPy-PEG Core – Shell Nanohybrids for Dual- Modal Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Appl. Mater interfaces* **2018**, 10, 1605–1615. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17838>.
- (119) ICH steering committee. Impurities: Guideline for Residual Solvent [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C\\_R6\\_\\_Step\\_2](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C_R6__Step_2).
- (120) Liu, J.; Qin, G.; Raveendran, P.; Ikushima, Y. Facile “Green” Synthesis, Characterization, and Catalytic Function of  $\beta$ -D-Glucose-Stabilized Au Nanocrystals. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12 (8), 2131–2138. <https://doi.org/10.1002/chem.200500925>.
- (121) Chen, S.; Kimura, K. Synthesis and Characterization of Carboxylate-Modified Gold Nanoparticle Powders Dispersible in Water. *Langmuir* **1999**, 15 (4), 1075–1082. <https://doi.org/10.1021/la9812828>.
- (122) Aurich, A.; Förster, A.; Mauersberger, S. Citric Acid Production from Renewable Resources by *Yarrowia Lipolytica*. *Int J. Bacteriol* **2003**, 1.
- (123) Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential – What They Are and What They Are Not? *J. Control. Release* **2016**, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- (124) Bach, N. Pouvoirs Floculants de Quelques Électrolytes. *J. Phys. Chem.* **1920**, 18. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(15\)00734-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(15)00734-4).
- (125) Presne, Cl.; Fakhouri, F.; Noël, L.-H.; Granger, B.; Grünfeld, J.-P. La Toxicité Rénal Du Lithium: Une Réévaluation. *Thérapeutique* **2004**, II (3), 39–45.



- (126) Aronica, C.; Jeanneau, E. Diffraction Des Rayon x <http://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/Diffraction-rayons-X-techniques-determination-structure.xml>.
- (127) Thermo scientific XPS <https://xpssimplified.com/>.
- (128) Adamczyk, Z.; Oc, M.; Mrowiec, H.; Walas, S.; Lupa, D. Oxidative Dissolution of Silver Nanoparticles : A New Theoretical Approach. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *469*, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.12.051>.
- (129) Faisal, M.; Ismail, A. A.; Harraz, F. A.; Bouzid, H.; Al-sayari, S. A.; Al-hajry, A. Highly Selective Colorimetric Detection and Preconcentration of Bi (III) Ions by Dithizone Complexes Anchored onto Mesoporous TiO<sub>2</sub>. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-62>.
- (130) Makgwane, P. R.; Ray, S. S. Synthesis of Nanomaterials by Continuous-Flow Microfluidics: A Review. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14* (2), 1338–1363. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9129>.
- (131) Lohse, S. E.; Eller, J. R.; Sivapalan, S. T.; Plews, M. R.; Murphy, C. J. A Simple Millifluidic Benchtop Reactor System for the High-Throughput Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles with Different Sizes and Shapes. *ACS Nano* **2013**, *5*, 4135–4150. <https://doi.org/10.1021/nn4005022>.
- (132) Nishioka, M.; Miyakawa, M.; Kataoka, H.; Koda, H.; Sato, K.; Suzuki, T. M. Continuous Synthesis of Monodispersed Silver Nanoparticles Using a Homogeneous Heating Microwave Reactor System. *Nanoscale* **2011**, *3* (6), 2621–2626. <https://doi.org/10.1039/c1nr10199d>.
- (133) Horikoshi, S.; Abe, H.; Torigoe, K.; Abe, M.; Serpone, N. Access to Small Size Distributions of Nanoparticles by Microwave-Assisted Synthesis. Formation of Ag Nanoparticles in Aqueous Carboxymethylcellulose Solutions in Batch and Continuous-Flow Reactors. *Nanoscale* **2010**, *2* (8), 1441–1447. <https://doi.org/10.1039/c0nr00141d>.
- (134) Dzido, G.; Markowski, P.; Małachowska-Jutcz, A.; Prusik, K.; Jarzębski, A. B. Rapid Continuous Microwave-Assisted Synthesis of Silver Nanoparticles to Achieve Very High Productivity and Full Yield: From Mechanistic Study to Optimal Fabrication Strategy. *J. Nanoparticle Res.* **2015**, *17* (1). <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2843-y>.
- (135) Harada, M.; Cong, C. Microwave-Assisted Polyol Synthesis of Polymer- Protected Monometallic Nanoparticles Prepared in Batch and Continuous-Flow Processing. *Ind*



- Eng. Chem. Res.* **2016**, *55* (19), 5634–5643. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b00991>.
- (136) Bayazit, M. K.; Yue, J.; Cao, E.; Gavrilidis, A.; Tang, J. Controllable Synthesis of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution by Microwave Assisted Flow Chemistry. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (12), 6435–6442. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01149>.
- (137) Garagalza. Polymérisation Radicalaire En Continu Dans Un Systeme Millifluidique Assistée Par Micro-Ondes. *Univ. PAU des Pays l'Adour* **2013**, 1–192.
- (138) Cagan, V. Synthèse de Nanoparticules de Bismuth En Flux Continu. *mémoire d'ingénieur* **2018**, Confidentiel.
- (139) Tsukahara, Y.; Higashi, A.; Yamauchi, T.; Nakamura, T.; Yasuda, M.; Baba, A.; Wada, Y. In Situ Observation of Nonequilibrium Local Heating as an Origin of Special Effect of Microwave on Chemistry. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (19), 8965–8970. <https://doi.org/10.1021/jp100509h>.
- (140) Horikoshi, S.; Osawa, A.; Suttisawat, Y.; Abe, M.; Serpone, N. A Novel Dewar-like Reactor for Maintaining Constant Heat and Enhancing Product Yields during Microwave-Assisted Organic Syntheses. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14* (6), 1453–1456. <https://doi.org/10.1021/op100181u>.
- (141) Asakuma, Y.; Munenaga, T.; Nakata, R. Observation of Bubble Formation in Water during Microwave Irradiation by Dynamic Light Scattering. *Heat Mass Transf.* **2016**, *52* (9), 1833–1840. <https://doi.org/10.1007/s00231-015-1703-3>.
- (142) Maire, I. Le Système Lysosomal Dans La Protéolyse : Panorama Des Maladies Lysosomiales. *Bull. Acad. Natle Méd* **2012**, *196*, 1561–1574.
- (143) LaB, T. Théorie de La Diffusion Multiple de La Lumière. *Mode d'emploi* **2015**.
- (144) Xu, L.; Liang, H. W.; Yang, Y.; Yu, S. H. Stability and Reactivity: Positive and Negative Aspects for Nanoparticle Processing. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 3209–3250. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00208>.
- (145) Stewart, M. H.; Susumu, K.; Mei, B. C.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Blanco-canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. Multidentate Polyethylene Glycol: Ligands Provide Colloidal Stability to Semiconductor and Metallic Nanocrystals in Extreme Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9804–9813.
- (146) Wang, J.; Wang, X.; Peng, Q.; Li, Y. Synthesis and Characterization of Bismuth Single-Crystalline Nanowires. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (23), 7552–7556.
- (147) Hernandez-delgadillo, R.; Angel-mosqueda, C. D. E. L.; Solís-soto, J. M.; Munguia-



- moreno, S.; Pineda-aguilar, N.; Sánchez-nájera, R. I. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of MTA Supplemented with Bismuth Lipophilic Nanoparticles. *Dent. Mater. J.* **2017**, *36* (4), 503–510. <https://doi.org/10.4012/dmj.2016-259>.
- (148) Mei, B. C.; Oh, E.; Susumu, K.; Farrell, D.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi, H. Effects of Ligand Coordination Number and Surface Curvature on the Stability of Gold Nanoparticles in Aqueous Solutions. *Langmuir* **2009**, *25* (16), 10604–10611. <https://doi.org/10.1021/la901423z>.
- (149) Mei, B. C.; Susumu, K.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi, H. Modular Poly ( Ethylene Glycol ) Ligands for Biocompatible Semiconductor and Gold Nanocrystals with Extended PH and Ionic Stability. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4949–4958. <https://doi.org/10.1039/b810488c>.
- (150) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L. Vander; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (151) Hervé, K.; Douziech-Eyrolles, L.; Munnier, E.; Cohen-Jonathan, S.; Soucé, M.; Marchais, H.; Limelette, P.; Warmont, F.; Saboungi, M. L.; Dubois, P.; et al. The Development of Stable Aqueous Suspensions of PEGylated SPIONs for Biomedical Applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *19*, 465608–465615. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/46/465608>.
- (152) Turcu, I.; Zarafu, I.; Popa, M.; Chifiriuc, M.; Bleotu, C.; Culita, D.; Ghica, C.; Ionita, P. Lipoic Acid Gold Nanoparticles Functionalized with Organic Compounds as Bioactive Materials. *Nanomaterials* **2017**, *7* (2), 43. <https://doi.org/10.3390/nano7020043>.
- (153) Zopes, D.; Stein, B.; Mathur, S.; Graf, C. Improved Stability of “ Naked ” Gold Nanoparticles Enabled by in Situ Coating with Mono and Multivalent Thiol PEG Ligands. *Langmuir* **2013**, *29*, 11217–11226. <https://doi.org/10.1021/la4012058>.
- (154) Sun, Y.; Zhang, W.; Ma, J.; Pang, H.; Wang, H. Overproduction of  $\alpha$  -Lipoic Acid by Gene Manipulated Escherichia Coli. *PLoS One* **2017**, *12* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169369>.
- (155) Packer, L.; Witt, E. H.; Tritschler, H. J. Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant. *Pergamon* **1995**, *19* (2), 227–250.
- (156) Gurer, H.; Ozgunes, H.; Oztezcan, S.; Ercal, N. Antioxidant Role of Alpha Lipoic Acid



- in Lead Toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 27 (99), 75–81.
- (157) Shay, K. P.; Moreau, R. F.; Smith, E. J.; Smith, A. R.; Hagen, T. M. Alpha-Lipoic Acid as a Dietary Supplement : Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1790, 1149–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.026>.
- (158) Creighton, J. A.; Eadon, D. G. Ultraviolet–Visible Absorption Spectra of the Colloidal Metallic Elements. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1991**, 87 (24), 3881–3891. <https://doi.org/10.1039/FT9918703881>.
- (159) Vilain, C.; Goettmans, F.; Moores, A.; Le FLoch, P.; Sanchez, C. Study of Metal Nanoparticles Stabilised by Mixed Ligand Shell : A Striking Blue Shift of the Surface-Plasmon Band Evidencing the Formation of Janus Nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 3509–3514. <https://doi.org/10.1039/b706613a>.
- (160) Moore, T. L.; Rodriguez-lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothenrutishauser, B.; Petri-fink, A. Nanoparticle Colloidal Stability in Cell Culture Media and Impact on Cellular Interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 6287–6305. <https://doi.org/10.1039/C4CS00487F>.
- (161) Vangijzegem, T.; Stanicki, D.; Boutry, S.; Paternoster, Q.; Elst, L. Vander; Muller, R. N.; Laurent, S. VSION as High Fi Eld MRI T 1 Contrast Agent: Evidence of Their Potential as Positive Contrast Agent for Magnetic Resonance Angiography. *Nanotechnology* **2018**, 29 (26), 265103–265117. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aabbd0>.
- (162) Yang, C.; Gao, S.; Dagnaes-hansen, F.; Jakobsen, M.; Kjems, J. Impact of PEG Chain Length on the Physical Properties and Bioactivity of PEGylated Chitosan / SiRNA Nanoparticles in Vitro and in Vivo. *ACS Appl. Mater interfaces* **2017**, 9 (14), 12203–12216.
- (163) Vauthier, C.; Couvreur, P. Nanotechnologies Pour La Thérapeutique et Le Diagnostic. *Tech. l'ingénieur* **2016**.
- (164) Aidan G. Young, †; David P. Green, ‡; and A. James McQuillan\*, †. Infrared Spectroscopic Studies of Monothiol Ligand Adsorption on CdS Nanocrystal Films in Aqueous Solutions. *Langmuir* **2007**, 22 (26), 11106–11112. <https://doi.org/10.1021/la061999s>.
- (165) Holthoff, H.; Egelhaaf, S. U.; Borkovec, M.; Schurtenberger, P.; Sticher, H. Coagulation Rate Measurements of Colloidal Particles by Simultaneous Static and Dynamic Light Scattering. *Langmuir* **1996**, 12, 5541–5549.



- (166) Segota, S.; Vojta, D.; Kendziora, D.; Ahmed, I.; Fruk, L.; Baranovic, G. Ligand-Dependent Nanoparticle Clustering within Lipid Membranes Induced by Surrounding Medium. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (16), 5208–5219. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00898>.
- (167) Gentilini, C.; Evangelista, F.; Rudolf, P.; Franchi, P.; Lucarini, M.; Pasquato, L. Water-Soluble Gold Nanoparticles Protected by Fluorinated Amphiphilic Thiolates. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15678–15682. <https://doi.org/10.1002/adma.200703158>.
- (168) Gomez, C.; Port, M.; Hallot, G. Bismuth Metallic (0) Nanoparticles, Process of Manufacturing and Uses Thereof. *EP 18 305 851.0* **2018**.
- (169) Montagne, F.; Mondain-monval, O.; Pichot, C.; Mozzanega, H.; Elaïssari, A. Preparation and Characterization of Narrow Sized (o/w) Magnetic Emulsion. *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, *250*, 302–312.
- (170) Montagne, F.; Braconnot, S.; Monval, O. M.; Pichot, C.; Elaïssari, A. Colloidal and Physicochemical Characterization of Highly Magnetic O/W Magnetic Emulsions. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2003**, *24* (6), 821–822. <https://doi.org/10.1081/DIS-120025550>.
- (171) Liu, J.; Lawrence, E. M.; Wu, A.; Ivey, M. L.; Flores, G. A.; Javier, K.; Bibette, J.; Richard, J. Field-Induced Structures in Ferrofluid. *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *74* (14), 2828–2832.
- (172) IOI Oleochemical <https://www.ioioleo.de/en/products/pharma/miglyol-812-n.php>.
- (173) Lipoid <http://www.lipoid.com/en/compounds-phosphatidylcholine>.
- (174) Chaumeil, J.; Brossard, D. Stabilité Des Émulsions Lipidiques Utilisées En Nutrition Parentérale. *Nutr. Clin. Métabol* **1993**, *7*, 55–64.
- (175) Microfluidics. Microfluidizer Processor User Guide. *Mode d'emploi*. 2008, pp 1–11.
- (176) Patel, H. R.; Patel, R. P.; Patel, M. M. Poloxamers: A Pharmaceutical Excipients with Therapeutic Behaviors. *Int J. PharmTech Res.* **2009**, *1* (2), 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2011.03.025>.
- (177) Schmolka, I. R. A Review of Block Polymer Surfactants. *J. Am. Oil Chem. ' Soc.* **1977**, *54* (3), 110–116. <https://doi.org/10.1007/BF02894385>.
- (178) Clark, L. C.; Gollan, F. Survival of Mammals Breathing Organic Liquids Equilibrated with Oxygen at Atmospheric Pressure. *Science*. **1966**, *152*, 1755–1756.
- (179) Riess, J. G. Oxygen Carriers (“Blood Substitutes”)-Raison d’Etre, Chemistry, and Some Physiology. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2797–2919.
- (180) Kabalnov, A.; Wennerstro, H. Macroemulsion Stability: The Oriented Wedge Theory



- Revisited. *Langmuir* **1996**, *12* (2), 276–292.
- (181) Thao, D.; Arlauskas, R. A.; Weers, J. G. Characterization of the Lipophilicity of Fluorocarbon Derivatives Containing Halogens or Hydrocarbon Blocks. *J. Fluor. Chem.* **1996**, *78*, 155–163.
- (182) [https://Www.Anses.Fr/Fr/Content/Exposition-Aux-Nanoparticules-D%E2%80%99argent-Mise- %C3%A0-Jour-Des-Connaissances](https://Www.Anses.Fr/Fr/Content/Exposition-Aux-Nanoparticules-D%E2%80%99argent-Mise-%C3%A0-Jour-Des-Connaissances).
- (183) Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Size-Controlled Silver Nanoparticles Synthesized over the Range 5-100 Nm Using the Same Protocol and Their Antibacterial Efficacy. *RSC Adv.* **2014**, *4* (8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>.
- (184) Kaplan, I. G.; Miterev, A. M.; Sukhonosov, V. Y. Simulation of the Primary Stage of Liquid Water Radiolysis. *Int J. Radiat. Appl. Instrumentation* **1990**, *36* (3), 493–498. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(90\)90039-K](https://doi.org/10.1016/1359-0197(90)90039-K).
- (185) Buxton, G. V. The Radiation Chemistry of Liquid Water: Principles and Applications. *New York, USA* **2003**.
- (186) Dobranowski, J. Guide d'introduction à l'imagerie Médicale. *l'association des raidiologistes du Canada* **2015**, 1–25.
- (187) Notre Dame Radiation Laboratory Data Center.
- (188) Attri, P.; Kim, Y. H.; Park, D. H.; Park, J. H.; Hong, Y. J.; Uhm, H. S.; Kim, K. N.; Fridman, A.; Choi, E. H. Generation Mechanism of Hydroxyl Radical Species and Its Lifetime Prediction during the Plasma-Initiated Ultraviolet (UV) Photolysis. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (9332), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep09332>.
- (189) Lesser, M. P. Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.* **2006**, *68* (1), 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>.
- (190) Sicard-Roselli, C.; Brun, E.; Gilles, M.; Baldacchino, G.; Kelsey, C.; McQuaid, H.; Polin, C.; Wardlow, N.; Currell, F. A New Mechanism for Hydroxyl Radical Production in Irradiated Nanoparticle Solutions. *Small* **2014**, *10* (16), 3338–3346. <https://doi.org/10.1002/sml.201400110>.
- (191) Rahman, D. S.; Deb, S.; Ghosh, S. K. Relativity of Electron and Energy Transfer Contributions in Nanoparticle-Induced Fluorescence Quenching. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (48), 27145–27155. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08466>.
- (192) Hug, S. J.; Canonica, L.; Wegelin, M.; Gechter, D.; Von Gunten, U. Solar Oxidation



## Références

- and Removal of Arsenic at Circumneutral PH in Iron Containing Waters. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35 (10), 2114–2121. <https://doi.org/10.1021/es001551s>.
- (193) Kim, J.; Sim, G.; Bae, J.; Oh, J.; Lee, G.; Lee, D.; Lee, B.; Pyo, H. Synthesis and Anti-Melanogenic Effects of Lipoic Acid – Polyethylene Glycol Ester. *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, 60, 863–870. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.7.0007>.
- (194) Lu, C.; Kim, B.; Yun, K. Design , Synthesis and Evaluation of PEGylated Lipoic Acid Derivatives with Functionality as Potent Anti-Melanogenic Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46 (10), 5184–5188. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.056>.
- (195) Aldeek, F.; Muhammed, M. A. habeeb; Palui, G.; Zhan, N.; Mattoussi, H. Growth of Highly Fluorescent Polyethylene Glycol and Zwitterion Functionalized Gold Nanoclusters. *ACS Nano* **2013**, 7 (3), 2509–2521. <https://doi.org/10.1021/nn305856t>.



## Références



## Références



# Annexes







### *5.1 Annexe 1 : chapitre de livre*

#### **Volume VIII : Spherical Bismuth Metallic Nanoparticles**

Catherine Gomez, Gauthier Hallot, Marc Port\*

Marc Port, Professor, [marc.port@lecnam.net](mailto:marc.port@lecnam.net), +33 1 40 27 20 13, corresponding author

Catherine Gomez, Assistant Professor, [catherine.gomez@lecnam.net](mailto:catherine.gomez@lecnam.net), +33 1 40 27 26 14

Gauthier Hallot, PhD student, [gauthier.hallot@lecnam.net](mailto:gauthier.hallot@lecnam.net)

#### **Keywords**

Bismuth metallic nanoparticles, bismuth, green chemistry, synthesis, reductive agents, capping agents, characterization, medical applications

#### **Abstract**

Numerous studies are published on the synthesis and characterization of bismuth oxide or bismuth sulphide nanoparticles. Only a few works are dealing with the synthesis and applications of spherical bismuth metallic nanoparticles. However this field of research is emerging and so in this chapter, different strategies to synthesize spherical metallic bismuth nanoparticles are reviewed. Two pathways are referenced the top-down and, more described, bottom-up approaches. All procedures are critically compared to show how they could be improved and directed towards greener strategies. The different capping agents (polymers, hydrophilic or hydrophobic monomers) used to control size, morphology and stability of these nanoparticles are discussed as well as the choice of solvent. The relevance of heating techniques (classical heating or irradiation under microwaves) and purification are compared to green processes. Finally bismuth metallic nanoparticles are discussed in different medical applications such as theranostic applications as X-ray contrast agent or X-ray radiosensitizers.

