

**UNIVERSITE BLIDA 1**

**Faculté de Technologie**

Département de Génie des Procédés

## **THESE DE DOCTORAT**

En Génie des Procédés

Spécialité : Génie Des Procédés Organiques

### **SELECTION ET CARACTERISATION DE SUBSTANCES NATURELLES A CARACTERE TENSIOACTIF POUR LA MISE EN SUSPENSION DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS**

Par

**RAIAH Kenza**

Devant le jury composé de :

N. BOUCHENAF	Professeur	Université Blida 1	Présidente
H. GUERMOUCHE	Professeur	USTHB/Alger	Examineur
M. KHODJA	Professeur	Université Blida 1	Examineur
E. FLAHAUT	Professeur	CIRIMAT/Toulouse	Co-Directeur de thèse
A. HADJ-ZIANE	Professeur	Université Blida 1	Directrice de thèse

Blida, Juin 2015

## REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Génie Chimique de l'université Blida 1 et le CIRIMAT, Université Paul Sabatier de Toulouse dans le cadre d'un Projet de coopération Algéro-Français (Tassili). Je remercie vivement les personnes des deux parties Algérienne et Française qui ont mis à nos dispositions les moyens et ont facilités les procédures administratives pour nos déplacements.

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux encadreurs ; ma directrice de thèse M<sup>me</sup> Amel Hadj-Ziane-Zafour, Professeur à l'université Blida 1, qui a dirigé cette thèse, elle a su m'orienter dans mes recherches, tout en me faisant confiance et en me donnant les moyens d'y parvenir. Elle a toujours été disponible lorsque j'en avais le plus besoin et Dr Emmanuel Flahaut, HDR au Centre de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT) de Toulouse et Directeur de recherches au CNRS pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je le remercie pour sa patience, sa compréhension, sa grande disponibilité son aide indispensable qui ont rendu ce travail de thèse très enrichissant, sa compétence scientifique et son expérience m'ont été d'une grande aide.

J'adresse mes remerciements aux deux chefs des laboratoires Pr. H.Khalaf, directeur du laboratoire de Génie Chimique de Blida et Francis Maury, directeur du CIRIMAT sans oublier Christophe Laurent, Anne-Marie Galibert, Brigitte Soula et Alicia Weibel, membres de l'équipe NNC pour le climat agréable qu'ils ont su créer durant le déroulement des séjours.

Je tiens à remercier vivement Pr. N. Bouchenafa, vice rectrice de la Post-Graduation et la recherche scientifique, pour l'honneur de présider mon jury de thèse ainsi que les Pr. H. Guermouche de l'USTHB et le Pr. M. Khodja de l'université de Blida 1, pour avoir accepté de juger ce travail. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce manuscrit et pour le temps que vous y avez consacré.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe du laboratoire de Génie Chimique de l'université Blida 1, ainsi les personnes que j'ai eu le plaisir de connaître au cours de mes séjours au CIRIMAT, Tifania Bortholamiol, Vincent Baylac, Laure Latapie, Marie-Claire Barthélémy et Nabila Smahi. Je les remercie pour leurs disponibilités et pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de mes expériences.

Sans oublier de remercier vivement mon collègue Djalab Abdelkader enseignant chercheur à l'université de Blida et membre de l'équipe Tassili pour ses conseils et suggestions très enrichissants sans oublier bien évidemment l'ensemble des enseignants qui m'ont guidé tout au long de ma carrière scientifique.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur M. B.MANSOURI, Directeur Général du LNCPP (Laboratoire National du Contrôle des Produits pharmaceutiques), pour m'avoir assuré les bonnes conditions pour réaliser certaines parties pratiques de ma thèse. Aussi, j'adresse mes vifs remerciements à tous les membres de l'équipe du Laboratoire Pharmaco toxicité et toutes les personnes du LNCPP et précisément Dr. N. AMMI.

Mes remerciements aussi à Monsieur le CP A. FERRAGH, Sous Directeur de la Police Scientifique et Technique, Monsieur DP M.ZEKRI, Chef de service de la Police Scientifique et Technique, M<sup>me</sup> A.IZITI, Pharmacienne coordinatrice, Chef de section de toxicologie criminalistique et Mr T. Benayad, Chef de section contrôle de qualité alimentaire, pour leur aide précieuse.