#### **Introduction**

Numerous studies are published on synthesis and characterization of bismuth oxide or bismuth sulphide nanoparticles. Only recently about fifty publications are dealing with synthesis and applications of bismuth metallic (0) nanoparticles (Bi NPs). In this chapter, potential medical applications of Bi NPs are described and explained. Then chemical syntheses, purification methods and characterization of Bi NPs are presented. Finally, the different strategies used to prepare Bi NPs are critically discussed in light of green chemistry principles applied to nanoparticles.

#### **Medical application of bismuth nanoparticles**

Bismuth is a diamagnetic semimetal with a very small band gap. This material shows several properties such as high magnetoresistance, thermal conductivity and high anisotropic electronic behavior (Wang 2008). The vast majority of articles describe electronic applications for Bi NPs because as the size is decreased, Bi could transfer from semimetal to semiconductor (Wang 2008). This property is linked to quantum confinement, which gives a thermoelectric efficiency at room temperature (Wang 2004). Bi NPs are also studied in order to obtain chemical catalysts. Xia has recently synthesized and proven efficiency of Bi NPs by reducing the 4-nitrophenol with NaBH<sub>4</sub> (Xia 2014). On the other hand, Cui has characterized photocatalytic activity of Bi NPs (Cui 2015).



Surprisingly, quite few medical applications are described for Bi NPs whereas bismuth element is characterized by the highest X-ray absorption compared to other heavy metals with any given energy of the incident X-ray photons. So these Bi NPs could have a huge interest in medical applications but this X-ray absorption property is rarely studied in literature.

In a pioneering work published in 2012, Hossain has described an innovative technique based on nanoparticles use (Hossain 2012). An integrated enrichment, early detection and eradication of circulating tumor cells, which is still a major problem in cancer metastasis management, are included in this new technique. In this work, two kinds of nanoparticles are considered: superparamagnetic Fe oxide NPs and Bi NPs. The first localizes circulating tumor cells in a small area with a micro magnet and the second both detects circulating tumor cells by X-ray fluorescence and selectively kills these cells by X-ray radiations. Both Fe and Bi NPs are conjugated with folic acid to target folate receptors overexpressed on cancer cells surface. The proof of concept is demonstrated *in vitro* for this approach combining these two functionalized nanoparticles.

The aim of radiotherapy is to deliver a lethal dose to tumor cells by avoiding healthy tissues at the same time. However, this aim is complicated as healthy and cancerous tissues have similar mass energy absorption characteristics. One approach to increase sensitivity of cancerous cells to radiation is the use of heavy-element (high Z) nanoparticles. Indeed, elements such as gold, silver or platinum incorporated to nanoparticles have a large cross-section for X-ray absorption and photoelectron generation. These nanoparticles significantly increase deposited dose in their vicinity because of their high-energy absorption coefficients. This phenomenon is amply demonstrated in particular with gold nanoparticles (Yang 2015). Recently, Hossain has made a mathematical modelization to evaluate performance of nanoparticles series (bismuth, gold and platinum) as radiosensitizers (Hossain 2012). Mathematical models quantify dose enhancement factor (DEF), which represent the ratio of delivered dose to cells with and without nanoparticles. According to this modelization, Bi NPs should provide higher dose enhancements than Au and Pt NPs for a given nanoparticle size, concentration and location. Unfortunately to our knowledge, no experimental work *in vitro* or *in vivo* has yet confirmed validity of these predictive data.

Following same physical principle, nanoparticles of heavy elements are used as radiosensitizers to eliminate bacteria. Free radicals and photoelectrons, generated by efficient X-ray irradiation of nanoparticles, contribute to significant DNA damage in bacteria. This methodology has also a great potential to kill bacteria deeply buried underneath the dermis owing to high penetration of X-rays. This bactericidal approach is used with success by Luo (Luo 2013). Indeed, under a low X-rays dose, a radiosensitizer composed of Bi NPs and conjugated to an antibody to specifically target bacterial surfaces is tested to kill Multi Drug Resistant (MDR) bacteria. The proof of concept of this methodology is demonstrated *in vitro* on MDR *Pseudomonas aeruginosa*. In this study, Bi NPs efficiency is proved. Indeed, at a concentration of 200  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , localized X-ray dose is 35 times higher compared to control without nanoparticles.

Bismuth compounds are attractive to design new X-ray contrast agents (XCA). Indeed, because of a high atomic number ( $Z = 83$ ), X-ray opacity is enhanced compared to, clinically approved, iodine-based ( $Z = 53$ ) or barium ( $Z=56$ ) contrast agents (Lusic 2013). Moreover, bismuth is moderately abundant, quite inexpensive and described as biocompatible. Bismuth is used in medicine and administrated at high dose. For example, Pepto Bismol, used for relief of diarrhea or upset stomach due to overindulgence in food and drink, contains milligram quantities of complexed bismuth (III) salicylate in a single dose (Bierer, 1990).



The potential of radiopaque nanoparticles is recently explored as high contrast, long-circulating (blood pool), XCA. Indeed, nanosized contrast agents are proposed for vessel imaging. Nanoparticles increase blood residence time by limiting the “leakage” across the capillary vessels (Lusic 2013, Lee 2013, Liu 2012 and Shilo 2012).

Bi NPs are attractive as XCAs because they contain a large number (hundreds or more) of X-ray attenuating atoms in a relatively small volume (high density and important concentration of X-ray opaque atoms). This high density of bismuth is a huge advantage for intravenous administration at low concentrations in Bi NPs and could also enhance efficiency of X-ray properties. Bismuth is sometimes compared to well-studied Au NPs easily synthesized in different sizes and morphologies (Yang 2015). However, the ease of synthesis and morphological control have demonstrated that Au NPs have clearly a huge advantage even if gold is currently about 2000 times more expensive than bismuth.

Bismuth oxide ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ) or bismuth sulphide ( $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ) nanoparticles are extensively studied in imaging. However, to obtain efficient molecular imaging, a high quantity of metal atoms must be contained inside nanoparticles. So the drawback of  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  or  $\text{Bi}_2\text{S}_3$  is the lower concentration of bismuth atoms per particle and thus imaging contrast are less important. Moreover, low stability and aggregation of such particles are stimulated in physiologic environment. Instability of  $\text{Bi}_2\text{S}_3$  in aqueous media is a problematic phenomenon because a hydrolysis is observed and leads to hydrogen sulphide ( $\text{H}_2\text{S}$ ), a toxic gas, which may be formed *in vivo*. Only three recent studies have demonstrated the potential of metallic Bi NPs as XCA. In 2014, Brown has described Bi NPs synthesis coated by D-glucose (Brown 2014). They contain ~6 million bismuth atoms per nanoparticle and are characterized by a very dense bismuth core constituting the majority (~60%) of each particle's volume. Under physiological conditions, Bi NPs are expected to be instable and decomposed by oxidation towards soluble bismuth (III) species. This instability property could have a main impact on Bi NPs pharmacokinetic and toxicity. Indeed, Bi NPs should provide long circulation times based on the large molecular volume of nanoparticles. However, their physiological instability could prevent their bioaccumulation promoting a renal clearance *via* excretion of soluble bismuth (III) ions. Biocompatibility of these Bi NPs is studied through cell viability experiments using MTS assays. Preliminary *in vitro* results suggest a good biological compatibility even if *in vivo* studies are needed to confirm this first analysis. In addition, quantitative computed tomography (CT) in phantom and *in vitro* imaging studies have demonstrated that Bi NPs coated by D-glucose have greater X-ray opacity than clinical iodinated contrast agents (iopamidol) at same concentration.

In 2016, Wei has reported the preparation of highly monodisperse aqueous Bi NPs coated by polymerized D-glucose (Wei 2016). These Bi NPs are stable after 3 days incubation in simulated body fluid at pH 2.2 for stomach and pH 8.0 for small intestine. Their low cytotoxicity, toxicity *in vivo* and stability allow to administer Bi NPs orally to mice to achieve CT imaging in the Gastrointestinal (GI) tract. After administration of Bi NPs, upper and lower GI tract are visualized with a high contrast. Furthermore, Bi NPs are drained from the GI tract in 2 days in mice. So the possibility of acute organ toxicity is reduced.

Swy has used Poly(DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) to encapsulate Bi NPs (Swy 2014). Resulting encapsulated nanoparticles have a final diameter of 120 nm. After 24 hours in an acidic solution imitating lysosomal media, Bi NPs show nearly 70% degradation whereas in a cytosolic and extracellular fluid imitating media, they exhibit 100% stable. Clinical CT and  $\mu\text{CT}$  imaging demonstrate ability to detect these Bi NPs *ex vivo* in chicken wing forearm.

## 2 Vectorization of bismuth nanoparticles (Bi NPs)



Only two papers have described vectorization of Bi NPs. In the work described by Luo, antibodies targeting bacterial surfaces are conjugated to Bi NPs functionalized by carboxylic acid groups (Luo 2013). The modified nanoparticles are dispersed in phosphate buffer saline solution (PBS, pH 7.4) and react with the amine groups of *Pseudomonas aeruginosa* antibodies. After 3 h with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDCI), the successful conjugation of the antibody is demonstrated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).

Hossain uses a different strategy to conjugate folic acid (FA) to Bi NPs. Firstly, nanoparticles are coated with a silica layer derived from (3-aminopropyl)-triethoxysilane (APTES) (Hossain 2012). Then FA is conjugated to modified nanoparticles in DMSO with *N*-hydroxysuccinimide (NHS) and EDCI as an activator of acid function. After having adjusted pH to 9 and incubated at 37°C for 4h, the suspension is centrifuged. The covalent bond formed between FA and Bi NPs is also confirmed by FTIR.

### 3 Synthesis of bismuth metallic (0) nanoparticles

Two main strategies are described in the literature to synthesize Bi NPs. The first uses a top-down approach to reduce the size of a bulk bismuth material at a nanometer scale by using physical procedures. (<Insert figure 1 here>).

The second uses a bottom-up approach to obtain Bi NPs by combination between bismuth metallic (0) and a capping agent. In this kind of synthesis, bismuth (0) is obtained by a reduction from bismuth (III) or more rarely bismuth (V). Several reductive conditions are described with a wide variety of reductant, solvent, bismuth source. These starting compounds are important to control the kinetic of this first reduction step. A critical supersaturation concentration is then achieved and the nucleation phase begins with the bismuth atoms (0) formation then nuclei of less 1 nm in diameter (Thanh 2014). These nuclei then undergo a phase of growth and stabilization when ions and solutes diffuse from the solution to the nuclei surface (<Insert figure 2 here>). The formation of Bi NPs can also result of Ostwald ripening process in which small Bi NPs are continuously dissolved into the solution and regrow onto the surfaces of large ones in order to minimize the surface energy of the system. Growth and stabilization of these nuclei are highly dependent on capping agents, viscosity of the solvent, temperature, concentration of the reactants and stirring rates. Most bottom-up reactions are described in organic coordinating solvent but Bi NPs are difficult to purify in these conditions. To overcome this problem, some syntheses have recently been described in aqueous media.

#### 3.1 Top-down approach

##### 3.1.1 Synthesis of bismuth metallic (0) nanoparticles by top-down approach.

Synthesis of Bi NPs by the top-down approach is described in three publications. In the top-down approach, bismuth powders of melting-point 271°C are directly melted in a high-boiling-point organic solvent then transformed under stirring to generate molten droplets of metal (<Insert table 1 here>).

Zhao has described a preparation of Bi NPs based upon solution dispersion in paraffin of melted bismuth granules at 280°C during 10 hours (Zhao 2004). Bi NPs are purified by centrifugation and washing in chloroform to remove excess paraffin and have good oil solubility. Spherical shapes are isolated with a mean diameter of 40–50 nm in TEM. These Bi



NPs exhibit the same crystal structure as the bulk bismuth and show an oxidation of the surface, both by X ray diffraction studies. Moreover thermal analyses have shown that bismuth samples contain 76 wt.% of metallic bismuth and at least 9 wt.% of organic contents. Nevertheless, the exact nature of organic coating is not really determined. The procedure is very simple and could be really attractive for scale up. However, published TEM images show considerable heterogeneity of Bi NPs size. This polydispersity may be due to the lack of capping agent and a laborious purification.

Another top-down synthesis, proposed by Wang, produces big drops where bismuth powders (100 mesh) are directly added to boiling (diethylene glycol) (DEG) (241°C) and melted (Wang 2004 and 2006). After the addition of poly(vinylpyrrolidone) (PVP) as capping and stabilizing agent, the reaction mixture is vigorously stirred and emulsified for 20 min. The hot mixture is quenched in cold ethanol then centrifuged to attempt uniform and spherical Bi NPs of 305 nm. In this process, the spherical shape of the metal droplets is retained as a result of an abrupt drop in temperature (Wang 2006). X-ray diffraction (XRD) analysis has showed no oxidation of Bi NPs surface. According to the authors, the size and monodispersity of Bi NPs are believed to be the result of a balanced interplay between several parameters. Indeed, concentration of bismuth precursor, concentration of PVP and thus viscosity of the reaction medium, stirring rate and temperature impact on Bi NPs formation. The authors show a real correlation between particles size and stirring rate. The other parameters are not systematically studied in this work.

### 3.1.2 Top-down approach in a green nanochemistry perspective

In term of green nanochemistry, the top-down approach seems to present some advantages. Experimental protocols are simple, robust, avoid redox chemistry, and are probably suitable for scaling up. Furthermore, the monodispersity and the spherical shape of Bi NPs obtained are remarkable (Wang 2004 and 2006). The three previous studies have demonstrated the possibility to obtain a quite important range of size of Bi NPs according to the selected experimental conditions. Clearly, a systematic study of various reaction parameters governing the modulation of Bi NPs size obtained by this top-down strategy would be of great interest. Nevertheless, the use of an elevated temperature is still problematic and in contradiction with green chemistry principles in terms of energetic efficiency and probably in terms of process safety in an industrial production context.

## 3.2 Bottom-up approach

### 3.2.1 Thermal decomposition

#### 3.2.1.1 Synthesis of bismuth metallic (0) nanoparticles by thermal decomposition

Several procedures are described to synthesize Bi NPs with a high level of monodispersity and controlled sizes by high temperature decomposition. Bismuth salts are solubilized in high boiling organic solvents and different kinds of capping agents are placed around nanoparticles. (<Insert table 2 here>).

- From bismuth salt  $\text{Bi}(\text{N}(\text{SiMe}_3)_2)_3$

The bismuth salt  $\text{Bi}(\text{N}(\text{SiMe}_3)_2)_3$  is frequently used in this strategy as soluble precursor in organic solvents.  $\text{Bi}(\text{N}(\text{SiMe}_3)_2)_3$  is prepared from the reaction between  $\text{BiCl}_3$  and  $\text{Na}(\text{N}(\text{SiMe}_3)_2)_2$  with caution because this compound is sensitive to air, light and heat. Thermolysis of the salt  $\text{Bi}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_3$  leads to elemental bismuth formation, presumably occurred from cleavage of Bi-N bonds.



A first preparation, published by Wang, is described from  $\text{Bi}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_3$ , a solution of bis(trimethylsilyl)amide ( $\text{Na}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]$ ) in THF and a solution of poly(1-hexadecene)<sub>0.67</sub>-co-(1-vinylpyrrolidinone)<sub>0.33</sub> (PHD-co-PVP) in DIPB (1,3-diisopropylbenzene) (Wang 2008). The mixture is heated at 180°C in a dry  $\text{O}_2$  and free atmosphere. No purified deep black Bi NPs are observed at the end of reaction. By varying the amount of  $\text{Bi}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_3$ ,  $\text{Na}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]$  and PHD-co-PVP, the diameter range of quite monodisperse Bi NPs is modulated. If a high PHD-co-PVP concentration is achieved, Bi NPs of 330 nm are observed whereas for a low polymer concentration, sizes of 30-115 nm are obtained. The dependence between bismuth particles size and morphology according to reactants amounts is well summarized on a synthesis space diagram. These experiments are completed by a kinetic study of Bi NPs growth in monitoring size and polydispersity in time (Richards 2011).  $\text{Na}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]$  is shown as a potential nucleation promoter and an initiator of Ostwald ripening.

Thereafter, a simplified process is proposed where  $\text{Bi}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_3$  is prepared *in situ* from bismuth chloride ( $\text{BiCl}_3$ ) (Wang 2010). In this procedure, the bismuth salt is added followed by dry THF, a PHD-co-PVP solution and then  $\text{Na}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]$ . After a thermolysis reaction at 200°C, Bi NPs are obtained without purification step. The quality of Bi NPs is comparable to those previously synthesized from  $\text{Bi}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_3$  precursor. A monodisperse size between 4 to 29 nm is controlled by varying the amounts of  $\text{BiCl}_3$  and  $\text{Na}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]$  employed. Modification of solvent from DIPB to 1-octadecene (ODE) gives monodisperse Bi NPs with smaller mean diameters of 5–15 nm. This difference is attributed to change of solvents viscosity at 200 °C. This shortcut synthesis is very easily scaled up from 5 g to 20 g of Bi NPs solution with a similar control over Bi NPs size and size distribution.

The polymeric capping agent PHD-co-PVP used above is provided by Aldrich with an average  $M_n$  of 2,500 Da, a  $M_p$  of 2800 Da and a polydispersity index (PDI) of 1.9 (Richards 2011, Wang 2010 and Wang 2008). However, this compound is no longer available from Aldrich. Another commercial PHD-co-PVP polymer, Ganex V-216, produced by ISP Technologies, Inc., has a composition and degree of polymerization (DOP) different but is also described as an excellent stabilizer by Wang (Wang 2010).

This difficulty in terms of sourcing polymer is relatively common and stressed the interest to develop synthesis methods using either already produced industrially polymers with established commercial use or non-polymeric capping agents especially for medical applications.

To develop a polymer-free well-controlled preparation of colloiddally stable Bi NPs, Yarema has developed a simple and reproducible synthesis of monodisperse and oleic acid-covered Bi NPs (Yarema 2010). For that purpose, a solution of  $\text{Bi}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_3$  and  $\text{Li}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]$  in toluene is injected at 130°C in hot hexadecylamine (HDA) which plays the role of solvent and a weakly binding capping agent. According to reaction temperature, the size of single-crystalline and spherically shaped Bi NPs is mainly controlled between 11 and 22 nm. These Bi NPs are stabilized by adding oleic acid and then purified by precipitation in ethanol. This reaction uses  $\text{Li}(\text{Et}_3\text{BH})$  as a reducing agent to increase the yield of 10-20% to 30-60% and  $\text{Li}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]$  to control the growth of monodisperse and spherical Bi NPs. Addition of  $\text{Li}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]$  is a key factor to control the growth of monodisperse and spherical Bi NPs. According to the authors, this control is due to the ability of  $\text{N}(\text{SiMe}_3)_2$  groups to coordinate the surface bismuth atoms. This coordinating group is easily cleaved by thermolysis at  $\geq 100^\circ\text{C}$ .

- From subvalent organobismuth  $\text{Bi}_2\text{Et}_4$

A study by Schulz has described the synthesis of monodisperse bismuth nanocubes by thermal decomposition at 170°C of a subvalent organobismuth precursor  $\text{Bi}_2\text{Et}_4$  in presence of two capping agents  $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$  and PVP in a mixture of solvent THF and DIPB. This protocol



does not require any additional reductant because the bismuth-bismuth bond of dibismuthines  $\text{Bi}_2\text{Et}_4$  is weak (Schulz 2012). Indeed undergone disproportionation reactions are easily observed with subsequent formation of elemental bismuth and  $\text{BiEt}_3$  at low temperatures. Nanocubes Bi NPs are purified by centrifugation. According to decomposition studies, formation of 25 nm-sized bismuth nanocubes requires both  $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$  and PVP as size- and shape-selective agents. Indeed in the absence of any of these agents, only large agglomerates are formed, phenomenon strengthened by Ostwald-ripening process.

- From bismuthdodecanethiolate salt  $\text{Bi}(\text{SC}_{12}\text{H}_{25})_3$

Three studies have described thermal decomposition of –

bismuth (III) thiolate. Without reducing agents under moderate temperature (90-150°C), bismuth thiolate undergoes a redox reaction *via* a radical process to generate Bi NPs.

In a first study, the thermolysis of bismuth dodecyl-mercaptide  $\text{Bi}(\text{SC}_{12}\text{H}_{25})_3$  at 140–180° C, for 3 min under vacuum leads to spherical Bi NPs (Carotenuto 2009). The elevated temperature induces a homolytic dissociation of the Bi–S bond to lead an elemental bismuth (0) and  $\text{H}_{25}\text{C}_{12}\text{S}^\bullet$  radicals. These species are combined together to get dodecyl-disulfide  $(\text{SC}_{12}\text{H}_{25})_2$ . This product is an efficient capping agent, which strongly bonds the surface of Bi NPs, preventing their aggregation and significantly reducing their growth rate. The average diameter is highly dependent on thermolysis temperature. Indeed bismuth nanospheres of 601 nm are synthesized at 140 ° C whereas nanospheres of 170 nm are obtained at 180°C. In that case, nucleation can be assumed faster than grain growth at higher temperatures and results in a particle size decrease.

In a second study, bismuth dodecanethiolate  $\text{Bi}(\text{SC}_{12}\text{H}_{25})_3$  gives bismuth nanospheres by thermolysis at 105° in solventless condition with the capping polymer PVP (Wang 2010). The starting compound  $\text{Bi}(\text{SC}_{12}\text{H}_{25})_3$  is formed *in situ* by a reaction between aqueous  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  solution and 1-dodecanethiol  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SH}$  in DMF. After centrifugation, spherical Bi NPs are obtained in a narrow size distribution without aggregation. The experiments reveal size dependencies based on thermolysis temperature. Bi NPs of 100 - 174 nm are obtained at 85°C whereas Bi NPs of 114-214 nm are obtained at 105°C. The temperature effect on Bi NPs size is consequently unclear in this thermal decomposition process. Compared to Carotenuto's results, higher temperatures give an isotropic increase of particle size. An influence of organic capping reagent is also shown in this solventless method. Thus different morphologies are observed: 1-dodecanethiol ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SH}$ ) leads to nanodisks, while PVP to nanospheres. The capping reagent molar ratio affects the morphology while Bi NPs sizes depend on thermolysis temperature and annealing time.

In a third strategy, highly monodisperse spherical Bi NPs are synthesized under vigorous stirring by simple heating at 178°C in one minute (Wei 2016). The initial mixture contains a  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  solution and  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SH}$  without capping agent. In this protocol, 1-dodecanethiol ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SH}$ ) is used at once as ligand, reductant and solvent. In this synthesis, low-melting point metal thiolates are generated and dispersed in 1-dodecanethiol. Then high temperature triggers reduction-based burst nucleation process. After treatment by centrifugation, a highly uniform diameter of 22 nm is obtained for Bi NPs with an excellent monodispersity. From these hydrophobic Bi NPs, a coating of D-glucose as hydrophilic layer is added in basic media *via* an oligomerization.

- From bismuth acetate salt  $\text{Bi}(\text{OAc})_3$

A preparation of Bi NPs is described by thermolysis at 315°C from bismuth acetate  $\text{Bi}(\text{OAc})_3$  in oleylamine (Wang 2014). The size distribution between 30 to 60 nm is improved by quickly cooling of the reaction. Indeed aggregation process is increased at high temperature. The final Bi NPs are isolated after purification by centrifugation. Oleylamine is used as solvent and stabilizer of Bi NPs but is also known as reducing agent.



### 3.2.1.2 Thermal decomposition in a green nanochemistry perspective

From a general point of view, thermal decomposition process can greatly modify Bi NPs size between 3 to 600 nm depending on experimental conditions. Of course, this thermolytic process with very high temperature is not the best in green nanochemistry. Moreover sensitive precursors with undocumented toxicity (except for  $\text{BiCl}_3$ ) and high-boiling point solvents difficult to remove and requiring energy are also used in these syntheses. All these reactions are carried out under anaerobic and anhydrous conditions. The variation of temperature is essential to control size and morphology of Bi NPs. Management specifications of temperature and reaction time will probably be very delicate to apply them to scaling up. The solventless study previously reported is an undeniable advantage in terms of green nanochemistry (Wang 2010). However, this proposed solventless methodology is very dependent on the capping agent to synthesize Bi NPs characterized by well-defined size and morphology.

### 3.2.2 Polyol process

Polyol process is a versatile chemical approach for Bi NPs synthesis with well-defined shapes and controlled sizes. Polyol solvents offer interesting properties. They dissolve inorganic compounds owing to their high dielectric constants. In addition, they offer a wide operating-temperature range (from 25 °C to boiling point) to prepare inorganic nanoparticles owing to their relatively high boiling points. Polyols also serve as reducing agents, which have a great interest because they take place of toxic reducing agents (<Insert table 3 here>).

In polyol process, several bismuth precursors can be used in oxidation state III ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  or  $\text{BiCl}_3$  or  $\text{Bi}(\text{CO}_3)_3$  or  $\text{Bi}(\text{OAc})_3$ ) or in oxidation state (V) ( $\text{NaBiO}_3$ ).

Polyols can also act as stabilizers to control particle growth and to prevent interparticle aggregation. In a typical polyol process, a precursor compound is suspended in a liquid polyol. Then the suspension is stirred and heated to a given temperature eventually until the boiling point of polyol. In this reaction, metal precursor is solubilized in polyol and then an intermediate of soluble bismuth polyolates is formed. When temperature increases, these intermediates are decomposed and release free bismuth ions, rapidly reduced by polyol molecules towards elemental bismuth (0). Then nuclei appear when zero-valent bismuth concentration reaches a critical value.

In the subsequent growth process, these nuclei are able to grow into large crystals, which could serve as the seeds to grow into Bi NPs. At the same time, the small Bi NPs are continuously dissolved into solution and regrow onto the surfaces of large ones as a result of Ostwald ripening.

#### 3.2.2.1 Polyol synthesis from bismuth (III) precursors

Historically, the first polyol synthesis using bismuth (III) precursor is published by Wang's group (Wang 2004). Monodispersed bismuth particles are produced by thermic decomposition from bismuth acetate. The addition of PVP as capping agent in boiling ethylene glycol gives Bi NPs size of 225 nm after 20 minutes of stirring without purification reported. A correlation is established between bismuth acetate concentration, stirring rate and spherical Bi NPs diameter.

- From  $\text{BiCl}_3$

Commercial  $\text{BiCl}_3$  is used as precursor by Wang and Chen groups in a modified polyol process using NaOH, PVP and ethylene glycol (Wang 2008 and Chen 2005). NaOH reacts with  $\text{Bi}^{3+}$  to form water-soluble complexing ions  $\text{BiO}_2^-$ . Then this salt is reduced into bismuth



metal in refluxing ethylene glycol. NaOH is crucial because the reduction rate of reaction is correlated to NaOH quantities and this base controls morphologies but also sizes and yields of bismuth nanomaterials. This synthesis leads only sometimes to get spherical nanoparticles at 160°C when the overall rate is very slow.

- From  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$

In polyol process,  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  is also used with PVP as capping agent and ethylene glycol as solvent and reductant. Without particular precautions, Bi NPs are protected against oxidation owing to the PVP agent. According to concentration of precursor, polydispersity of Bi NPs synthesized at 185°C in air is fluctuating. At high concentration (0.067 M), nanoobjects are polydisperse but at a lower concentration (0.03 M), Bi NPs have a size of 200 to 400 nm after centrifugation (Li 2009).

A similar polyol process at 180°C is employed by Wu using  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ , ethylene glycol and PVP (Wu 2011). This procedure describes PVP as capping agent but also as reducing agent. Only few publications show this property in literature. At the beginning,  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  is prepared in a solution of mannitol (0.1 M) and  $\text{NH}_3$  (5 M). The proportions of PVP and  $\text{Bi}^{3+}$  salt influence the shape and size of Bi NPs. A PVP/ $\text{Bi}^{3+}$  ratio of three is required to get spherical Bi NPs with a diameter of 180 nm after centrifugation. A higher PVP/ $\text{Bi}^{3+}$  ratio gives nanowires whereas no Bi NPs are formed without PVP. This last reaction demonstrates the PVP contribution to the reduction. To explain this process, two main reactions could be considered: firstly direct abstraction of hydrogen atoms from PVP by  $\text{Bi}^{3+}$  ions and secondly reduction of  $\text{Bi}^{3+}$  ions by organic radicals.

A recent work has described polyol process by using microwave irradiation to achieve high temperatures necessary (Safardoust-Hojaghan 2013). From  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  as precursor, reaction parameters are modified such as nature of polyol (propylene glycol or ethylene glycol), irradiation time, pH and reaction time. These factors have a main impact on size and morphology of Bi NPs. Using ethylene glycol as solvent and reducing agent, nitric acid to adjust the pH to 5 and an irradiation time of 10 minutes quasi spherical Bi NPs are obtained at 750W after washing with absolute ethanol and distilled water. Unfortunately no TEM or SEM size are clearly reported.

- From bismuth citrate

Nanospheres described are successfully prepared from bismuth citrate, urea and ethylene glycol as both solvent and reducing agent (Cheng 2009). This synthesis involves a simple refluxing reaction for 2 hours at 198 °C then a purification by centrifugation. Several capping agents poly(vinylpyrrolidone) (PVP), polyethylene glycol (PEG) or cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) are tested. Irregular spherical particles are obtained with CTAB and PEG whereas well-dispersed spherical particles of 500 nm diameter are isolated in the presence of PVP. Indeed, PVP plays an important role as protecting and coating agent on nanospheres surface due to its polar groups and so prevent Bi NPs aggregation.

A fast and simple microwave irradiation method is presented by Wu (Wu 2010). Same precursors bismuth citrate and urea are used in diethylene glycol to obtain Bi NPs. In this procedure, the diethylene glycol is introduced as solvent and reducing agent while no additional capping agent is used because citrate plays this role. The heating of reaction mixture for 20 min gives large quantities of Bi NPs (nearly 100%) after centrifugation. The diameters of most spherical Bi NPs change from 400 to 700 nm. Several parameters control the Bi NPs size in this reaction: the reaction time, urea concentration, bismuth citrate/urea ratio. A long reaction time leads to big Bi NPs whereas a higher ratio gives smaller nanospheres in a narrow size distribution. In addition, the Bi NPs shape is influenced by the precursors choice and urea quantities. Experimental observations show the influence of bismuth salts ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{BiCl}_3$ ) anions on morphologies: irregular spheres and nanoflowers



are isolated in these cases. Consequently, citrate anion is a capping agent but also acts on Bi NPs shape.

A systematic study of polyol pathway is explored at different boiling temperatures (188–350 °C) and from several bismuth precursors: bismuth (III) nitrate, bismuth (III) acetate, bismuth (III) hydroxide and bismuth (III) carbonate without any additional capping agents (Goia 2005). Bismuth salts are converted in elemental bismuth by reduction process *via* a bismuth-polyolate intermediate. This reaction proceeds only if polyol temperature is high enough to exceed temperature of stable intermediate around 216 and 220°C. At these temperatures, intermediates are decomposed to release free bismuth ions, rapidly reduced in metallic bismuth by polyol molecules. The kinetic of conversion is completely dependent on the nature and thermal stability of the intermediate and so is modified according to started bismuth salt nature and polyol boiling temperature. Moreover, polyols with a higher molecular weight are more effective in preventing Bi NPs aggregation. Spherical Bi NPs are finally obtained from 80 nm to several microns after treatment. One example is described where monodisperse spherical Bi NPs in tetraethylene glycol are isolated with an average hydrodynamic diameter of 124 nm from bismuth hydroxide as precursor.

### 3.2.2.2 Polyol synthesis from bismuth (V) precursors

In polyol pathway, the first reduction of bismuth (V) precursor is published by Wang (Wang 2004). The sodium bismuthate ( $\text{NaBiO}_3$ ) is reduced at 180-200°C for 24h in mixed solvents (ethylene glycol and acetone) at different ratios. This easy preparation leads to monodisperse and highly crystalline bismuth nanospheres of around 50 nm (according to the TEM figure of the original publication) obtained after treatment by filtration and washing in ethanol and acetone to remove impurities. Both temperature and solvent ratio control Bi NPs diameters and growth respectively. Indeed ethylene glycol plays the role of reducing agent and solvent, acetone is a solvent and also a capping agent while temperature must be higher than 180°C to form nanospheres. If the capping agent acetone is substituted by PVP, bismuth nanowires are predominant.

Another mixture of solvents absolute ethanol (AE) and ethylene glycol (EG) at different ratios is studied by Zou (Zou 2009). According the ratio EG/AE (3:1 to 1:3) chosen, Bi NPs morphology is modulated. In this protocol, sodium bismuthate ( $\text{NaBiO}_3$ ) is reduced at 200°C for 24h leading to nanospheres after centrifugation. A nanowires shape is promoted when AE quantity is increased in mixed solvents whereas Bi NPs size increases from 85 to 144 nm. The next polyol process describes reduction of  $\text{NaBiO}_3$  in ethylene glycol at 200°C with poly(vinylpyrrolidone) or a trace amount of  $\text{Fe}^{3+}$  (Wang 2006). This protocol shows a correlation between shape/size and molar ratio of PVP/Bi. Bismuth nanocrystals are isolated with an average diameter of 75 nm. The PVP polymer acts to control shape and as stabilizing agent. A molar ratio of five is recommended to get nanospheres whereas the presence of  $\text{Fe}^{3+}$  species promotes single-crystal bismuth nanobelts.

A microwave synthesis has been recently described from  $\text{NaBiO}_3$  as precursor (Estrada Flores 2016). A frequency of 2.64 GHz and different power levels 600 W and 1200 W are used. The solvent ethylene glycol has a high absorption behavior and swift heating (loss tangent of 1.350), perfect for microwaves irradiation. No capping agent is introduced in these reaction conditions. Two dependent parameters control sphere sizes: microwave power level and dissolved precursor concentration. However a high pressure and temperature in supersaturated solution inhibit spheres growth process. Following an easy, economic and efficient microwave procedure, metallic Bi NPs are synthesized from 45 nm to 10  $\mu\text{m}$ .



### 3.2.2.3 Polyol synthesis in a green nanochemistry perspective

Polyols processes have some interest in green nanochemistry prospects. No toxic reducing agent is used because often the solvent plays both the role of solubilizing and reducing agent. In addition, these methods provide access to a wide variety of nanoparticles in size and morphology according to experimental conditions. As demonstrated by Goia, polyol solvent and temperature are key parameters to control size and morphology of Bi NPs (Goia 2005). All temperatures used are large and high ( $> 180^{\circ}\text{C}$ ) to achieve energy efficiency. Moreover, the study of Goia does not use capping agent suggesting polyols adsorption on Bi NPs to confer aqueous solubility (Goia 2005).

The procedure described by Wu is probably the most efficient in terms of green nanochemistry (Wu 2010). Indeed, this synthesis uses an inexpensive, simple and non-polymeric (citrate) capping agent from bismuth citrate. So an aqueous solubility is obtained for Bi NPs. Furthermore, this process using microwave irradiation provides quickly and homogeneously energy through polarization or conduction. A homogeneous nucleation and a shorter growth give quantitative yields and allow to control morphology and size of Bi NPs. Nevertheless, a complementary study of these parameters could be lead to obtain Bi NPs smaller than those described (400 to 700 nm).

### 3.2.3 Reduction process in organic solvents

Numerous Bi NPs preparations are realized in organic solvents. As mentioned above, these syntheses require bismuth (III) precursor to be reduced in bismuth (0). Selected reducing agent, bismuth precursor and solvent play a role in the control of Bi NPs size and morphology. When strong reducing agents are employed, reduction of metal salt occurs quickly before their complete solubilization in the solution. Sometimes, polydisperse particles are observed due to variations in nucleation and growth rates. To address this problem, strong reducing agents with slow kinetics of reduction enable often homogeneous nucleation and growth of Bi NPs in selected experimental conditions. (<Insert table 4 here>).

Many bismuth (III) salt precursors as bismuth (III) thiolate are used but the choice is dependent of their solubility in the employed organic solvent. Sometimes, sonication can be used as preliminary step to improve dispersion and solubilization of bismuth precursors. Their solubility could ensure a better uniformity in particles nucleation, growth and thus a great synthetic control of particles size, distribution, and morphology. Counter ions of bismuth salt are also important to ensure particles nucleation, growth and stabilization in the synthesis procedure.

#### 3.2.3.1 Bismuth (III) thiolate and carboxylate reduction

Bismuth (III) dodecanethiolate and hexanoate are reported as precursors in effective synthesis of Bi NPs.

Spherical Bi NPs are synthesized from bismuth dodecanethiolate precursor, which is generated by a reaction between bismuth neodecanoate and 1-dodecanethiol at  $80^{\circ}\text{C}$  (Son 2011). Modifications of aging temperature, time and amounts of mild reducing agent tri-*n*-octylphosphine (TOP) are operated in order to tune Bi NPs sizes from 6 to 27 nm with narrow size distribution. The synthetic procedure is easy to scale up towards gram quantities of Bi NPs. For example, 3.2 g of Bi NPs (11 nm) could be prepared in a single batch after precipitation and centrifugation.

The procedure, described previously by Son, is further adapted by Swy to obtain Bi NPs coated by dodecanethiolate (Swy 2014). At  $60^{\circ}\text{C}$ , these NPs are isolated after centrifugation



to a size of 38 nm. After incubation in oleic acid, Bi NPs are co-encapsulated with coumarin-6 in poly(DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) by an oil-in-water emulsion process. These Bi NPs surrounded by PLGA have an average diameter of 120 nm and a sensitivity in fluorescence imaging and CT. The PLGA polymer, approved by Food and Drug Administration (FDA) and biodegradable, is attractive in medical applications. However, a mild, transient toxicity from encapsulated Bi NPs is identified in preliminary *in vitro* and *in vivo* assays.

Fang has reported a Bi NPs synthesis at 175°C from bismuth 2-ethylhexanoate in dioctyl ether in which the boiling point is high (Fang 2001). A super hydride  $\text{LiBEt}_3\text{H}$  is used as reducing agent and a mixture of oleic acid and tri-*n*-octylphosphine (TOP) as capping and stabilizing agents. The oleic acid/TOP ratio of 4:1 is crucial to avoid aggregates and essential for an optimal process. Hydrophobic Bi NPs are purified by centrifugation and isolated with a size of 33 nm. Bi NPs size selection is performed by adding ethanol to Bi NPs solution in hexane. A phenomenon of flocculation is observed leading to largest particles splitted by centrifugation. The first fractionation gives Bi NPs of 23 nm and after the sixth fractionation, Bi NPs of 15 nm are selected.

A room temperature process is interestingly proposed by Fanfair. This reduction procedure in dioctyl ether transforms bismuth (III) 2-ethylhexanoate ( $\text{Bi}[\text{OOCCH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}_4\text{H}_9]_3$ ) in Bi NPs with reductive agent  $\text{NaBH}_4$  and TOP as capping agent (Fanfair 2005). A size of 20 nm (diameter) is measured after precipitation and centrifugation of Bi NPs.

Finally, Warren has developed a straightforward and greener synthesis with ambient light but without toxic and strong reducing agent (Warren 2007). Dodecanethiol and bismuth (III) carboxylate such as acetate, 2-ethylhexanoate or oleate are converted into bismuth thiolate. Then bismuth (0) formation is initiated by a ligand-to-metal charge transfer in bismuth thiolate catalyzed by visible light. The photoreaction is performed in THF at room temperature for two weeks to provide quantitative yield after centrifugation. Bi NPs of 9.2 nm are produced with a 1-2 nm amorphous coating identified by electron diffraction suggesting an oxide layer around Bi NPs.

### 3.2.3.2. Bismuth (III) nitrate and chloride reduction

Several Bi NPs syntheses use commercially available bismuth (III) salts such as  $\text{BiCl}_3$  and  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  combined to quite strong reducing agents such as sodium hydride or borohydride ( $\text{NaH}$  and  $\text{NaBH}_4$ ).

Wang has reported the reduction of  $\text{BiCl}_3$  by  $\text{NaBH}_4$  in *N,N*-dimethylformamide (DMF) at room temperature (Wang 2005). The poly-(vinylpyrrolidone) (PVP) is used as polymeric capping agent in synthesis. Main parameters such as molar ratio of  $\text{PVP}/\text{Bi}^{3+}$  and initial concentration of  $\text{BiCl}_3$  influence Bi NPs size and polydispersibility. As demonstrated by FTIR absorbance, PVP clearly prevents aggregation by formation of PVP-bismuth bond on Bi NPs surface. A coordination between DMF *via* the amide group and Bi NPs surface is not discussed but is possible. Well dispersed spherical Bi NPs of 6 nm with a narrow size distribution are synthesized through this method at  $\text{PVP}/\text{Bi}^{3+}$  equal 5.00 and 10 mM  $\text{BiCl}_3$ .