Au-delà du laboratoire, je ne pourrai en ces circonstances oublier les personnes qui étaient à mes côtés dans les moments difficiles et qui ont suivi, parfois contre leur gré, cette thèse. Merci à mes parents, ma sœur, mes frères, ma fille LYNA, les amis(es) et toute ma famille.

Il est difficile de faire des remerciements complets et « représentatifs » alors je tiens juste à souligner quelques points, j'ai apprécié de travailler avec toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail de thèse.  
MERCİ

## RESUME

Les liquides ioniques à base d'imidazolium et à longue chaîne hydrocarbonée Iodure de 2-alkyl-1- (2-hydroxyéthyl)-1-méthylimidazolium ([M-E-C<sub>n</sub>-Im] I, n= 13, 15 et 17) ont été utilisés pour la mise en suspension des nanotubes de carbone à double parois (DWCNTs) dans des suspensions aqueuses.

Les suspensions de DWCNTs obtenues sont stables pendant plus d'un mois. La stabilité a été étudiée (mesures de densité optique, du potentiel Zêta, de la viscosité et observations par MET). Les mesures d'absorbance par spectrophotométrie UV/Vis sur une période de 20 jours ont démontré qu'à faible concentration (1mM), la meilleure dispersion (homogène et stable) est obtenue avec le liquide ionique [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I. Par contre, à une concentration égale à 10mM, le pouvoir dispersant augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée. Ceci qui peut être expliqué par l'interaction entre la partie hydrophobe du liquide ionique et les NTCs. La toxicité orale aiguë du liquide ionique a été évaluée. A cet effet, la méthode par classe de toxicité aiguë (méthode proposé par l'OCDE) a été utilisée. Le liquide ionique ([M-E-C<sub>17</sub>-Im] I) peut être considéré comme étant une molécule non toxique car il n'a causé ni mortalité ni incidence défavorable lors des tests de toxicité orale aiguë à un niveau allant jusqu'à la dose de 2000 mg / kg par poids corporel. Le test d'inhibition de la bioluminescence de la bactérie *Vibrio fischeri* a été utilisé pour la détermination de la toxicité aiguë des DWCNTs et de la suspension de DWCNTs avec le liquide ionique ([M-E-C<sub>17</sub>-Im] I). Aucune toxicité n'est apparue pour les DWCNTs jusqu'à la concentration de 50mg/l, par contre la CE50 des suspensions de liquides ioniques avec les DWCNTs est égale à 10mg/l.

## ABSTRACT

Imidazolium-based ionic liquids with a long hydrocarbon chain 2-alkyl-1- (2-hydroxyethyl)-1-methylimidazolium iodide ([M-E-C<sub>n</sub>-Im] I, n= 13, 15 and 17) were used for the dispersion of DWCNTs in water.

DWCNTs suspensions obtained were stable for more than a month. The stability of the suspensions was investigated (measurement of optical density, Zeta potential, particle size, viscosity, and TEM images). Monitoring of the absorbance by UV/Vis spectrophotometry for 20 days revealed that at low concentration (1mM), the best suspension was obtained with the ionic liquid ([M-E-C<sub>15</sub>-Im] I). At higher concentration (10mM), the dispersion efficiency increased with the length of the hydrocarbon chain. This could be explained by the hydrophobic interaction between the hydrophobic moieties of the ionic liquid and the CNTs. The acute oral toxicity of the ionic liquid ([M-E-C<sub>17</sub>-Im] I) was evaluated. For this purpose, the method by acute toxic class (method proposed by the OECD) was used. The ionic liquid can be considered as a non-toxic molecule because it has caused no death or adverse effect in the acute oral toxicity tests at a level up to a dose of 2000 mg / kg per body weight. The test for inhibition of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* was used for the determination of the acute toxicity of DWCNTs and DWCNTs suspensions with the ionic liquid ([M-E-C<sub>17</sub>-Im] I). No toxicity appeared for DWCNTs alone up to a concentration of 50 mg/l, however, the CE50 of suspensions of DWCNTs with ionic liquid was equal to 10 mg/l.