The preparation of Bi NPs with a very small diameter (1.8-3.0 nm) in mild conditions is reported by Balan (Balan 2004). The reduction of  $\text{BiCl}_3$  is performed at 65°C in THF with *t*-BuONa. This stabilizing and protecting agent, prepared from sodium hydride, is efficient to stabilize Bi NPs exposed to air and to avoid aggregation. Without this intermediate *t*-BuONa, polydisperse Bi NPs are obtained with sizes of 10 to 120 nm. The advantage of this process is to synthesize monodisperse spherical Bi NPs without purification and on gram scale quantities.



Hossain and Luo synthesize Bi NPs from  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  as bismuth source (Hossain 2012, Luo 2012 and Luo 2013). The reduction by  $\text{NaBH}_4$  produces Bi NPs with sizes between 20 to 30 nm. A surface modification is described where initial PVP coating is replaced by a poly(acrylic acid) PAA or PEG layer or a silica shell of 3-aminopropyltriethoxysilane (3-APTES) to allow Bi NPs dispersion in water at pH = 7,4 (phosphate buffer).

Other conditions described by Velasco-Arias allow to obtain quasi-spherical Bi NPs with very small diameter of 3.3 nm (Velasco-Arias 2012).  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  is reduced at ambient temperature under inert atmosphere by  $\text{NaBH}_4$ . Sodium citrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) and a complex mixture of DMSO, water and methanol are respectively used as capping agent and solvent. In these conditions, the reducing character of  $\text{NaBH}_4$  is improved in presence of methanol by production of the reductant  $\text{H}_2$  by solvolysis. The residual bismuth (III)–citrate complexe helps colloid stabilization of Bi NPs for more than three months. In contrast, in DMSO solution, a partial dissolution of Bi NPs is highlighted by HR-TEM and UV spectroscopy in time. Finally, the most stable Bi NPs are obtained with a  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3/\text{NaBH}_4/\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  molar ratio of 1/2/1. Dry Bi NPs powder stored at room temperature is stable for more than three years.

Microwave (MW) assisted method has widely allowed to produce nanomaterials. Indeed, microwave fields can quickly and uniformly heat a solution through polarization or conduction. Bi NPs, produced from  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  and ascorbic acid as reducing agent, are uniform with a size of 70 nm. Ethylene glycol as solvent is added in this reaction (Cui 2015).

Finally, an interesting methodology is developed by Brown to synthesize aqueous, colloidally stable Bi NPs (Brown 2014). The aim of this work is to prepare efficient blood pool XCA and consequently maximize the X-ray opaque payload. To achieve this objective, an increase of Bi NPs core size and a decrease of Bi NPs organic shell size are studied. In an industrial perspective, small and biocompatible molecules as capping and stabilizing agents such as sugars (D-glucose) are selected instead of polymers. In this reaction, the solvent 1,2-propanediol (PPD) is tested. In a first attempt, the authors have tried to prepare D-glucose coated Bi NPs by  $\text{NaBH}_4$  reduction in water from bismuth (III) nitrate. At pH=10, Bi NPs are formed with poor and uncontrolled morphology. A poorly solubilisation of bismuth precursor in water could probably explain this result. Consequently, 1,2-propanediol is selected as solvent to dissolve bismuth (III) nitrate in concentrations of up to 2 M. Borane morpholine is chosen as reducing agent for its kinetically slower reactivity relative to  $\text{NaBH}_4$  and to better control of size and morphology. In addition, decomposition products (morpholine and borate) could be easily eliminated from aqueous Bi NPs by centrifugation. The protocol used is quite simple:  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  suspended in PPD is added to a solution of D-glucose in PPD. The borane morpholine solution is then added to initiate the reduction. After strictly controlled and fixed 60 seconds, a deep black color is observed and Bi NPs formed are instantly quenched in water. The temperature is optimized from 60°C to 120°C knowing that morphology and yield of Bi NPs are directly correlated to this temperature. Below 60 °C, no reaction is observed and above or at 120 °C, D-glucose polymerization is obtained. Morphology, size, uniformity and yield are the best at 80 °C. D-glucose is essential in this synthesis because without D-glucose or with another sugar such as sorbitol or xylitol, no particle formation is observed. However, Bi NPs are also obtained with capping agents containing carbonyl groups such as dihydroxyacetone, ribose, fructose or maltose. So D-glucose participation in reduction step is suggested because carbonyl groups are necessary to initiate Bi NPs formation. Moreover, a greatest uniformity in Bi NPs morphology and size is obtained with D glucose. In these optimized conditions, a large inorganic core ( $74 \pm 14$  nm for Bi NPs cores measured by TEM) and a tiny organic capping layer (hydrodynamic radius of 86 nm measured by Dynamic Scattering Light) are prepared. These particles contain ~6 million bismuth atoms and the dense Bi NPs core constitutes the majority (~60%) of each particle's volume. FTIR study has



demonstrated a highly coordination of the solvent 1,2-propanediol but also D-glucose on Bi NPs surface.

### 3.2.3.3 Bismuth salt reduction in a green nanochemistry perspective

The synthesis of metallic Bi NPs by reduction in organic solvent allows to obtain a size range of 2-74 nm depending on experimental conditions as solvent, reductive agent and temperature.

The main drawback of this method in terms of green nanochemistry is undoubtedly the use of strong and potentially toxic reducing agent in stoichiometric amounts. These protocols are carried out anaerobically and potentially toxic and expensive organic solvents are used. In described conditions above, three studies have tried to improve green nature of these reduction methods. The first one uses a nontoxic reducing agent (ascorbic acid), ethylene glycol as solvent and a green heating procedure (microwave irradiation) to reduce energy losses (Cui 2015). The second one uses a biocompatible renewable feedstock D-glucose as capping agent and a nontoxic solvent 1,2-propanediol (Brown 2014). However, the reductive agent borane morpholine is still potentially toxic. Finally, the reduction described by Warren is promoted by ambient light at room temperature in THF (Warren 2007). A potential improvement in terms of green chemistry of this procedure could be replacement of the toxic organic solvent THF by the green solvent MeTHF.

These previous syntheses in organic medium do not seem very promising in green chemistry. However, these recent developments show a clear potential to optimize greener nanosynthesis of Bi NPs.

### 3.2.3.4 Bismuth salt reduction in constrained environments

#### 3.2.3.4.1 Synthesis of bismuth metallic (0) nanoparticles in constrained environments

Several attempts to form Bi NPs with well-defined sizes are reported in nanoreactors. The constrained environments include amphoteric surfactants to create reversed micellar structures or microemulsion in nonpolar solvents. In the nanodroplet technologies, aqueous bismuth salt solutions are encapsulated by a surfactant to separate them from a surrounding organic solution. Consequently, this system can impose kinetic and thermodynamic constraints on particles formation. The surfactant-stabilized nanoreactor provides a confinement restricting particles nucleation and growth (<Insert table 5 here>).

An inverse microemulsion method is described by Fang to prepare Bi NPs in petroleum ether (Fang 2000, Fang 2001). Bismuth (III) citrate is used as bismuth precursor and  $\text{NaBH}_4$  as reductive agent. Poly(vinylpyrrolidone) (PVP) is added as protecting agent to prevent Bi NPs air oxidation. In addition, this synthesis employs a mixture of surfactant poly(oxyethylene)<sub>9</sub> nonyl phenol ether and poly(oxyethylene)<sub>5</sub> nonyl phenol ether. The resulting spherical Bi NPs are separated by a high-speed centrifugation and are retrieved by repeatedly washing in ethanol. Bi NPs formed in the presence of PVP are shaped spherically with a size in the range about 20 nm in diameter measured by TEM. The mean hydrodynamic radius measured by laser light scattering technique of the Bi NPs is around 48 nm.

In another study published by Fang, Bi NPs are prepared *via* in situ polymerization according to an inverse microemulsion process (Fang 2000). The reduction of  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  with  $\text{NaBH}_4$  is produced in water droplets emulsified in cyclohexane. Around these droplets, a polymeric network is formed by reaction between methyl methacrylate and 2-hydroxyethyl methacrylate monomers. Highly crystalline spherical Bi NPs surrounded by poly(methyl methacrylate



(PMMA) polymer are obtained after centrifugation and washing and have a size of 20 nm (TEM). A comparison of these results and a similar microemulsion route without polymer encapsulation demonstrates the polymer requirement to protect particles against oxidation.

The unusual bismuth (III) precursor bismuthyl perchlorate  $\text{BiOClO}_4$  is used by Foos in Bi NPs synthesis forming reverse micelles (Foos 2000). The reduction of an aqueous  $\text{BiOClO}_4$  inside of AOT (dioctyl sulfosuccinate sodium salt) reverse micelles is operated with  $\text{NaBH}_4$  at room temperature in isooctane. Finally, Bi NPs are centrifuged to remove insoluble solids and excess surfactant is eliminated by Bi NPs precipitation in MeOH. These nanoparticles are air-stable and exhibit sizes domain of less than 10 nm.

#### **3.2.3.4.2 Bismuth salt reduction in constrained environments in a green nanochemistry perspective**

The main advantage of using this type of nanoreactors system either reverse micelles or inverse microemulsion is that the size of nanoparticles can be controlled. The size of the aqueous droplets core can be modulated by a variation of the nature and amount of surfactant and cosurfactant, the solvent, or reaction conditions. However to date, publications on Bi NPs using nanoreactors has not demonstrated this potential.

This size modulation is dependent on aqueous droplets core size. Several parameters can affect droplets as nature, amount of surfactant and cosurfactant, solvent or reaction conditions. In this technology, the surfactant and cosurfactant choices depend upon physicochemical characteristics of the system. Surfactants are often derived from petrochemicals and sometimes their eliminations are difficult. So residual surfactants could modify physicochemical or biological properties of Bi NPs. To avoid sub-products or to facilitate their disposal, new “green” surfactants, currently developed, could be interesting in Bi NPs synthesis in nanoreactors (Silverstre 2010).

### **3.2.4 Reduction process in water**

#### **3.2.4.1 Synthesis of bismuth metallic (0) nanoparticles in water**

Aqueous preparations of Bi NPs are clearly attractive because water is a green solvent, easily removed by filtration. Nevertheless, less than 10 publications have described Bi NPs preparation in water. Indeed several difficulties are associated with water as solvent. Bismuth salts are insoluble and prepared Bi NPs can be easily hydrolyzed or oxidized in water. Consequently, efficient capping agents are necessary to obtain stable Bi NPs dispersion in water. (<Insert table 6 here>).

A reduction of ammonium bismuth citrate is reported by Xia with  $\text{NaBH}_4$  in aqueous solution at room temperature (Xia 2014). Soluble starch, added in this reaction, serves to stabilize Bi NPs to avoid aggregation. In this study, soluble starch is demonstrated more efficient than PVP as stabilizing agent. After dialysis, starch coated Bi NPs are characterized by a TEM size of 10-20 nm. The catalytic performance of Bi NPs to reduce 4-nitrophenol (4-NP) to 4-aminophenol (4-AP) is investigated with  $\text{NaBH}_4$  as reducing agent. Several parameters are also studied as effects of sodium borohydride concentration, initial 4-NP concentration, catalyst dose and reduction temperature. Under optimized conditions, Bi NPs show efficient catalytic performance to reduce the 4-NP. These nanoparticles of low cost are expected as heterogeneous catalyst in industrial applications.

In another aqueous process proposed by Wang, bismuth chloride is reduced with hydrazine hydrate, used also to control pH value (Wang 2009). Sodium oleate, introduced as capping



agent, has an interest to prevent agglomeration, oxidation of the sample for at least 6 months in sealed pocket and to control morphology and stability of Bi NPs. As observed by FTIR analysis, a layer of sodium oleate is present on Bi NPs surface, which confers them a highly hydrophobic character. So Bi NPs are not soluble in water. This procedure allows to obtain spherical Bi NPs with sizes of about 25-40 nm (TEM) and a high purity of 99.93% corresponding to weight percentage of bismuth measured by ICP. Without sodium oleate, bismuth nanoplates and nanorods are obtained. Different parameters of process are studied such as reaction temperature, reductant concentration and sodium oleate quantities. If reaction temperature is below 60 °C or above 90°C, no Bi NPs are formed. The optimal temperature is 80°C in this process. If concentration of hydrazine hydrate changes from 8 M to 16 M, no obvious effect is noticed on Bi NPs size and morphology. The sodium oleate quantity (weight ratio of sodium oleate to BiCl<sub>3</sub>: from 1:20 to 1:1) has also little impact on nanoparticles size.

Aqueous hydrazine hydrate (80% water solution) is also the reductant selected by Yang to transform Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Yang 2013). The polymer PSS (poly(sodium 4-styrenesulfonate), MW = 100,000) is introduced as capping agent. This reduction occurs at 160°C during 6h and is followed by centrifugation and ethanol washing to recover Bi NPs. SEM analysis has shown a large majority of uniform spherical Bi NPs with a diameter around 80 nm (90%) and a minority of polyhedral semi-spherical morphology in a size range of 70-90 nm (10%). The water soluble polymeric capping agent is original, interesting and allows to maintain a regular shape for nanoparticles. However stability and dispersion of prepared Bi NPs in water are unfortunately not reported.

Preparation of hydrophobic Bi NPs in water is presented by Ma (Ma 2012). The precursor bismuth nitrate pentahydrate Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> is reduced at 90°C for 5 hours by sodium-hypophosphite (NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>). Oleic acid and tartaric acid C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub> salified by NaOH are also introduced in the reaction as stabilizing agent and to avoid precursor precipitation in Bi(OH)<sub>3</sub>. In this procedure, a Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> solution and tartaric acid are preliminarily mixed to get a water insoluble complex Bi<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>O<sub>6</sub>)<sub>2</sub> intermediate. Then NaOH addition solubilizes this precipitate in [Bi<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>6</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2-</sup> but could also generate Bi(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> species (Velasco-Arias 2012). This complex, now soluble in water, is the bismuth precursor reduced by sodium-hypophosphite at 90°C. Spherical Bi NPs are thus formed with sizes in the range of 10-50 nm after purification by filtration and washing. Interestingly, Bi NPs morphologies can be controlled by the time of NaOH introduction, quantity of NaOH and reaction time. Bismuth nanobelts are produced under lower introduction of NaOH. The quantity of NaOH affects reduction rates of [Bi<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>6</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2-</sup>. The speed of NaOH introduction determines also the reduction rates of [Bi<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>6</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2-</sup> which influences Bi NPs shape. When reaction time is increased, particle size grow also gradually.

In 2005, Fu has reported a preparation of triangular nanoplates *via* a thermic process in aqueous solution (Fu 2005). These nanoplates of 5 nm have a triangle edge length changing from 130 to 200 nm. The selected bismuth precursor Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> is added to Na<sub>2</sub>EDTA as coordinating agent, ascorbic acid as mild reducing agent and PVP as capping and stabilizing agent. However, in aqueous solution, Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> is easily hydrolyzed to form BiONO<sub>3</sub> precipitate whereas in alkaline solution, Bi(OH)<sub>3</sub> is observed. An intermediate precipitate can complicate Bi NPs formation kinetics and affect their size and polydispersity. To avoid precipitation phenomenon, Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> is dissolved in a Na<sub>2</sub>EDTA aqueous solution at a controlled pH of 10-11 by NaOH addition. So stable soluble complex Bi(EDTA)<sup>+</sup> is formed in this basic media. According to time, the growth of bismuth nanoplates is observed by TEM. Initially bismuth particles are spheres with a 5 nm diameter and aggregated together. Then, after 8h, Bi NPs grow up into different shapes: triangular, quadrangular, and hexagonal bismuth nanoprisms. Finally, after 12 h of reflux, stable triangular nanoplates are observed in a mean width of 100 nm. Several experimental parameters are studied. Na<sub>2</sub>EDTA



concentration is adjusted to be able control the speed of releasing  $\text{Bi}^{3+}$  and so the reduction process kinetic. Consequently, the growth process could be also modulated. Influence of PVP quantity is also investigated. A molar ratio between PVP and  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  in the range of 0.5-1.0 enables triangular bismuth nanoplates whereas a decrease of molar ratio gives nanoplates as nearly spherical Bi NPs. In an original study published by Gutierrez, Bi NPs are produced by radiolytic reduction *via*  $\gamma$ -irradiation ( $^{60}\text{Co}$  source). In aqueous solution, the bismuth perchlorate  $\text{BiOClO}_4$  is chosen as precursor with different polymeric stabilizing agents (Gutierrez 1996). In this aqueous radiolytic process, strong reductants are produced such as hydrated electron and  $\text{H}^\bullet$  atom but also strong oxidizing agent, the  $\text{HO}^\bullet$  radical. This radiolytic reduction methodology is very interesting because no auxiliary reductive agent is added avoiding by-products and Bi NPs purification. The size, shape and stability of nanoparticles are highly dependent on nature of polymeric stabilizing agent used. Two kinds of Bi NPs are described with polymers coating such as polyethyleneimine (PEI) and polyacrylamide (PAA). Well-faceted shape particles are isolated (diameter of 20 nm) with PEI ( $2 \cdot 10^{-4}$  M) and PAA-10 (ie containing 10% carboxyl groups) ( $10^{-3}$  M) as stabilizer. Others less regular shape particles (diameter of 8 nm) are also obtained with PAA-70 (70% carboxyl groups) ( $10^{-3}$  M). Colloidal particles become more stable when carboxylate content is increased from PAA-0 to PAA-70. Consequently, particle size becomes smaller owing to carboxyl groups density which stabilize aqueous colloidal Bi NPs.

A pH-controlled synthesis of Bi NPs is described by Brown (Brown 2012). In aerobic and aqueous conditions, bismuth (III) nitrate, suspended in glycine buffer solution, is reduced by  $\text{NaBH}_4$ . A large dextran–polymer shell (75 kDa) is also introduced to play the role of capping and stabilizing agent. The biocompatible surfactant dextran (glucose polymer) has numerous others roles: protect the nanocrystals from oxidation, promote colloidal stability, avoid Bi NPs aggregation and ensure their water solubility. The reducing agent  $\text{NaBH}_4$  is chosen owing to an allowed decomposition in  $\text{H}_2$  and in a soluble sodium salt  $\text{NaBO}_2$  in aqueous solution. These sub-products are easily removed *via* dialysis. The pH is a key parameter in this synthesis: rate of particles formation is dependent on pH, precursor solubility is pH function but also aggregation and Bi NPs colloidal stability. Most stable colloids are achieved in solution between pH values of 9 and 10 allowing a slow growth. The physicochemical and chemical properties of these Bi NPs are studied in details. An analysis of Bi NPs surface is performed by FTIR indicating the presence of dextran around nanoparticles. At controlled pH and under prolonged light exposure, Bi NPs decomposition is observed in acidic solutions ( $\text{pH} < 4$ ) and highly alkaline solutions ( $\text{pH} > 12$ ). This photoinstability does not notified in phosphate buffered saline solution ( $\text{pH} 7.4$ ) where Bi NPs are stable. Several properties are attributed Bi NPs purified. Bi NPs solutions are also colloiddally stable after temperature stress (freezing or boiling) indicating that Bi NPs colloids are robust over a wide range of temperatures. They can be redispersed in water or in a mildly basic phosphate buffer and stored away from light for months. A diameter of 20 nm is measured by TEM and 130 nm by DLS for spherical Bi NPs. The difference ( $\sim 110$  nm) between crystallite size (TEM) and hydrodynamic radius (DLS) can be attributed to a dextran polymer and water shell. Some interesting properties as XCA are shown for Bi NPs synthesized at pH 10. Nevertheless, the dextran-coated Bi NPs contain less than 4% bismuth by volume resulting in a low payload of X-ray attenuating atoms ( $\sim 100\,000$  bismuth atoms/NP). This property seems to be a major drawback because a sufficient concentration of Bi NPs is necessary to produce injectable X-ray contrast solutions with high X-ray opacity.

#### 3.2.4.2 Bismuth (III) salt reduction in water in a green nanochemistry perspective



The use of water is clearly an advantage in terms of green nanochemistry. Nevertheless, aqueous solubility of bismuth precursors remains a problem. This issue can be cleverly solved by using additives as EDTA (Fu 2005) or tartaric acid (Ma 2012) or ammonium bismuth citrate (Xia 2014). The reaction conditions can be sweet at room temperature (Xia 2014) or with a mild reducing agent as ascorbic acid (Fu 2005). As mentioned above, the selection of capping agents should be careful to avoid Bi NPs oxidation in water, so the choices are limited in aqueous media. In literature, oleate is used as capping agent to form a stabilizing barrier of Bi NPs (Wang 2009 and Ma 2012). Consequently, this hydrophobic agent prevents colloidal dispersion of Bi NPs in water. A solution to make nanoparticles soluble in water could be the ligand exchange technology (Muhr 2014). Starch (Xia 2014) and 75kD dextran and to a lesser extent PVP (Fu 2005) seem efficient to solubilize Bi NPs and are clearly interesting coating as they can be easily functionalized to vectorize Bi NPs. Bismuth (III) salt reduction in water has a great potential to produce aqueous soluble Bi NPs but induces challenges requiring still extensive studies.

#### 4. Characterization of Bi NPs

Different methods are used to determine morphological features of nanoparticles. The size, in first, is characterized by several experimental measures. The nanoobjects can be divided in different parts: the crystalline part of the core, the whole bismuth core (crystalline and amorphous), the capping and hydrated layer. Second, in almost all cases, nanoparticles are polydisperse (table 1, table 2, table 3, table 4, table 5, table 6).

The morphological characteristics of nanoparticles are generally observed by Transmission Electron Microscopy (TEM) and more rarely by Scanning Electron Microscopy (SEM). TEM images also give sizes distribution and a number-weighted size mean value. By image treatment, this technique performs analysis of a statistically significant number of particles in a sample. However, the sample preparation can induce Bi NPs aggregation and so TEM measurements may not reflect size and distribution in solution. TEM is a particularly delicate technique because Bi NPs are sensitive to beam irradiation. Consequently, a continuous growth of particles diameter is observed under intensive electron beam irradiation. This phenomenon could be explained by sensitivity of low melting point bismuth (271°C) in TEM examination for prolonged irradiations (Balan 2004 and Fu 2005).

High Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM) has the ability to resolve atomic arrangement in nanoparticles, this analysis describes the crystallography of Bi NPs (lattice fringes characteristic, glide plane, screw axis, lattice vacancies and defects as well as shape).

SAED (Selected Area Diffraction Pattern) and XRD are performed to study crystalline structure of particles and eventually highlight oxide layer on nanoparticles surface (Wang 2009, Ma 2012, Xia 2014 and Warren 2007). The crystal size can be also calculated owing to line broadening observed on XRD pattern and by using the Scherrer formula (Chen 2005, Goia 2005, Brown 2014).

DLS gives hydrodynamic radius of nanoobjects and polydispersity of colloidal solution. This measure is an intensity-weighted mean value. A correct conversion to number or volume-weighted mean values requires the knowledge of the complex refractive index, which the imaginary part is rarely available. An interesting comparison between TEM and DLS diameter of Bi NPs allows to estimate thickness of organic layer (due to capping agent anchored) and solvation layer on Bi NPs surface (Brown 2014).

Thermal analyses namely thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) and differential thermal analysis (DTA) as well as FTIR are used to



investigate Bi NPs surface properties. These techniques specially describe bonds nature and strength between Bi NPs surface and capping agents.

Finally, purity of elemental bismuth inside Bi NPs is assessed by UV-vis spectroscopy in a range of 200-700 nm. A maximum around 253 nm for Bi NPs is described in few publications (Fang 2001 and Gutierrez 1996) but this maximum is not always observed according to Bi NPs size and shape (Foos 2000, Ma 2012, Brown 2012, Li 2009, Chen 2005, Velasco-Arias 2012 and Wang 2014). Sometimes two more peaks at 420 and 619 nm for Bi NPs are present on UV-vis absorption spectrum (Wang 2010).

Others techniques like Inductively Coupled Plasma spectroscopy Mass Spectrometry (ICPMS) (Wang 2009 and Fu 2005) or CHN element analysis (Wang 2009 and Fu 2005) or energy disperse X-ray analysis (EDXA) (Wang 2004, Cheng 2009 and Wu 2011) are also described in a few publications to complete characterization of Bi NPs.

## Conclusion and perspectives

This insight of literature resumes a lot of described experimental conditions to synthesize Bi NPs. Reported procedures use a huge variety of solvents, reducing agents, capping agents and temperature conditions. However, these reaction conditions are ultimately poorly compatible with green chemistry principles applied to nanoparticles (Dahl 2007 and Dauthal 2016). The twelve green chemistry principles originally defined by Anastas and Warner are applied to nanoparticles synthesis. They are grouped into six criteria for design of greener nanomaterials and nanomaterials generation methods (Anastas 1998, Dauthal 2016 and Dahl 2007) (<Insert figure 3 here>). In attached tables (table 1, table 2, table 3, table 4, table 5, table 6), different Bi NPs syntheses are positioned according to these six criteria. Clearly, no synthesis respects all settings established in green nanoparticles preparation.

In order to prepare real green Bi NPs, all proposed criteria would be necessarily involve in developed procedures. These syntheses

- do not require high energy input (unlike top-down methods, thermal decomposition or polyols synthesis) or use thermal activation under microwaves irradiation
- do not introduce toxic reducers or even avoid any reducers: examples in top-down, thermal decomposition or polyols synthesis which do not use toxic agent but ascorbic acid or sodium-hypophosphite or visible light as reductant
- use no solvent or green solvent such as water
- use very simple protocols with very few reactants such as top-down or polyols process
- use capping agents based on renewable feedstock such as dextran or D-glucose

A last criterion of waste reduction is important to consider. Indeed, this parameter is never satisfied in reported literature, which uses centrifugation and successive washings as purification methods. The simplification of purification process would be clearly a progress in terms of green synthesis because a lot of time, energy and solvent are consumed in this step.

Certainly, optimization of capping agent is also an essential point to improve synthesis and properties of Bi NPs, especially for medical applications. Organic monomeric or polymeric species are also very widely used to cap and stabilize Bi NPs. These species are generally hydrophobic or hydrophilic, small or large molecular species, for example specifically PVP which is largely used.

In order to use Bi NPs in medical applications, new effective hydrophilic capping agents are necessary to disperse and stabilize nanoparticles in aqueous medium. The use of capping agents as D glucose, dextran (75 kD) or starch polymers is a first step towards these



applications. Surprisingly, the well-known technologies used to convert hydrophobic to hydrophilic nanoparticles have not yet been tested on Bi NPs (Muhr 2014).

Lastly, only two papers have described Bi NPs surface modification to target biological receptors. Clearly, this already largely research explored on iron and gold nanoparticles remains to refine on Bi NPs (Astruc 2016).

Finally, only few works have evaluated Bi NPs toxicity conclusive at a good biocompatibility. Others studies should be necessary to demonstrate biocompatibility of Bi NPs and will depend undoubtedly on capping agents used.

### Acknowledgements

We thank the University Pierre et Marie Curie to the PhD grant, the Conservatoire national des arts et métiers (Cnam) to financial support and sincerely Thomas Vangijzegem and Quentin Duez to final proofreading.

Anastas, P., Warner, J., 1998. Green chemistry: Theory and practice. Oxford university Press.

Astruc, D., 2016. Introduction to nanomedicine. Molecules 21,4.

Balan, L., Schneider, R., Billaud, D., Fort, Y., Ghanbaja, J. 2004. A new synthesis of ultrafine nanometre-sized bismuth particles. Nanotechnology 15, 940-944.

Bierer, D.W., 1990. Bismuth subsalicylate: History, Chemistry and Safety. Clin. Infect. Dis. 12, S3-S8.

Brown, A.L., Goforth, A.M., 2012. pH-depend synthesis and stability of aqueous elemental bismuth glyconanoparticle colloids: potentially biocompatible X-ray contrast agent. Chem. Mater. 24, 1599-1605.

Brown, A.L., Naha, P.C., Benavides-Montes, V., Litt, H.I., Goforth, A.M., Cormode D.P., 2014. Synthesis, X-ray opacity, and biological compatibility of ultra-high payload elemental Bismuth nanoparticle X-ray contrast agent. Chem. Mat. 26, 2266-2274.

Carotenuto, G., Histon, C.L., Capezzuto, F., Palomba, M., Perlo, P., Conte, P., 2009. Synthesis and thermoelectric characterisation of bismuth nanoparticles. J. Nanopart. Res. 1729-1738.

Chen, Y., Gong, R., Zhang, W., Xu, X., Fan, Y., Liu, W., 2005. Synthesis of single-crystalline bismuth nanobelts and nanosheets. Mater. Let. 59, 909-911.

Cheng, G., Wu, J., Xia, F., Yu, H., Lu, Z., Yu, X., Chen, R., 2009. Synthesis of bismuth micro- and nanospheres by a simple refluxing method. Mater.Let. 63, 2239-2242.

Cui, Z., Zhang, Y., Li, S., Ge, S., 2015. Preparation and photocatalytic performance of Bi nanoparticles by microwave-assisted method using ascorbic acid as reducing agent. Catalysis Comm. 72, 97-100.

Dahl, J.A., Maddux, B.L.S., Hutchison, J.E., 2007. Toward greener Nanosynthesis. Chem. Rev 107, 2228-2269.

Dauthal, P., Mukhopahyay, M., 2016. Noble metal nanoparticles : plant-mediated synthesis, mechanistic aspects of synthesis, and applications. Ind. Eng. Chem. Res. 55, 9557-9577.

Estrada Flores, M., Santiago Jacinto, P., M. Reza San German, C., Rendon Vasquez, L., Borja Urby, R., Cayetano Castro, N., 2016. Surfactant-free synthesis of metallic bismuth spheres by microwave-assisted solvothermal approach as a function the power level. Mater. Sci, 1-11. doi 10.1007/s11706-016-0356-6.

Fanfair, D.D., Korgel, B.A., 2005, Bismuth nanocrystal-seeded III-V semiconductor nanowire synthesis. Crystal Growth et Design 5, 1971-1976.



- Fang, J., Stokes, K.L., Wiemann J.A., Zhou, W.L., Dai, J., Chen, F., O'Connor, C.J. 2001, Microemulsion-processed bismuth nanoparticles. *Mater. Scie. Eng. B83*, 254-257.
- Fang, J., Stokes, K.L., Wiemann, J., Zhou, W., 2000. Nanocrystalline bismuth synthesized via an in situ polymerization-microemulsion process. *Mater. Let.* 42, 113-120.
- Fang, J., Stokes, K.L., Zhou, W.L., Wang, W., Lin, J., 2001. Self-assembled bismuth nanocrystallites. *Chem Commun.* 1872-1873.
- Fang, J., Stokes, K.L., Zhou, W.L., Wiemann, J.A., Dai, J., O'Connor, C.J., 2000. Colloidal bismuth nanoparticles : synthesis and UV-Vis absorption. *Colloidal*, 91-96.
- Foos, E.E., Stroud R.M., Berry, A.D., Snow, A.W., Armistead, J.P., 2000. Synthesis of nanocrystalline bismuth in reverse micelles. *JACS* 122, 7114.
- Fu, R., Xu, S., Lu, Y.N., Zhu, J.J., 2005. Synthesis and characterisation of triangular bismuth nanoplates. *Crystal Growth and Design* 4, 1379-1385.
- Goia, C., Matijevic, E., Goia D.V., 2005. Preparation of colloidal bismuth particles in polyols. *J. Mat. Res.* 20, 1507-1514.
- Gutiérrez, M., Henglien, A., 1996. Nanometer-sized Bi particles in aqueous solution : absorption spectrum and some chemical properties. *J. Phys. Chem* 100, 7656-7661.
- Hossain, M., Luo, Y., Sun, Z., Wang, C., Zhang, M., Fu, H., Qiao, Y., Su, M., 2012. X-ray enabled detection and eradication of circulation tumor cells with nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronic.* 38, 348-354.
- Hossain, M. Su, M., 2012. Nanoparticle location and material-dependent dose enhancement in X-ray radiation therapy. *J. phys. Chem.* 116, 23047-23052.
- Lee, N., Chai, S.H., Hyeon, T., 2013. Nano-Sized CT contrast agent. *Adv. Mater.* 25, 2641-2660.
- Li, J., Fan, H., Chen, J., Liu, L., 2009. Synthesis and characterisation of poly(vinylpyrrolidone)-capped bismuth nanospheres. *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects* 340, 66-69.
- Liu, Y., Al, K., Lu, L., 2012. Nanoparticulate X-ray computed tomography contrast agents: from design validation to in vivo applications. *Acc. chem. res.* 10, 1817-1827.
- Luo, Y., Wang, C., Qiao, Y., Hossain, M., Ma, L., Su, M., 2012. In vitro cytotoxicity of surface modified bismuth nanoparticles. *J. Mater. Sci.* 23, 2563-2573.
- Luo, Y., Wang, C., Qiao, Y., An, J., 2013. Targeted nanoparticles for enhanced X-ray radiation killing of multidrug-resistant bacteria. *Nanoscale* 5, 687-694.
- Lusic, H., Grinstaff, M.W., 2012. X-ray-computed tomography contrast agents. *Chem. Rev.* 113, 1641-1666.
- Ma, D., Zhao, J., Zhao, Y., Hao, X., Li, L., Zhang, L., Lu, Y., Yu, C., 2012. Synthesis of bismuth nanoparticles and self-assembled nanobelts by a simple aqueous route in basic solution. *Colloids and surfaces*, 395, 276-283.
- Muhr, V., Wilhelm, S., Hirsch, T., Wolfbeis, S.O., 2014. Upconversion nanoparticles: from hydrophobic to hydrophilic surfaces. *Acc. Chem. Res.* 47, 3481-3493.
- Safardoust-Hojaghan, H., Sakavati-Niasari, M., Motaghedifard, M.H., Hosseinpour-Mashkani, S.M., 2013. Synthesis of micro sphere-like bismuth nanoparticles by microwave assisted polyol method; designing a novel electrochemical nanosensor for ultra trace measurement of Pb<sup>2+</sup> ions. *New J. Chem Soc.* 132, 15158-15159.
- Schulz, S., Heimann, S., Wölper, C., Assenmader, W., 2012. Synthesis of bismuth pseudocubes by thermal decomposition of Bi<sub>2</sub>Et<sub>4</sub>. *Chem. Mater.* 24, 2032-2039.



Silvestre, F., Aubry, J.-M., Benvegnu T., Brendlé, J., Durand, M., Lavergne, A., Len, C., Molinier, V., Mouloungui, Z., Plusquellec, D., Zhu, Y., 2010. Agroressources pour une chimie durable. L'actualité chimique 338-339, 24-36.

Shilo, M., Reuveni, T., Motiei, M., Popovtzer, R., 2012. Nanoparticles as computed tomography contrast agents: current status and future perspectives. *Nanomedicine* 7, 257-269.

Son, J.S., Park, K., Han, M.K., Kang, C., Park, S.G., Kim, J.H., Kim, W., Kim, S.J., Hyeon, T., 2011. Large-scale synthesis and characterization of the size-dependent thermoelectric properties of uniformly sized bismuth nanocrystals. *Angew Chemie Int. Ed.* 50, 1363-1366.

Swy E.R., Schwartz-Duval, A.S., Shuboni, D.D., Latourette, M.T., Mallet, C.L., Parys, M., Cormode D.P., Shapiro E.M., 2014. Dual-modality, fluorescent, PLGA encapsulated bismuth nanoparticles for molecular and cellular fluorescence imaging and computed tomography. *Nanoscale* 6, 13104-13112.

Thanh, N.T.K., Maclean, N., Mahiddine, S., 2014. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chem. Rev.* 114, 7610-7630.

Velasco-Arias, D., Zumeta-Dubé, I., Diaz, D., Santiago-Jacinto, P., Ruiz-Ruiz, V.F., Castillo-Blum, S.E., Rendon, L., 2013. Stabilization of strong quantum confined colloidal bismuth nanoparticles, one-pot synthesized at room conditions. *Phys.Chem.* 117, 22218-22223.

Wang, F., Buhro, W.E., 2010. An easy shortcut synthesis of size-controlled bismuth nanoparticles and their use in the SLS Growth of high-quality colloidal cadmium selenide quantum wire. *Small* 4, 573-581.

Wang, F., Tang, R., Yu, H., Gibbons, P.C., Buhro, W.E., 2008. Size- and shape-controlled synthesis of bismuth nanoparticles. *Chem. Mater.* 20, 3656-3662.

Wang, J., Wang, X., Peng, Q., Li, Y., 2004. Synthesis and characterization of bismuth single-crystalline nanowires and nanospheres. *Inorg. Chem.* 43, 7552-7556.

Wang, Z.W., Poudel, B., Ma, Y., Ren, Z.F., 2006. Shape control of single crystalline bismuth nanostructure. *J.Phys. Chem. B* 110, 25702-25706.

Wang, Y., Chen, J., Chen, L., Chen, Y.B., Wu, L.M., 2010. Shape-controlled solventless syntheses of nano Bi disk and spheres. *Crys. Grow. Des.* 10, 1578-1584.

Wang, Y., Ihsate, M., Li, Z.Y., Xia, Y., 2006. Metallo-dielectric photonic crystals assembled from monodisperse spherical colloids of bismuth and lead. *Adv. Mater.* 18, 471-476.

Wang, Y., Kim, K.S., 2008. Large-scale polyol synthesis of single-crystal bismuth nanowires and the role of NaOH in the synthesis process. *Nanotech.* 19, 1-6.

Wang, Y., Xia, Y., 2004. Bottom-up and top-down approaches to the synthesis of monodispersed spherical colloids of low melting-point metals. *Nano. Let.* 10, 2047-2050.

Wang, Y., Zhao, J., Zhao, X., Tang, L., Li, Y., Wang, Z., 2009. A facile water-based process for preparation of stabilized Bi nanoparticles. *Mater. Res. Bulletin* 44, 220-223.

Wang, Y.W., Hong B.H., Kim, K.,S., 2005. Size control of semimetal bismuth nanoparticles and the UV-visible and IR absorption spectra. *J. Phys. Chem.* 109, 7067-7072.

Wang, Z., Jiang, C., Huang, R., Peng, H., Tang, X., 2014. Investigation of optical and photocatalytic properties of bismuth nanosphere prepared by a facile thermolysis method. *J. Phys. Chem.* 118, 1155-1160.

Warren, S.C., Jackson, A.C., Cater-Cyker, Z.D., Disalvo, F.J., Wiesner, U., 2007. Nanoparticle synthesis via the photochemical polythiol process. *JACS* 129, 10072-70073.

Wei, B., Zhang, X., Zhang, C., Jiang, Y., Fu, Y.Y., Yu, C., Sun, S.K., Yan, X.P., 2016. Facile synthesis of uniform-sized bismuth nanoparticles for CT visualization of gastrointestinal tract in vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8, 12720-12726.



Wu, J., Qin, F., Lu, Z., Yang, H.J., Chen, R., 2011. Solvothermal synthesis of uniform bismuth nanospheres using poly( *N*-vinyl-2-pyrrolidone) as a reducing agent. *Nanoscale Res. Let.* 6, 1-8.

Wu, J., Yang, H., Li, H., Lu, Z., Yu, X., Chen, R., 2010. Microwave synthesis of bismuth nanospheres using bismuth citrate as a precursor. *J. Alloys and Compounds* 498, L8-L11.

Xia, F., Xu, X., Li, X., Zhang, L., Zhang, L., Qiu, H., Wang, W., Liu, Y., Gao, J., 2014. Preparation of bismuth nanoparticles in aqueous solution and its catalytic performance for the reduction of 4-nitrophenol. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53, 10576-10582.

Yamara, M., Kovalenko, M.V., Hesser, G., Talapin, D.V., Heiss, W., 2010. Highly Monodisperse bismuth nanoparticles and their three-dimensional superlattices. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 15158-15159.

Yang, H., Li, J., Lu, X., Xi, G., Yan, Y. 2013. Reliable synthesis of bismuth nanoparticles for heavy metal detection. *Mater. Res.* 48, 4718-4722.

Yang, X., Yang, M., Pang, B., Vara, M., Xia, Y., 2015. Gold Nanomaterials at work in biomedicine. *Chem. Rev.* 115, 10410-10488.

Zhao, Y., Zhang, Z., Dang, H., 2004. A simple way to prepare bismuth nanoparticles. *Mater. Let.* 58, 790-793.

Zou, C.D., Gao, Y.I., Yang, B., Zhai, Q.J. 2009. Melting and undercooling of bismuth nanocrystals by solvothermal synthesis. *Physical B* 404, 4045-4050.