## الملخص

السوائل الأيونية ذات أساس اميدازولين وسلسلة طويلة الهيدروكربونية، استخدمت لتعليق أنابيب الكربون النانوية مزدوجة الجدران (DWCNTs) في المحاليل المائية.

تعليق أنابيب الكربون النانوية مزدوجة الجدران الذي تم الحصول عليه مستقر لأكثر من شهر. استقرار التعليق تم التحقق منه (قياس الكثافة البصرية، إمكانات زيتا، وحجم الجسيمات، واللزوجة، والصور المجهر الالكتروني الناقل). تحديد الامتصاصية بواسطة القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية / المرئية، اتباع حركية مدة عشرون يوم أظهرت في تركيز منخفض (1 مليمول)، تم الحصول على أفضل تعليق موحد ومستقر مع السائل الأيوني ذات الالكيل C<sub>15</sub>، وفي المقابل، عند التركيز 10 مليمول تزداد قدرة التعليق مع ازدياد طول السلسلة الهيدروكربونية. ويمكن تفسير ذلك من خلال التفاعل كاره للماء بين مجموعة الكارهة للماء من السائل الأيوني والأنابيب الكربونية النانوية. تم تقييم التسمم الحاد عن طريق الفم للسائل الأيوني لهذا الغرض، تم استخدام أسلوب حسب الفئة السامة الحادة (الطريقة المقترحة من قبل منظمة التعاون والتنمية الاقتصادية). يمكن اعتبار السائل الأيوني غير سام لأنه لم يتسبب بأي حالة وفاة أو تأثير سلبي في اختبار التسمم الحاد عن طريق الفم الى مستوى يصل حتى جرعة 2000 ملغ / كغ من وزن الجسم. تم استخدام اختبار تثبيط إضاءة الحيوية لبكتيريا (*Vibrio fische*) لتحديد التسمم الحاد لأنابيب الكربون النانوية مزدوجة الجدران و لتعليق أنابيب الكربون النانوية مزدوجة الجدران بالسائل الأيوني. لم يظهر أي تسمم لأنابيب الكربون النانوية مزدوجة الجدران حتى تركيز 50 ملغ/ لتر، في المقابل تعليق انابيب الكربون النانوية مزدوجة الجدران بالسائل الأيوني اظهر تسمم في تركيز يساوي 10 ملغ/ لتر.

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
RESUME	2
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	12
INTRODUCTION	16
1. NANOTUBES DE CARBONE	20
1.1. Introduction	20
1.2. Historique	20
1.3. Structure	21
1.4. Propriétés	23
1.4.1. Propriétés mécaniques	24
1.4.2. Propriétés électriques	24
1.4.3. Propriétés thermiques	26
1.5. Application des nanotubes de carbone	26
1.5.1. Electronique	26
1.5.2. Chimie	27
1.5.3. Biomédical	27
1.6. Synthèse des nanotubes de carbone	28
1.6.1. La méthode physique	29

1.6.2. La méthode chimique	29
1.7. Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone	29
1.7.1. Toxicité des nanotubes de carbone	30
1.7.2. Ecotoxicité des nanotubes de carbone	32
1.8. Conclusion	33
2. MISE EN SUSPENSION DES NANOTUBES DE CARBONE	34
2.1. Introduction	34
2.2. Interactions à l'échelle colloïdale	34
2.2.1. Interactions attractives	35
2.2.1.1. Interactions de Van der Waals	35
2.2.1.2. Interactions de pontage	35
2.2.1.3. Interactions de déplétion	36
2.2.2. Interactions répulsives	37
2.2.2.1. Répulsion stérique	37
2.2.2.2. Répulsion électrostatique	38
2.3. Dispersion des nanotubes de carbone en solution	39
2.3.1. Fonctionnalisations covalentes	39
2.3.2. Fonctionnalisations non-covalente	40
2.3.2.1. Fonctionnalisation par les polymères	40
2.3.2.2. Fonctionnalisation par les tensioactifs	41
2.4. Conclusion	44
3. LIQUIDES IONIQUES	45