### 5.2 *Annexe 2 : publication*

## **Metallic bismuth nanoparticles: towards a robust, productive and ultrasound assisted synthesis from batch to flow-continuous chemistry**

Catherine Gomez,\*<sup>1</sup> Gauthier Hallot,<sup>1</sup> Alexandra Pastor,<sup>1</sup> Sophie Laurent,<sup>2</sup> Emilie Brun,<sup>3</sup> Cécile Sicard-Roselli<sup>3</sup> and Marc Port\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Génomique, Bioinformatique et Chimie Moléculaire (EA 7528), Equipe Chimie Moléculaire, Conservatoire National des Arts et Métiers (Cnam), HESAM Université, 2 rue Conté, 75003 Paris, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de RMN et d'Imagerie Moléculaire, Université de Mons, 19 avenue Maistriau, B-7000 Mons, Belgique.

<sup>3</sup>Laboratoire de Chimie Physique, CNRS UMR 8000, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France.

E-mail corresponding author: catherine.gomez@lecnam.net

### **Abstract**

Bismuth is a highly biocompatible and inexpensive metal with a high atomic number, which confers an important X-rays opacity. While bismuth oxide or bismuth sulphide have been



extensively studied in imaging, little is known about metallic bismuth nanoparticles. The latter are more attractive for X-rays imaging because they contain neither oxygen nor sulfur, so that a high amount of metal atoms is contained within the nanoparticles. We report here a robust, efficient and green ultrasound assisted synthesis to obtain metallic bismuth NPs. The procedure, which has been optimized to get a reproducible synthesis, will also tend to minimize chemical hazards to health and environment. By applying the green chemistry principles, several experimental parameters have been studied such as reaction time, reactants stoichiometry, temperature, starting material quantities and purification steps number. Two energy delivery system (classical heating and sonication) were compared. ***The production of small metallic bismuth NPs on a large scale by flow chemistry coupled to sonication was showed for the first time.*** These optimizations of the process were completed by a comparison of two purification methods (centrifugation and ultrafiltration) to isolate purified thin black powders of D-glucose-coated bismuth NPs. Several analytical techniques were used to characterize products (structures, sizes and morphology) such as Fourier Transform InfraRed (FT-IR) spectroscopy, Dynamic Light Scattering (DLS), Transmission Electron Microscopy (TEM), Energy-dispersive X-ray spectrometry (EDX) and X-Ray Diffraction (XRD). All these analyses corroborated well with the structure of metallic bismuth NPs coated with a D-glucose shell.

**Keywords :** Nanoparticles, Green Chemistry, Bismuth, Robust process, D-glucose, Ultrasound assisted synthesis, Flow chemistry, Productivity.

## 1. Introduction

Bismuth, which is a diamagnetic semimetal, shows several properties such as high magnetoresistance, thermal conductivity and high anisotropic electronic behavior. This element has a high atomic number ( $Z = 83$ ) which confers an important X-rays opacity (high absorption) [1] and shows a good biological tolerance *in vitro* evaluated primarily by cell viability experiments [2].

Bismuth nanoparticles (NPs) have gathered increased interest for X-rays imaging over the past few years. While bismuth oxide ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ) [3] or bismuth sulphide ( $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ) [4] were studied extensively as X-rays contrast agents (XCA), little is known about metallic bismuth NPs. To obtain optimal XCA, a high quantity of metal atoms must be contained inside the NPs. Yet the drawback of  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  or  $\text{Bi}_2\text{S}_3$  is the lower concentration of bismuth atoms per particle which limits X-rays imaging sensitivity. Moreover, hydrolysis of  $\text{Bi}_2\text{S}_3$  could be problematic because hydrogen sulphide ( $\text{H}_2\text{S}$ ), a toxic gas, can be generated *in vivo* under endogenous acidic conditions [5]. To counteract these drawbacks, the use of metallic bismuth NPs should be preferred.

Recently, we have reviewed the different published syntheses of metallic bismuth NPs [6]. Most syntheses of metallic bismuth use a bottom-up approach. In this kind of synthesis, bismuth (0) is obtained by a reduction from bismuth (III) or more rarely bismuth (V) in presence of a capping agent. Several reductive conditions are described with a wide variety of reductant (sodium borohydride [7], hydrazine hydrate [8], sodium hypophosphite [9], sodium hydride or ascorbic acid) associated to different kind of solvent (water or organic solvents such as THF [10], DMF [11], ethylene glycol or DMSO). A great variety of capping agents such as D-glucose polymer dextran [7a], starch [7b] or sodium oleate [8a-9] were also used to control the growth of bismuth nuclei and to stabilize these metallic bismuth NPs after the reduction step. These syntheses used quite different temperature conditions (from ambient temperature up to  $350^\circ\text{C}$ ). This review of the literature shows that most of the reaction



conditions used to obtain metallic bismuth NPs are poorly compatible with green chemistry criteria applied to nanoparticles [6].

The synthesis conditions probably the most compatible with the principles of green chemistry applied to NPs have been proposed by Brown et al. who produced metallic bismuth NPs coated by hydrophilic moieties [2]. Their strategy uses environmental benign materials from renewable feedstock such as biocompatible solvent 1,2-propanediol (PPD) [12] and D-glucose as capping agent. Moreover, they demonstrated *in vitro* biocompatibility of their metallic bismuth NPs.

To minimize chemical hazards to health and environment [13], the complete reduction of bismuth salt has been ***optimized by sonochemistry coupled to continuous flow to produce metallic bismuth NPs. The development of a new greener fully optimized protocol has allowed to :***

- 1) decrease the quantities of D-glucose and therefore reduce waste
- 2) optimize the energy delivery system by using sonochemistry
- 3) completely reduce the bismuth salt
- 4) optimize the purification step and minimize time consuming process
- 5) improve the productivity. Indeed, this sonochemical protocol was extended in a large scale by transposing optimized conditions obtained in batch to continuous flow.

***This new continuous process coupled to sonication applied to metallic bismuth NPs synthesis is simple reliable, productive and allows the control of their size, shape and distribution.*** To our knowledge, very little research have described production of metallic or semi-conductor NPs using sonication coupled to continuous flow process [14] and no synthesis of metallic bismuth NPs has described the use of this technology [6].

The main parameter used to follow our optimization process was to measure the NPs size by dynamic light scattering (DLS) in water. We choose to express hydrodynamic diameters in number. Then, the metallic bismuth NPs obtained in optimized conditions were further characterized by additional techniques such as TEM, FT-IR, XRD and EDX.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Reagents.

Bismuth nitrate pentahydrate (Acros, 98%), borane morpholine complex (Acros, 97%), D-glucose (Sigma, 99,5%), 1,2-propanediol (Acros, 99%). All solutions were prepared using fresh, distilled H<sub>2</sub>O.

### 2.2. Synthesis of metallic bismuth NPs.

In a 25 mL two necks round bottom flask with a thermometer, D-glucose (10 eq, 2.1 mmol) dissolved in 1,2-propanediol (PPD) (2 mL) was introduced under argon. To this mixture, was added bismuth nitrate pentahydrate Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (100 mg, 0.21 mmol) dissolved in PPD (1 mL) then a solution of borane morpholine (3 eq, 0.62 mmol) in PPD (2 mL). The reaction was quickly stirred by magnetic stirring for 1 or 10 min and heated in oil bath at 80°C. NPs were formed after a few minutes and the mixture became black. The crude was then poured into water (5 mL) and purification by centrifugation (Heraeus Primo centrifuges RCF) was performed. After three centrifugations at 4000 rpm (2.585g) for 90 min, purified NPs dispersed in water by sonication (5 min, Sonoclean bath 3L, 35 kHz, 80-160W) were lyophilized and characterized by DLS.



### 2.3. Synthesis of bismuth NPs under sonication (Table 1, entry 7, 8 and 9).

In a 25 mL two necks round bottom flask with a thermometer, D-glucose (10 eq, 2.1 mmol) dissolved in 1,2-propanediol (PPD) (2 mL) was introduced under argon. To this mixture, was added bismuth nitrate pentahydrate  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  (100 mg, 0.21 mmol) dissolved in PPD (1 mL) then a solution of borane morpholine (3 eq, 0.62 mmol) in PPD (2 mL). The reaction was quickly stirred by sonication (Sonopuls HD2070, Bandelin, the highest ultrasound frequency 20 kHz, power 40%, 70W, Ø 3 mm, 9 cycles (pulsed mode 0.9s on/0.1s off)). NPs were formed after a few minutes and the mixture became black. The crude was then poured into water (5 mL) and purification by ultrafiltration (filtration membrane of 5000 MWCO) was performed. After three water washings (3 x 40 mL), purified NPs dispersed in water by sonication were lyophilized and characterized by DLS.

### 2.4. Synthesis of bismuth NPs by flow chemistry under sonication (Table 2, entry 2)

In a 100 mL round bottom flask, D-glucose (10 eq, 21 mmol) dissolved in 1,2-propanediol (PPD) (20 mL) was introduced under argon. To this mixture, was added bismuth nitrate pentahydrate  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  (1 g, 2.1 mmol) dissolved in PPD (10 mL) then a solution of borane morpholine (3 eq, 6.2 mmol) in PPD (20 mL). The solution was pumped through the reactor via a HPLC pump (Waters, 600 controller). The flow reactor, made of Teflon tubing with an outer diameter of 0.32 cm (1/8), an inner diameter of 2.4 mm and furnished with a flow regulator (1.5 mL/min), was immersed in a sonication bath (Bandelin electronic, the highest ultrasound frequency 35 kHz, 240W) at 60°C. Residence time of about 5 min corresponds to flow rates of 1,5 mL/min. The hot fluid was cooled in the tubing and collected in a flask. The crude was then purified by ultrafiltration (filtration membrane of 5000 MWCO). After three water washings (3 x 40 mL), purified NPs dispersed in water by sonication were characterized by DLS.

### 2.5. Characterisation of bismuth nanomaterials.

NPs were analyzed by Fourier Transform InfraRed (FT-IR) spectroscopy and compared to starting material on a Perkin Elmer Spectrum II equipped with a diffuse reflectance accessory. 2mg of nanoparticles were mixed with 300 mg of KBr. The spectra were recorded with a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  and with 64 scans. Dynamic Light Scattering (DLS) measurements were performed on a Malvern ZetaSizer ZEN3600 instrument equipped with a 633 nm laser (scattering angle  $175^\circ$ ) at 25°C on a bismuth NPs solution (1 mM) diluted in water (RI 1.33, viscosity 0.8872) and sonicated before analysis. Three replicate measurements were performed by analysis in a cuvette ZEN0118 (200 µl). An instrumental algorithm was used to supply the hydrodynamic diameters as number distributions (bismuth RI 2.145, absorption 2.988). The measurements were presented with the average size of NPs  $\pm$  standard deviation. Images were taken by Transmission Electron Microscopy (TEM) on Philips CM120 transmission electron microscope operating at 80 kV. Microscopy analyses were performed as follows: 2 µL droplets of the colloidal dispersion were cast onto formvar/carbon-coated copper grids (400 mesh) for a few minutes. From the TEM images, the bismuth NPs diameter distribution was determined from recorded images with ImageJ software version 1.48 (at least 300 counted particles). The measurements were presented with the average size of NPs  $\pm$  standard deviation. The absorption spectra of irradiated solutions were measured by an UV-Vis spectrophotometer (Genesys 10 UV-Vis scanning). The concentration of bismuth (III) nitrate pentahydrate was determined by complexation method using the dithizone [15]. The absorption peak of  $[\text{Bi}(\text{dithizone})_3]$  was observed at 468 nm. The rhombohedral crystallinity was determined by using the X-ray Diffractometer (XRD: D5000 Siemens diffractometer) equipped with  $\text{Cu K}_\alpha$  as X-ray radiation ( $\lambda = 0.15406\text{ nm}$ ). Diffractograms were interpreted



using the Debye-Sherrer formula (D5000 Siemens Data Viewer software) to estimate the rhombohedral structure of bismuth NPs. The scattering intensities were measured over an angular range of  $20^\circ < 2\theta < 80^\circ$  for all samples. One measurement was recorded every  $0.05^\circ$  during 25 seconds. The measurements were recorded at room temperature. The elementary analyses were performed on transmission electron microscope (120 kV) equipped with an energy-dispersive X-ray (EDX) detector (SamX).

### 3. Results and discussion

As mentioned before, we decided to follow the known procedure described initially by Brown et al., using borane morpholine as reducing agent and D-glucose as capping agent and PPD as solvent.

To produce bismuth NPs according to Brown's protocol, a solution of bismuth (III) nitrate pentahydrate in PPD was mixed with D-glucose partially dissolved in PPD. Bismuth (III) was reduced in bismuth (0) by using borane morpholine, a mild reducing agent, dissolved in PPD and the reaction was heated at  $80^\circ\text{C}$  during 60 s. Several successive steps of purification were then performed: centrifugation, sonication, dialysis and filtration.

In all our study, we use the minimum stoichiometric quantity of borane morpholine (3 equivalents relative to bismuth). Borane morpholine is essential to reduce the bismuth salt otherwise no nanoparticles were synthesized which means that in these conditions D-glucose is not an efficient reducer [16].

Like the initial conditions of Brown's experiment, 300 equivalents (relative to bismuth) of D-glucose and a magnetic stirring were tested. In these conditions, reaction mixture was heterogeneous (incomplete solubility of D-glucose in PPD at  $C=3.5\text{M}$ ). Reaction time was enough difficult to control (60 s before quenching by pouring the mixture on ice water) that could explain the high hydrodynamic diameter obtained in our hands around 300 nm.

In order to better identify the key parameters of this reaction, several experiments were conducted (Table 1). To avoid this insolubility constraint (which is a main drawback to consider a synthesis using continuous flow) and to minimize the quantities of reactant in a green chemistry approach, D-glucose stoichiometry was reduced to 100 and 10 equivalents (Table 1, entry 1 and 2). Interestingly, when 10 equivalents of D-glucose (totally soluble in PPD at  $C=1.0\text{M}$ ) were introduced, the hydrodynamic size of bismuth NPs decreased to  $141 \pm 91$  nm in number. The reduction of D-glucose amount is essential to develop a process in a large scale according to green chemistry.

**Table 1.** Optimization of D-glucose quantities and reaction time by using magnetic stirring and sonication

Entry	D-Glucose (eq)	Activation	Purification	Time (min)	Hydrodynamic diameter nm (DLS) (Number)
1	100	heating	centrifugation	1	$322 \pm 18$
2	10	heating	centrifugation	1	$141 \pm 91$
3	10 <sup>a</sup>	heating	centrifugation	1	$227 \pm 155$
4	10 <sup>b</sup> (Sorbitol)	heating	centrifugation	1	$256 \pm 61$



<b>5</b>	10	heating	centrifugation	10	$75 \pm 32$
<b>6</b> (reproductibility)	10	heating	centrifugation	10	$72 \pm 30$
<b>7</b>	10	sonication <sup>c</sup>	ultrafiltration	10	$77 \pm 34$
<b>8</b> (reproductibility)	10	sonication	ultrafiltration	10	$80 \pm 37$
<b>9</b> (reproductibility)	10	sonication	ultrafiltration	10	$70 \pm 49$

<sup>a</sup> Modification of the order for reactants introduction.

<sup>b</sup> Sorbitol in place of D-glucose.

<sup>c</sup> Sonication conditions (0.9s on/0.1s off : 9 cycles)

Then we modified the order of introduction of reactants. Bismuth nitrate pentahydrate solution followed by borane morpholine solution and D-glucose (10 eq.) were successively added. The size measurement of NPs was quite similar ( $227 \pm 155$  nm in number) whatever the addition order (Table 1, entry 3). Therefore, no change was effected for reactants introduction in the following experiments. As borane morpholine could also reduce D-glucose into sorbitol, the same procedure was used with sorbitol (10 eq.) in place of D-glucose. We obtained bismuth NPs with a hydrodynamic diameter of  $256 \pm 61$  nm in number (Table 1, entry 4) whereas Brown et al. did not observed formation of bismuth NPs at all with sorbitol. This result confirms that D-glucose was not implicated in the reduction step of Bi (III) to Bi (0).

After having studied the influence of D-glucose stoichiometry, we investigated reaction times from 1 to 10 minutes in order to provide more easily reproducible protocols (Table 1, entry 2 and 5). After a few minutes, the mixture became black corresponding to bismuth NPs formation. Interestingly, bismuth NPs size decreased when reaction time increased to 10 minutes, (Table 1, entry 5) allowing to obtain a hydrodynamic diameter enough similar to the one described by Brown et al. ( $86 \pm 35$  nm in number). This result was reproduced a second time and a similar size of bismuth NPs was observed (Table 1, entry 6).

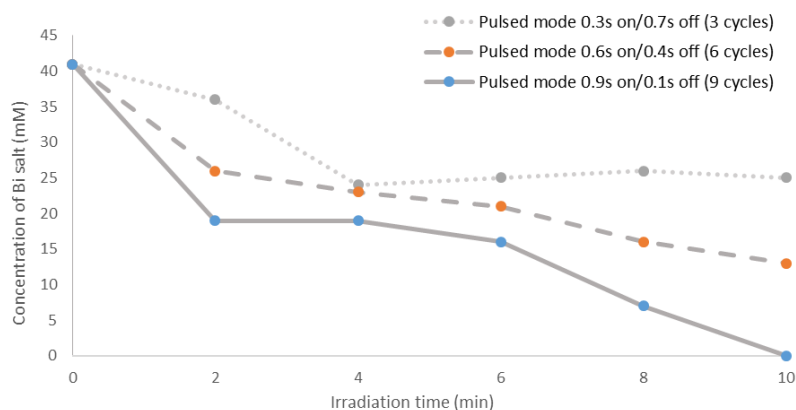
We then compared two energy delivery systems: a classical heating system at  $80^\circ\text{C}$  and sonication providing a maximum temperature of  $40^\circ\text{C}$  in batch (due to our instrumentation). With a reaction time of 10 minutes, the sizes of bismuth NPs were similar by using classical heating or sonication (Table 1, entry 5, 6, 7). Moreover a complete reduction of bismuth (III) nitrate pentahydrate was observed in these sonication conditions (0.9s on/0.1s off : 9 cycles) as shown below in figure 1. Interestingly, sonication at  $40^\circ\text{C}$  allowed the smooth formation of bismuth NPs with an efficient stirring and less thermic energy as we observed a size of bismuth NPs around 77 nm in DLS (Table 1, entry 7). Ultrasound assisted synthesis allowed an efficient stirring *via* physical effects such as microjets and shockwaves in the solution [17] and has been described as a favorable approach to control the NPs size [18] and their monodispersity.

The reproducibility was tested on three runs to ensure robustness of our protocol, which is a major issue in nanoparticles synthesis [19]. Two further experiments, under sonication in 10 min, provided similar DLS size distributions in number (Table 1, entry 7, 8 and 9). Only the Bi NPs obtained in our best experimental conditions (entry 9, table 1) were measured by TEM (figure 4). The hydrodynamic size measured by DLS ( $70 \pm 49$  nm) is greater than the size measured in TEM ( $5.2 \pm 0.5$  nm) which indicates an aggregation of Bi NPs in solution.



From a mechanistic point of view, we have verified that the sonication does not induce the phenomenon of reduction of the Bi (III) salt. Indeed no nanoparticles were observed without the introduction of borane morpholine as reducing agent under sonication.

The influence of irradiation cycles on the reduction rate of bismuth (III) nitrate pentahydrate reduction has been also studied by analogy with the work performed on gold NPs [20].



**Figure 1.** Concentration of Bi (III) according to irradiation time for different pulsed modes

At the beginning ( $t = 0$ , Figure 1), the measured Bi (III) concentration (41 mM) was identical to the initial Bi (III) concentration. The rate of bismuth (III) nitrate pentahydrate reduction increased with the number of irradiation cycles (3 cycles < 6 cycles < 9 cycles). So only 16 mM of bismuth (III) nitrate pentahydrate were reduced with a pulsed mode of 0.3s on/0.6s off (3 cycles) whereas a complete reduction was obtained in 10 min with a pulsed mode of 0.9s on/0.1s off (9 cycles) (Figure 1).

These interesting results reported above in batch were then adapted to continuous flow conditions in order to improve the productivity of metallic bismuth NPs synthesis. The literature shows that continuous flow systems allow in particular to improve the mass and heat transfer as well as reduce the synthesis reaction times [21], which is a major advantage especially in term of reproducibility and scaling-up of metallic NPs synthesis [22].

For that purpose, we designed a millifluidic set up consisting of a HPLC pump with a flow rate of 1.5 mL/min to inject the reactional mixture in Teflon tubing heated by sonication (Figure 2). The reactor of the continuous flow system is inspired from the literature [23] and is made of a Teflon cylinder that holds the Teflon tubing. The synthesized metallic bismuth NPs were cooled at the exit of the cylinder at room temperature and then collected.