3.1. Introduction	45
3.2. Historique	45
3.3. Structure des liquides ioniques	46
3.4. Propriétés physico-chimiques des liquides ioniques	47
3.5. Applications des liquides ioniques	48
3.6. Synthèses des liquides ioniques à base d'imidazolium	49
3.6.1. Synthèses de 2 –imidazoline.	49
3.6.2. Synthèses de sels d'imidazolium	52
3.7. Application des liquides ioniques à base d'imidazolium	52
3.8. Toxicité des liquides ioniques à base d'imidazolium	53
3.9. Etat de l'art sur la dispersion des NTCs par les LI à base d'imidazolium	54
3.10. Conclusion	55
4. MATERIELS ET METHODES	56
4.1. Introduction	56
4.2. Matériels	57
4.3. Méthode de synthèse et caractérisation des liquides ioniques	57
4.3.1. Synthèse des liquides ioniques	57
4.3.2. Caractérisation des liquides ioniques	60
4.4. Méthode de mise en suspension des nanotubes de carbone	61
4.4.1. Extraction et filtration des nanotubes de carbone	61
4.4.2. Dispersion des nanotubes de carbone	61
4.5. Méthode de caractérisation des dispersions de nanotubes de carbone	62

4.6. Méthode de l'étude de toxicité orale aiguë du liquide ionique	63
4.6.1. Description de la méthode	65
4.6.1.1. Choix de l'espèce animale	65
4.6.1.2. Conditions d'hébergement et d'alimentation	65
4.6.1.3. Préparation des animaux	65
4.6.1.4. Préparation des doses	66
4.6.2. Mode opératoire	66
4.6.2.1. Administration des doses	66
4.6.2.2. Nombre d'animaux et niveaux des doses	66
4.6.3. Observations	68
4.6.3.1. Poids corporel	68
4.6.3.2. Pathologie	68
4.7. Méthode de l'étude de d'écotoxicité des DWCNTs	69
4.7.1. Principe de la méthode	69
4.7.2. Mécanisme de la bioluminescence de la bactérie	70
4.7.3. Mode opératoire	70
4.7.3.1. Préparation de la suspension cellulaire	70
4.7.3.2. Préparation des dilutions	71
5. RESULTATS ET DISCUSSION	73
5.1. Introduction	73
5.2. Synthèse et caractérisation des liquides ioniques	73
5.2.1. Synthèse des liquides ioniques	73

5.2.2. Caractérisation des produits de synthèse par méthodes physico-chimiques	75
5.2.2.1. Détermination du point de fusion	75
5.2.2.2. Détermination de la CMC	76
5.2.2.3. Mesure de viscosité	77
5.2.3. Caractérisation des produits de synthèse par méthodes spectrophotométriques	78
5.2.3.1. Les analyses FT-IR	78
5.2.3.2. Les analyses GCSM	79
5.2.3.3. Les analyses RMN	81
5.3. Dispersion des nanotubes de carbone	84
5.4. Caractérisation des dispersions de nanotubes de carbone	85
5.4.1. Les analyses UV/Vis	85
5.4.2. Les analyses par Zétamétrie	89
5.4.3. Les analyses de granulométrie	89
5.4.4. Les analyses par rhéomètre	90
5.4.5. Microscope électronique à transmission	91
5.5. Etude de toxicité orale aiguë du liquide ionique	92
5.5.1. Conditions d'essai	92
5.5.2. Résultats	93
5.5.3. Discussions	95
5.6. Etude d'écotoxicité des DWCNTs	96
5.6.1. Conditions d'essai	96

5.6.2. Résultats et discussions	96
CONCLUSION	98
APPENDICE	
A. Liste des abréviations	100
B. Liste des produits chimiques	102
C. Etude comparative des méthodes de la toxicité orale aiguë	103
D. Protocole de l'étude de toxicité in vivo	104
REFERENCES	106

## LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

Figure 1.1. Enroulement d'un feuillet de graphène donnant un SWCNT.	22
Figure 1.2. Représentation schématique de la structure d'un nanotube de carbone, mono-paroi, multi-parois et double-parois.	23
Figure 1.3. Schéma des nanotubes à hélicités différentes. Armchair, zigzag et chiral.	25
Figure 2.1. Représentation schématique du phénomène de pontage à faible concentration et à forte concentration.	36
Figure 2.2. Représentation schématique de petites particules en solution avec grosses particules.	37
Figure 2.3. Représentation schématique de deux particules sphériques de rayon $r$ , séparées d'une distance $D$ .	38
Figure 2.4. Schéma de deux particules colloïdales chargées positivement dans une solution ionique.	39
Figure 2.5. Enroulements de chaînes de polymère sur un SWCNT.	41
Figure 2.6. Représentations schématiques du mécanisme d'adsorption des tensioactifs à la surface des nanotubes de carbone.	43
Figure 3.1. Structure des principaux cations retrouvés dans la composition des liquides ioniques.	46
Figure 3.2. Exemples d'applications des liquides ioniques	48
Figure 3.3. Synthèse de 2-méthyl-2-imidazoline.	49
Figure 3.4. Réaction de synthèse de 2-imidazoline à partir des nitriles.	49
Figure 3.5. Synthèse de 2-imidazoline à partir des aldéhydes.	50
Figure 3.6. Réaction de synthèse de 2-imidazoline à partir des acides carboxyliques.	50
Figure 3.7. Réaction de synthèse de 2-imidazoline en utilisant les esters.	51

Figure 3.8. Réaction de synthèse de 2-imidazoline à partir de chlorure d'acétyle	51
Figure 3.9: Réaction de synthèse de 2-imidazoline à partir de triglycéride.	51
Figure 3.10. Réaction de synthèse de 2-imidazoline à partir d'acide gras.	52
Figure 4.1. schéma général des réactions de synthèse du liquide ionique.	58
Figure 4.2. schéma de la deuxième voie des réactions de synthèse du liquide ionique.	58
Figure 4.3. Mode opératoire à suivre pour la dose initiale égale 300mg/kg	67
Figure 4.4. Mode opératoire à suivre pour l'essai de la bioluminescence.	72
Figure 5.1. Mécanisme réactionnel de la synthèse de dérivé chloré d'acide gras.	74
Figure 5.2. Mécanisme réactionnel de la synthèse de 2-alkyl-imidazoline.	74
Figure 5.3. Mécanisme réactionnel de synthèse de sel imidazolinium.	75
Figure 5.4. Variation de conductivité en fonction de la concentration des trois tensioactifs.	76
Figure 5.5. Variation de la viscosité en fonction du taux de cisaillement pour les trois liquides ioniques.	77
Figure 5.6. Spectres IR de [M-E-C <sub>15</sub> -Im] I et [M-E-C <sub>17</sub> -Im] I synthétisés par la première méthode	78
Figure 5.7. Spectres IR de [M-E-C <sub>13</sub> -Im] I, [M-E-C <sub>15</sub> -Im] I et [M-E-C <sub>17</sub> -Im] I synthétisés par la deuxième méthode.	79
Figure 5.8. Spectres de masse de [M-E-C <sub>13</sub> -Im] I, [M-E-C <sub>15</sub> -Im] I synthétisés par la première méthode, comparés au spectre de référence de la bibliothèque.	80
Figure 5.9. Spectres de masse de [M-E-C <sub>13</sub> -Im] I, [M-E-C <sub>15</sub> -Im] I et [M-E-C <sub>17</sub> -Im] I synthétisés par la deuxième méthode, comparés au spectre de référence de la bibliothèque.	80
Figure 5.10. Spectres RMN <sup>1</sup> H de [M-E-C <sub>13</sub> -Im] I, [M-E-C <sub>15</sub> -Im] I et [M-E-C <sub>17</sub> -Im] I	82