**Figure 2.** a. A photograph of millifluidic system b. A photograph of the reactor with Teflon tubing.



The ultrasound assisted synthesis conditions developed in batch (stoichiometry, concentration) have been preserved to adapt bismuth NPs synthesis to the continuous flow. To



compare batch process to continuous flow, hydrodynamic diameters were measured by DLS (Table 2).

**Table 2.** Comparison of reaction conditions between sonication in batch or continuous flow

Entry	D-Glucose (eq)	Activation	Temperature	Flow rates	Hydrodynamic diameter nm (DLS) (Number)
1	10	batch sonication	40°C	-	70 ± 49
2	10	batch sonication	60°C	-	70 ± 16
3	10	continuous flow / sonication	60°C	1,5 ml/min	45 ± 14

In batch conditions, the increase of temperature from 40°C to 60°C has no significant influence on Bi NPs sizes (Table 2, entry 1 and 2) as similar hydrodynamic diameters were obtained (70 ± 16 nm against 70 ± 49 nm).

In flow conditions coupled to sonication, a minimum temperature of 60 ° C is necessary (at lower temperature, no nanoparticles were observed). Smaller sizes were measured by DLS when using continuous flow coupled to sonication (Table 2, entry 3) in comparison to batch conditions (Table 2, entry 1 and 2). The better control of hydrodynamic particle size and monodispersity is frequently observed in flow system. These results were confirmed by TEM analyses and compared below (Figure 3, A, B).

***As regards of productivity, our millifluidic set up has allowed to produce 1.5g of bismuth NPs per hour against 400mg under sonication in batch.***

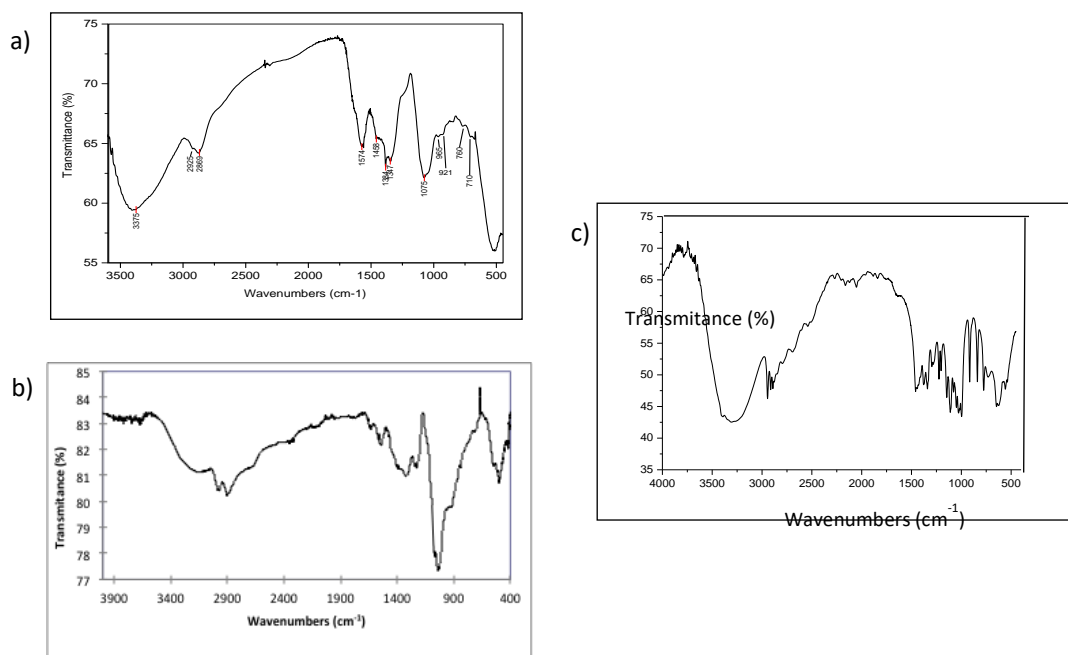
After optimization of the different parameters (D-glucose quantities (10 equiv.), time (10 min), heating mode (classical or sonication) and scale up of bismuth NPs synthesis using continuous flow coupled to sonication), we compared two techniques to purify metallic bismuth NPs : centrifugation and ultrafiltration.

First, by reducing the amount of D-glucose used in the reaction, purification steps were simplified. Consequently, less water washings were required to remove excess of reactants or byproducts. Centrifugation is among the most established techniques for isolating NPs from the bulk reaction mixture and for all described synthesis of metallic bismuth NPs, this mode of purification was used [6]. Centrifugation was used for optimization of the reaction (Table 1, entry 1 to 6). However, centrifugation is time and solvent consuming. To eliminate byproducts and excess reagents, we opted for ultrafiltration, which is faster, reliable and safer in comparison to centrifugation [13]. Further, the conductivity of the filtrate was controlled during the ultrafiltration to minimize the water volume and to purify bismuth NPs from any residual salts. Purification by ultrafiltration gave results in terms of hydrodynamic size comparable to those obtained by centrifugation (Table 1, entry 5 and 7). These results showed an easy, fast and efficient (decrease of reagents quantities, less wastes) purification procedure to isolate bismuth NPs. Therefore ultrafiltration has been chosen to purify bismuth NPs obtained by flow chemistry coupled to sonication.

Further characterizations of bismuth NPs obtained by sonication in batch (Table 1, entry 7) and flow chemistry (Table 2, entry 2) were performed.



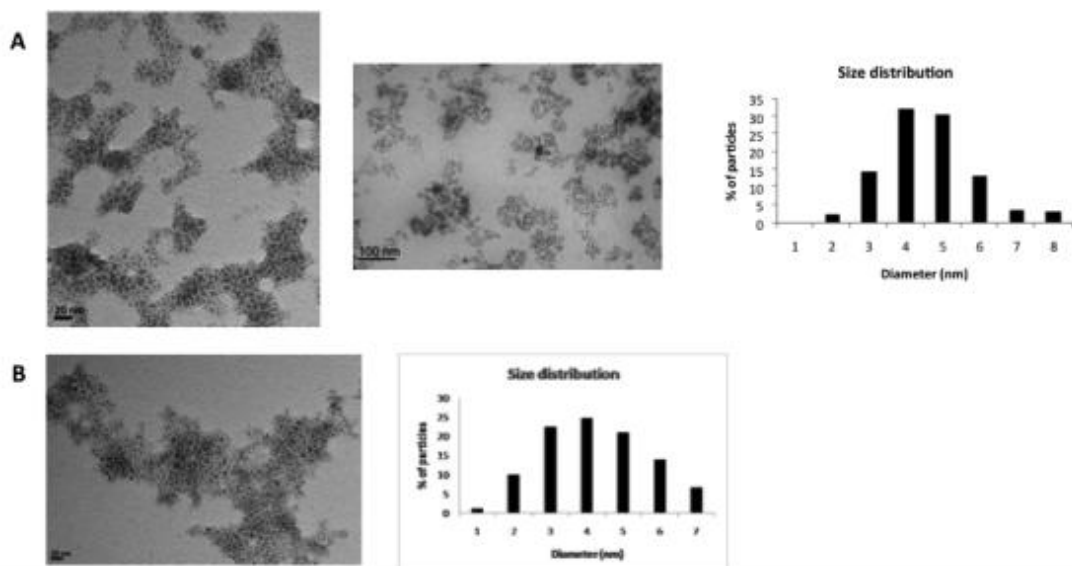
Isolated NPs were characterized by Fourier Transform InfraRed (FT-IR) spectroscopy and compared to starting material (Figure 3). Differences between D-glucose alone and bismuth NPs are numerous. A large band centered at  $3375\text{ cm}^{-1}$  for OH function on bismuth NPs showed the presence of D-glucose as an essential component of NPs coating. A significant shift from  $3250$  to  $3375\text{ cm}^{-1}$  suggested a high association between D-glucose and surface of bismuth NPs. Others major peaks such as C-C bands ( $1384\text{ cm}^{-1}$ ,  $1347\text{ cm}^{-1}$ ) and C-O band ( $1075\text{ cm}^{-1}$ ) demonstrated the presence of D-glucose. Nevertheless, bands arising from PPD cannot be totally excluded. Another band at  $528\text{ cm}^{-1}$  is also observed related to Bi-O bonds [24] between the bismuth and the D-glucose coating.



**Figure 3.** FT-IR spectra of bismuth NPs obtained under sonication in batch (a), bismuth NPs under continuous flow coupled to sonication (b) and D-glucose (c).

Complementary analyses were done by TEM to characterize size and morphology of bismuth NPs (Figure 4). This size distribution was manually measured for 300 NPs per TEM grid. A mean diameter in TEM of  $5.2 \pm 0.5\text{ nm}$  (Figure 4, A) was measured for bismuth NPs obtained under sonication in batch (Table 1, entries 7-9) and a relatively similar particle size distribution was observed for homogenous bismuth NPs obtained by flow chemistry coupled to sonication ( $5.8 \pm 0.5\text{ nm}$ ) (Figure 4, B).

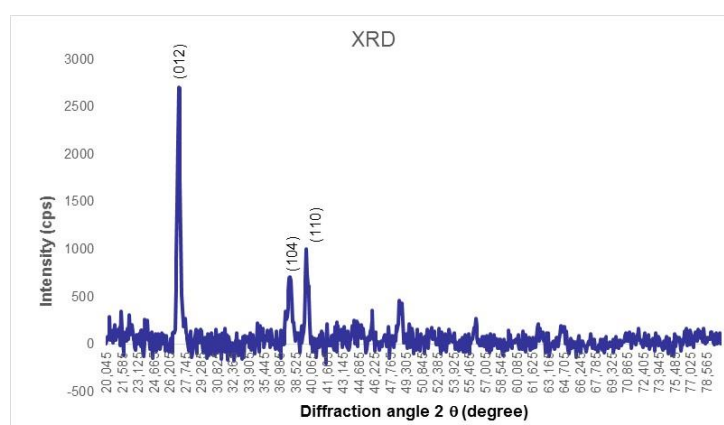




**Figure 4.** (A) Transmission Electron Microscopy images of synthesized bismuth NPs under sonication in batch and size distribution. (B) Transmission Electron Microscopy images of spherical synthesized bismuth NPs by flow chemistry coupled to sonication and size distribution.

Faceted nanoparticles and few spherical nanoparticles were observed in the samples in batch and continuous flow. The sizes obtained by TEM are much smaller than the hydrodynamic diameters measured by DLS, which shows that the hydrodynamic sizes represent aggregates of bismuth NPs and that the continuous flow process coupled to sonication decreases the size of the aggregates (table 2).

The metallic character of bismuth NPs has been confirmed by XRD analysis and compared with known XRD data for bulk bismuth (JCPDS 85-1329) [25].

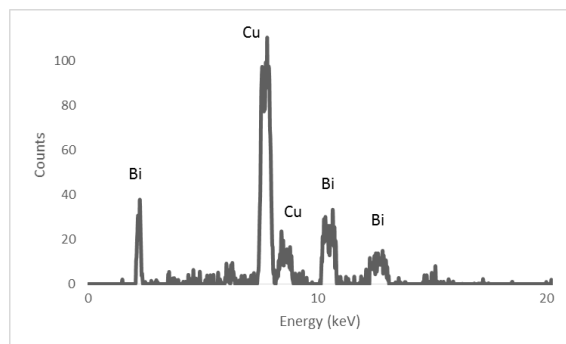


**Figure 5.** XRD pattern of the synthesized bismuth NPs under sonication.

The XRD peaks at  $2\theta$  of  $27.12^\circ$ ,  $37.97^\circ$  and  $39.58^\circ$  can be respectively attributed to the (012), (104), (110) crystallographic planes of the bismuth crystal (Figure 5). The diffraction peaks could be indexed to the rhombohedral bismuth phase. The lattice constants were calculated with  $a = 4.54 \text{ \AA}$  and  $c = 11.85 \text{ \AA}$ , very close to the reported data  $a = 4.546 \text{ \AA}$  and  $c = 11.860 \text{ \AA}$  (JCPDS 05-0519).



The elementary composition analysis of bismuth NPs was performed by energy-dispersive X-ray analysis (Figure 6).



**Figure 6.** EDX pattern of the synthesized bismuth NPs under sonication.

This analysis demonstrates that bismuth NPs are composed only of bismuth as reported in the literature [9] (the copper peaks result from copper grids used for analysis).

All of the FT-IR, TEM, XRD and EDX analyses confirm the production of D-glucose coated metallic bismuth NPs.

#### 4. Conclusion

To achieve a greener chemistry process to obtain metallic bismuth NPs, synthetic protocol and purification were optimized by minimizing reagents stoichiometry, energy cost, time of purification and reducing wastes. A robust, reproducible and productive process was proposed. Metallic bismuth NPs were synthesized by sonication in batch in 10 min and purified by ultrafiltration to get a reproducible DLS size distribution. For the first time, an experimental device of continuous flow coupled to sonochemistry has been developed to synthesize and produce, in a large scale, metallic bismuth NPs. In addition to improving productivity, this millifluidic system also allows to obtain bismuth NPs of smaller hydrodynamic size compared to the batch process.

Several parameters could be yet improved to provide optimal process in terms of green chemistry: especially replacing morpholine borane by a less harmful reducer and substituting PPD with a greener solvent.

Obtained by a promising synthesis in flow chemistry and a fast purification process, these nanomaterials are interesting for future medicinal applications as XCA.

#### Acknowledgements

The present work has benefited from the facilities and expertise of the Electron Microscopy facilities of Imagerie-Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr/spip.php?article282>). This core facility is member of the Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBiSA), and is supported by the French national Research Agency under Investments for the Future programs “France-BioImaging”, and the Labex “Saclay Plant Science” (ANR-10-INSB-04-01 and ANR-11-IDEX-0003-02, respectively). We thank Isabelle Billault from the ICMO Institute (Paris-Saclay University) for her assistance in the FTIR experiments. XRD analyses were performed in the laboratory of Chimie des Interactions Plasma-surface (ChIPS) (Mons University) by Adriano Panepinto.



## References

- [1] O. Rabin, J.M. Perez, J. Grimm, G. Wojtkiewicz, R. Weissleder, An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles. *Nat. Mater.* 5 (2006) 118.
- [2] A.L. Brown, P.C. Naha, V. Benavides-Montes, H.I. Litt, A.M. Goforth, D.P. Cormode, Synthesis, X-ray Opacity, and Biological Compatibility of Ultra-High Payload Elemental Bismuth Nanoparticle X-ray Contrast Agents. *Chem. Mat.* 26 (2014) 2266.
- [3] (a) M. Alqathami, A. Blencowe, U.J. Yeo, R. Franich, S. Doran, G. Qiao, M. Geso, Enhancement of radiation effects by bismuth oxide nanoparticles for kilovoltage x-ray beams: A dosimetric study using a novel multi-compartment 3D radiochromic dosimeter, *J. P. C. S.* 444 (2013) 1-6. (b) K.Y. Niu, J. Park, H. Zheng, A.P. Alivisatos, Revealing Bismuth Oxide Hollow Nanoparticle Formation by the Kirkendall Effect, *Nano Lett.* 13 (2013) 5715-5719.
- [4] (a) K. Ai, Y. Liu, J. Liu, Q. Yuan, Y. He, L. Lu, Large-Scale Synthesis of  $\text{Bi}_2\text{S}_3$  Nanodots as a Contrast Agent for In Vivo X-ray Computed Tomography Imaging, *Adv. Mater.* 23 (2011) 4886-4891. (b) J.M. Kinsella, R.E. Jimenez, P.P. Karmali, A.M. Rush, V.R. Kotamraju, N.C. Gianneschi, E. Ruoslahti, D. Stupack, M.J. Sailor, X-Ray Computed Tomography Imaging of Breast Cancer by using Targeted Peptide-Labeled Bismuth Sulfide Nanoparticles, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 12308-12311. (c) J. Zhang, W. Zhang, Z. Yang, A chemical lithography route to  $\text{Bi}_2\text{S}_3$  nanotubes, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 6239-6242. (d) M. Ma, Y. Huang, H. Chen, X. Jia, S. Wang, Z. Wang, J. Shi,  $\text{Bi}_2\text{S}_3$ -embedded mesoporous silica nanoparticles for efficient drug delivery and interstitial radiotherapy sensitization. *Biomaterials* 37 (2015) 447-455.
- [5] M.S. Kandanapitiye, M. Gao, J. Molter, C.A. Flask, S.D. Huang, Synthesis, Characterization, and X-ray Attenuation Properties of Ultrasmall BiOI Nanoparticles: Toward Renal Clearable Particulate CT Contrast Agents. *Inorg. Chem.* 53 (2014) 10189-10194.
- [6] C. Gomez, G. Hallot, M. Port, Bismuth metallic nanoparticles in A.M. Grumezescu Inorganic frameworks as smart nanomedicines. *Pharmaceutical Nanotechnology Series*, Elsevier (2018) 1-699.
- [7] (a) A.L. Brown, A.M. Goforth, pH-Dependent Synthesis and Stability of Aqueous, Elemental Bismuth Glyconanoparticle Colloids: Potentially Biocompatible X-ray Contrast Agents. *Chem. Mat.* (2012) 1599-1605. (b) F. Xia, X. Xu, X. Li, L. Zhang, L. Zhang, H. Qiu, W. Wang, Y. Liu, J. Gao, Preparation of Bismuth Nanoparticles in Aqueous Solution and Its



Catalytic Performance for the Reduction of 4-Nitrophenol. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014)10576-10582.

[8] (a) Y. Wang, J. Zhao, X. Zhao, L. Tang, Y. Li, Z. Wang, A facile water-based process for preparation of stabilized Bi nanoparticles, *Mater. Res. Bull.*44 (2009) 220-223. (b) H. Yang, J. Li, X. Lu, G. Xi, Y. Yan, Reliable synthesis of bismuth nanoparticles for heavy metal detection. *Mater. Res.*48 (2013) 4718-4722.

[9] D. Ma, J. Zhao, Y. Zhao, X. Hao, L. Li, L. Zhang, Y. Lu, C. Yu, Synthesis of bismuth nanoparticles and self-assembled nanobelts by a simple aqueous route in basic solution, *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects* 395 (2012) 276-283.

[10] L. Balan, R. Schneider, D. Billaud, Y. Fort, J. Ghanbaja, A new synthesis of ultrafine nanometre-sized bismuth particles, *Nanotech.*15 (2004) 940-944.

[11] Y.W. Wang, B.H. Hong, K.S.J. Kim, Size Control of Semimetal Bismuth Nanoparticles and the UV-Visible and IR Absorption Spectra. *Phys.Chem. B*109 (2005) 7067-7072.

[12] PPD is produced from renewable resources using microbes (G.N. Bennett, K.Y. San, Microbial formation, biotechnological production and applications of 1,2-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*55 (2001) 1-9) or is obtained from glycerol by hydrogenolysis (M.A. Dasari, P.P. Kiatsimkul, W.R. Sutterlin, G.J. Suppes, Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Appl. Catal. A*281 (2005) 225-231).

[13] J.A. Dahl, B.L.S. Maddux, J.E. Hutchison, Toward Greener Nanosynthesis. *Chem. Rev.* 107 (2007) 2228-2269.

[14] (a) B. Palasinamy, B.K. Paul, R.T. Eluri, Controlled synthesis of nanoparticles using ultrasound in continuous flow. Patent US 2014/0255293. (b) B. Palanisamy, B. Paul, C.H. Chang, The synthesis of cadmium sulfide nanoplatelets using a novel continuous flow sonochemical reactor. *Ultrason. Sonochem.* 26 (2015) 452-460. (c) T. Banert, C. Horst, U. Kunz, U. Peuker, Continuous precipitation in an ultrasonic flow reactor as illustrated by iron(II,III) oxide. *Chem. Ing. Tech.* 76 (2004) 1380-1381.

[15] M. Faisal, A.A. Ismail, F.A. Harraz, H. Bouzid, S.A. Al-Sayari, A. Al-Hajry, Highly selective colorimetric detection and preconcentration of Bi(III) ions by dithizone complexes anchored onto mesoporous TiO<sub>2</sub>. *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011) 1-7.

[16] T. Ishizaka, A. Ishigaki, H. Kawanami, A. Suzuki, T. M. Suzuki, Dynamic control of gold nanoparticle morphology in a microchannel flow reactor by glucose reduction in aqueous sodium hydroxide solution. *J. Colloid Interface Sci.* 367 (2012), 135-138.



- [17] J.H. Bang, K.S. Suslick, Applications of Ultrasound to the Synthesis of Nanostructured Materials. *Adv. Mat.* 22 (2010) 1039-1059.
- [18] S.C. Warren, A.C. Jackson, Z.D. Cater-Cyker, F.J. DiSalvo, U. Wiesner, Nanoparticle Synthesis via the Photochemical Polythiol Process. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 10072-10073.
- [19] (a) M.K. Bayazit, J. Yue, E. Cao, A. Gavriilidis, J. Tang, Controllable Synthesis of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution by Microwave Assisted Flow Chemistry. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 4 (2016) 6435-6442. (b) J.C. Leroux, Drug Delivery : Too Much Complexity, Not enough Reproducibility. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (2017) 15170-15171.
- [20] (a) K. Okitsu, A. Yue, S. Tanabe, H. Matsumoto, Y. Yobiko, Y. Yoo, Sonolytic Control of Rate of Gold (III) Reduction and Size of Formed Gold Nanoparticles: Relation between Reduction Rates and Sizes of Formed Nanoparticles. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 75 (2002) 2289-2296. (b) K. Okitsu, B.N. Teo, M. Ashokkumar, F. Grieser, Controlled Growth of Sonochemically Synthesized Gold Seed Particles in Aqueous Solutions Containing Surfactants. *Aust. J. Chem.* 58 (2005) 667-670.
- [21] P.R. Makgwane, S.S. Ray, Synthesis of Nanomaterials by Continuous-Flow Microfluidics: A Review. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14 (2014) 1338-1363.
- [22] E. Shahbazali, V. Hessel, T. Noël, Q.Wang, Metallic nanoparticles made in flow and their catalytic applications in organic synthesis. *Nanotechnol Rev.* 3 (2014), 65-86.
- [23] O. Garagalza, C. Petit, E. Mignard, F. Sarrazin, S. Reynaud, B. Grassl, Droplet-based millifluidic device under microwave irradiation: Temperature measurement and polymer particle synthesis. *Chem. Eng. J.* 308 (2017) 1105-1111.
- [24] F. He, Z. He, J. Xie, Y. Li, IR and Raman Spectra Properties of Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ZnO-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-BaO Quaternary Glass System. *Am. J. Analyt. Chem.* 5 (2014) 1142-1150.
- [25] Y. Zhao, Z. Zhang, H. Dang, A simple way to prepare bismuth nanoparticles. *Mat. Lett.* 58 (2004) 790-793.



5.3 Annexe 3 : Résultats du choix du ligands

Ligands	Diamètres (nm) en nombre à pH=7 (Proportions %)	Potentiels zêta à pH=7 (mV)	Stabilité
Citrate de sodium (nanoparticules de départ)	30±120 (100%)	-5	5 minutes
(R)-acide lipoïque	342±107 (72%) 4429±910 (1%) 136±19 (27%)	-35	2 heures
Cystéine	67±15 (95%) 263±125 (5%)	-33	1 heure
N-Acétylcystéine	52±11 (60%) 150±70 (40%)	-26	30 minutes
Hexamétaphosphate de sodium	86±16 (63%) 292±66 (30%) 790±147 (7%)	-35	45 minutes



## Annexes

Glucosamine	197±51 (25%) 681±143 (12%) 73±10 (63%)	-38	30 minutes
Diéthylènetriamine	303±163 (100%)	-35	45 minutes
Acide mercaptosuccinique	110±59 (100%)	-26	15 minutes
Mercapto éthanol	505±98 (12%) 153±28 (88%)	-22	20 minutes
Acide malique	301±96 (94%) 955±177 (6%)	-42	5 minutes
Cyclodextrine	64±9 (35%) 110±26 (58%) 370±95 (5%)	-36	35 minutes
Spermidine	198±108 (100%)	-35	20 minutes
2,3-dihydroxybenzoïque	86±51(100%)	-12	5 minutes
L'acide Salicylhydroxamique	63±12 (57%) 194±20 (43%)	-20	30 minutes
Dimercaptopropanol	113±19 (17%) 317±149 (83%)	-28	10 minutes
Thioglucose	Sédimentation	N.D.	Instable
Thio salicylique	Sédimentation	N.D.	Instable
Acide aspartique	Sédimentation	N.D.	Instable
Acide glutamique	Sédimentation	N.D.	Instable
Sérine	202,3±32 (29%) 331,2±57 (29%) 688,8±167 (42%)	-31	<5 minutes
Dopamine	Sédimentation	N.D.	Instable



## Annexes

Tiopronine	469±154 (100%)	+ 10	<10 minutes
Acide dimercapto succinique	121 ±442 (30%) 237±39 (56%) 730±130 (6%)	-35	<15 minutes
Cystéamine	191±32 (24) 425±113 (76)	-35	<15 minutes
Acide glucoronique	82±12 (34%) 169±39 (60%) 692±123 (7%)	-41	<15 minutes
EDTA	603±165 (100%)	-42	<10 minutes
Xylitol	97±16 (56%) 231±82 (45%)	-42	<5 minutes
Acide alendronique	Décomposition chimique des nanoparticules	N.D.	N.D.
Acide tamique	Sédimentation	N.D.	Instable
Lysine	Sédimentation	N.D.	Instable
Éthylène diamine	Sédimentation	N.D.	Instable
Alanine	Sédimentation	N.D.	Instable
Cellulose	Sédimentation	N.D.	Instable
Dimercaptopropanol	113± 19 (17%) 317±149 (83%)	-26	15 minutes
2,3dihydroxybenzoïque	Sédimentation	N.D.	Instable
Oléate de sodium	Sédimentation	N.D.	Instable
Dextran	Sédimentation	N.D.	Instable



## Annexes

PVP	Sédimentation	N.D.	Instable
Pectine	Sédimentation	N.D.	Instable
Amidon	Sédimentation	N.D.	Instable
Chitozan	Sédimentation	N.D.	Instable
Gomme de gellane	Sédimentation	N.D.	Instable
Glutathion	Décomposition chimique des nanoparticules	N.D.	N.D.



#### 5.4 Annexe 4 : Principe des techniques de caractérisation

##### • Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS est une technique optique qui utilise le mouvement Brownien pour mesurer le coefficient de diffusion  $D$  afin de déterminer le diamètre des particules en suspension. Un dispositif de DLS est représenté sur le schéma de principe ci-dessous en figure 145.

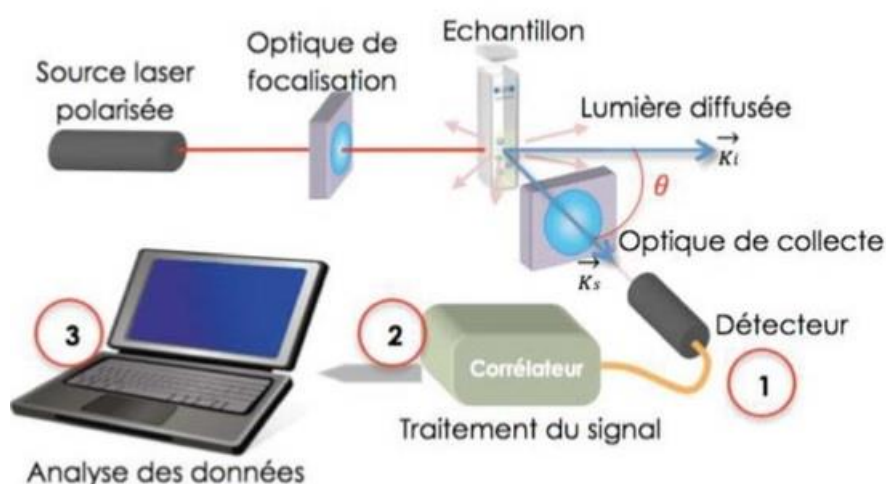


Figure 146 : le dispositif de DLS

Afin de déterminer le coefficient de diffusion, une source laser polarisée linéairement émet un rayonnement à une longueur d'onde  $\lambda$  (typiquement 633 nm) sur l'échantillon contenant les nanoparticules à mesurer. La lumière diffusée par les nanoparticules est ensuite collectée à un angle de diffusion  $\theta$  connu (typiquement  $90^\circ$  par rapport au faisceau incident) grâce à un détecteur à comptage de photons de haute sensibilité.

Après avoir mesuré le coefficient de diffusion, le diamètre de la nanoparticule est déterminé suivant l'équation :

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

- $D_h$  représente le diamètre hydrodynamique
- $D_t$  est le coefficient de diffusion transversal
- $k_B$  est la constante de Boltzmann
- $T$  est la température thermodynamique
- $\eta$  est la viscosité dynamique

##### • Potentiel zêta



La charge de la nanoparticule est déterminée à partir de son coefficient de diffusion. Ce coefficient est déterminé à partir du champ électrique appliqué ainsi que de la vitesse des particules mesurée. Le potentiel zêta est alors calculé à partir de la mobilité en utilisant un modèle, dont le plus courant est celui de Smoluchowski. Les seuls paramètres nécessaires à la détermination du potentiel zêta sont la constante diélectrique du liquide, son indice de réfraction et sa viscosité.

- **Granulomètre**

Le granulomètre est utilisé pour des particules sphériques qui ont un diamètre supérieur à la longueur d'onde du laser. Dans la solution, les particules se déplacent grâce au mouvement Brownien. Lorsque le faisceau laser est envoyé sur une particule, des franges de diffraction sont observées. Selon, la théorie de Fraunhofer, l'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction sont fonction de la taille des particules. En effet, plus la particule diffracte la lumière, plus le diamètre de celle-ci est important.

- **Spectroscopie infrarouge**

Sous irradiation d'onde infrarouge, la molécule absorbe l'énergie si la fréquence du rayonnement correspond à la fréquence de la vibration de la liaison considérée. De plus, chaque fonction organique a son propre spectre d'absorption infrarouge.

- **Spectroscopie UV-Visible**

Sous irradiation UV-visible, l'énergie absorbée permet de promouvoir un électron d'une orbitale de l'état fondamental à une orbitale de l'état excité.

- **Thermogravimétrie (TGA)**

Cette technique permet de quantifier les agents de revêtement présents à la surface des nanoparticules. Une masse connue de nanoparticules est placée sur une nacelle qui est reliée à une balance puis un gradient de température est programmé. Une perte de masse à une température précise est observée et celle-ci est caractéristique de la molécule organique présente à la surface de la nanoparticule.

- **Diffraction des rayons X**

Cette méthode donne des informations sur la taille moyenne du grain, la cristallinité. Elle est basée sur la diffraction du rayonnement X par les mailles cristallines grâce un phénomène d'interférence d'ondes constructives entre les mailles du cristal à certains angles. Cette



méthode permet donc de calculer l'angle d'orientation de la maille cristalline par rapport au faisceau incident des rayons X pour obtenir des interférences constructives. L'intensité de ces interférences est déterminée par la distribution des atomes à l'intérieur du réseau. Par conséquent, le graphe de diffraction des rayons X est l'empreinte digitale du dispositif atomique périodique dans un matériau donné.

$$diamètre = \frac{k\lambda}{(H - s)\cos\theta}$$

$\lambda$ : longueur de l'onde incidente

$\theta$ : est la moitié de la déviation de l'onde

k : est un facteur de correction

H : largeur à mi-hauteur

s : largeur à mi-hauteur provoqué par l'appareillage

- **Spectrométrie de photoélectrons X (XPS)**

L'XPS est une méthode d'analyse de surface élémentaire qualitative et semi quantitative dont la profondeur d'analyse approximative est entre 0 et 5 nm. Le principe de la photoémission est basé sur le fait qu'en absorbant un photon, un atome reçoit une quantité d'énergie  $h\nu$ . Il émet dès lors un électron afin de conserver son état de stabilité initial. L'électron ainsi éjecté prend la totalité de l'énergie du photon incident, il se libère de l'atome et de la matière et se déplace grâce à une énergie cinétique (Figure 146).

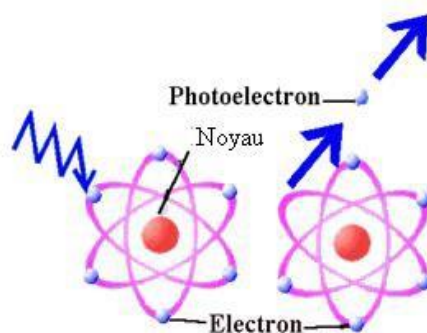


Figure 147 : Principe de XPS

L'énergie cinétique du photoélectron est mesurée par un analyseur hémisphérique. L'énergie de liaison de celui-ci dans la matière est déterminée par la loi de conservation de l'énergie :

$$h\nu = E_{\text{cinétique}} + E_{\text{liaison}}$$

$h\nu$  : l'énergie incidente du faisceau de rayons X

$E_{\text{cinétique}}$  : l'énergie cinétique du photoélectron à la sortie de l'échantillon



E liaison : l'énergie de liaison dans l'atome.

- **Microscopie électronique en transmission (TEM) et Cryo-TEM**

Dans cette technique de caractérisation, un faisceau d'électron de longueur d'onde bien définie est focalisé à l'aide de champs magnétiques. Le faisceau d'électron traverse l'échantillon et l'image est reçue sur un écran. La différence entre la TEM et la Cryo-TEM est la congélation de l'échantillon à -183 °C en Cryo-TEM.

- **Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP)**

L'échantillon est vaporisé au cœur d'un plasma induit d'argon qui peut atteindre des températures de 8000 °C. A cette température, toute substance à analyser subit une excitation thermique. Les ions excités dans le plasma vont émettre un rayonnement caractéristique pour chaque élément chimique.

- **RMN diffusionnelle**

La mesure du coefficient de diffusion par RMN repose sur l'utilisation de gradient de champs pulsés (Pulse Field Gradient : PFG). Après l'application d'un premier gradient de champ  $G_z$ , deux molécules de tailles différentes, au même endroit d'un échantillon, vont diffuser différemment pendant un temps  $t$  (délai de diffusion) et selon leur masse. Ainsi, après ce délai, les deux molécules vont se trouver à des endroits différents dans le tube. Quand un second gradient de champ est appliqué, les deux molécules ne sont donc pas soumises à la même intensité de champ. On peut donc déterminer le coefficient de diffusion en représentant l'intensité observée en fonction de l'intensité du gradient de champ.

- **Test de stérilisation**

La stérilisation à la vapeur d'eau est la méthode de référence. Elle utilise la vapeur d'eau comme agent stérilisant et permet d'assurer, par exemple, la préparation du matériel stérile pour les blocs opératoires.

- **Microscopie optique**

Le microscope optique est constitué d'un tube qui possède à ses deux extrémités des lentilles. La première lentille dirigée vers l'objet à examiner constitue l'objectif. Les lentilles restituent une image réelle, inversée et agrandie de l'objet et se trouve au sein du tube optique, c'est l'image intermédiaire (Figure 147).



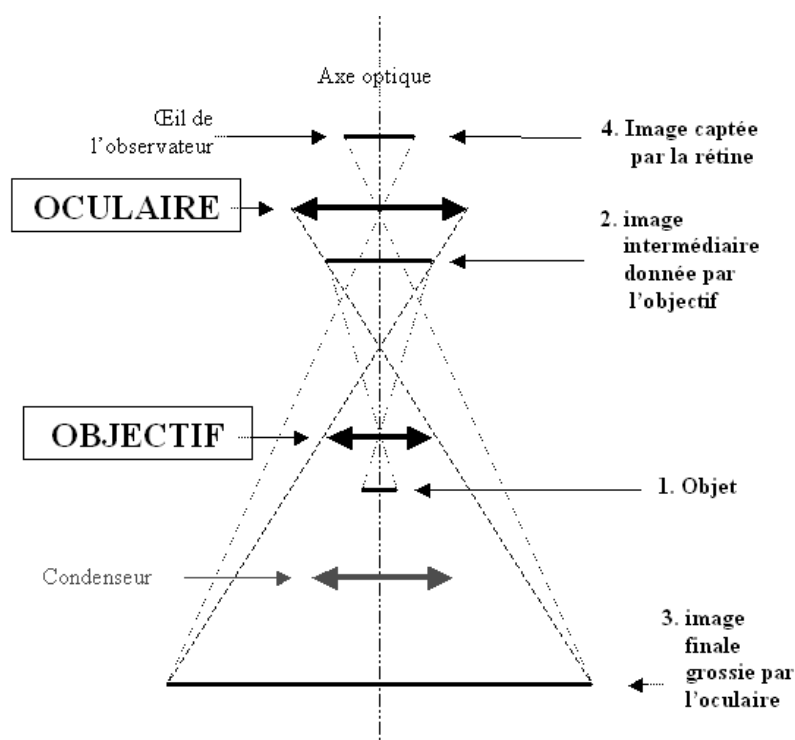


Figure 148 : dispositif du microscope optique

La deuxième lentille dirigée vers l'œil de l'observateur est appelée oculaire et fonctionne comme une simple loupe qui grossit l'image précédente. L'image définitive virtuelle obtenue correspond au grossissement total du microscope qui est égal au produit du grossissement de l'objectif par le grossissement de l'oculaire.

- **Turbiscan**

Le turbiscan est basé sur la diffusion de la lumière par les nanoparticules. A chaque pas de 40  $\mu\text{m}$ , un faisceau lumineux est émis dans le proche infrarouge ( $\lambda = 880 \text{ nm}$ ) et est diffusé dans l'échantillon. La lumière rétrodiffusée et celle transmise par l'échantillon sont collectées par des détecteurs placés respectivement à  $0^\circ$  et  $40^\circ$  par rapport au faisceau incident. Les profils de rétrodiffusion et de transmission obtenus constituent "une photo d'état" de la suspension et permettent de voir qualitativement les phénomènes naissants de déstabilisation (agglomération/sédimentation).







## **Synthèse, caractérisations et vectorisation des nanoparticules de bismuth métallique pour des applications théranostiques**

Les nanoparticules de bismuth métallique sont peu décrites dans la littérature et pourtant elles ont un fort potentiel médical. Leur utilité est notamment décrite dans des applications thérapeutiques et/ou diagnostiques. De plus, le bismuth est un élément abondant, peu cher et biocompatible. Dans ce projet, une synthèse robuste et reproductible de nanoparticules de bismuth métallique dans l'eau en procédé non continu a été développée en appliquant les principes de la nanochimie verte. Cette synthèse a ensuite été transférée en procédé continu pour augmenter la productivité d'obtention des nanoparticules. La caractérisation de leur surface, leur stabilité chimique et colloïdale ainsi que leur cytotoxicité ont été étudiées afin d'envisager leur utilisation en milieu biologique. Trois types de nanoparticules hydrophiles, hydrophobes et fluorophiles ont été obtenues après l'échange de ligand. Les nanoparticules hydrophiles ayant à leur surface du polyéthylène glycol sont stables pendant 24 heures dans le sérum physiologique. Les nanoparticules hydrophobes ont été incorporées dans des émulsions huile dans eau. En revanche, les nanoparticules polyfluorées ne contenant pas assez de fluor sur l'agent de revêtement n'ont pas pu être incorporées dans une huile fluorée. Enfin, une étude préliminaire n'a pas permis de montrer un effet de radiosensibilisation des nanoparticules de bismuth. Des études approfondies *in vitro* et *in vivo* de ces nanoparticules sont envisagées pour conclure définitivement sur leur effet radiosensibilisant.

**Mots-clés :** *nanoparticules de bismuth métallique, flux continu, fonctionnalisation, émulsions, radiosensibilisation, chimie verte.*

## **Synthesis, characterizations and vectorization of metallic bismuth nanoparticles for theranostic applications**

Metallic bismuth nanoparticles are poorly described in the literature and yet they have a high medical potential. Their utility is particularly described in therapeutic and/or diagnostic applications. In addition, bismuth is an abundant, inexpensive and biocompatible element. In this project, a robust and reproducible synthesis of metallic bismuth nanoparticles in water in a non-continuous process was developed by applying the principles of green nanochemistry. This synthesis was then transferred to a continuous process to increase the productivity of obtaining nanoparticles. The characterization of their surface, chemical and colloidal stability as well as their cytotoxicity were studied in order to consider their use in biological environments. Three types of hydrophilic, hydrophobic and fluorophilic nanoparticles have been obtained. Hydrophilic nanoparticles with polyethylene glycol on their surface are stable for 24 hours in saline solution. Hydrophobic nanoparticles have been incorporated into oil-in-water emulsions. On the other hand, polyfluorinated nanoparticles containing insufficient fluorine on the coating agent could not be incorporated into a fluorinated oil. Finally, a preliminary study did not show a radiosensitization effect of bismuth nanoparticles. *In vitro* and *in vivo* studies of these nanoparticles are planned to definitively conclude on their radiosensitizing effect.

**Keywords:** *metallic bismuth nanoparticles, continuous flow, functionalization, emulsion, radiosensitization, green chemistry.*