Figure 5.11. Spectres RMN <sup>13</sup> C de [M-E-C <sub>13</sub> -Im] I, [M-E-C <sub>15</sub> -Im] I et [M-E-C <sub>17</sub> -Im] I.	83
Figure 5.12. Illustrations de la sédimentation de la dispersion des DWCNTs à C= 50mg/ml par les liquides ioniques [M-E-C <sub>17</sub> -Im] I, [M-E-C <sub>15</sub> - Im] I et [M-E-C <sub>13</sub> -Im] I à C= 1 mM.	84
Figure 5.13. Illustrations de la sédimentation de la dispersion des DWCNTs à C= 50mg/ml par les liquides ioniques [M-E-C <sub>17</sub> -Im] I, [M-E-C <sub>15</sub> -Im] I et [M-E-C <sub>13</sub> -Im] I à C= 1,5 mM.	84
Figure 5.14. Illustrations de la sédimentation de la dispersion des DWCNTs à C=50mg/ml par les liquides ioniques à C= 10 mM.	85
Figure 5.15. Spectres UV/Vis des suspensions de DWCNTs avec les liquides ioniques et avec l'eau.	86
Figure 5.16. Cinétique d'absorbance UV/Vis des suspensions de DWCNTs avec les liquides ioniques C= 10mM, C= 1,5mM et C= 1mM.	88
Figure 5.17. Granulométrie des suspensions de DWCNTs à 50mg/l avec les trois liquides ioniques à la concentration égale à 1mM.	90
Figure 5.18. Images MET des suspensions de DWCNTs à 50 mg/l avec les liquides ioniques à 1 mM (a) [M-E-C <sub>13</sub> -Im] I, (b) [M-E-C <sub>15</sub> - Im] I, (c)[M-E-C <sub>17</sub> -Im] I et (d) avec l'eau désionisée.	91
Figure.5.19. Images MET des suspensions de DWCNTs à 50 mg/l avec les liquides ioniques à 1 mM et avec l'eau désionisée.	92
Figure 5.20. Variation du poids corporel des souris.	95
Figure 5.21. Variation du pourcentage d'inhibition de la bioluminescence en fonction de Log de la dilution de DWCNTs, du liquide ionique et de la suspension de DWCNTs avec le liquide ionique.	97

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1. Catégories de danger de toxicité aiguë et des valeurs d'estimation de toxicité aiguë définissant les catégories respectives	63
Tableau 4.2 : Constitution de la solution tampon PBS-1-G.	70
Tableau 4.3. Constitution du milieu de culture.	71
Tableau 4.4. Constitution de la solution dilution Hepes	71
Tableau 5.1. Points de fusions des trois tensioactifs.	75
Tableau 5.2. Concentration micellaire critique des trois tensioactifs.	77
Tableau 5.3. Potentiel Zeta des suspensions de DWCNTs avec les liquides ioniques (1mM).	89
Tableau 5.4. Poids corporel des souris et les changements du poids de chaque étape.	94



## INTRODUCTION GENERALE

Les deux dernières décennies ont été marquées par le développement des nanosciences et des nanotechnologies. La base de cette évolution repose sur un constat: les propriétés des matériaux à l'échelle nanométrique sont fondamentalement différentes de celles observées aux échelles supérieures. Mais qu'entend-on exactement par nanotechnologies ?

La définition évolue et reste sujette à débat. En effet, s'il était communément admis que l'on peut parler de nanotechnologies lorsque l'on manipule des matériaux de moins de 100 nm, cette définition est à présent obsolète. Il est désormais plus courant de considérer les nano-objets lorsqu'au moins une de leurs dimensions est de l'ordre du nanomètre. Les nanotubes de carbone (NTCs), parmi ces nouveaux matériaux, ont attiré beaucoup d'attention au sein de la communauté scientifique ces dernières années. Depuis leur mise en évidence en 1991 par Iijima [1], les nanotubes de carbone apparaissent comme la charge nanométrique optimale qui possède à la fois de bonnes propriétés mécaniques, électriques et thermiques, en particulier une conductivité électrique supérieure à celle du cuivre et une conductivité thermique supérieure à celle du diamant. Les nanotubes de carbone peuvent être définis comme un cylindre de diamètre nanométrique formé d'hexagones d'atomes de carbone et fermé aux deux extrémités par l'insertion de plusieurs pentagones.

Du fait de leurs propriétés intrinsèques, un très vaste champ d'applications s'ouvre à ces nanomatériaux, comme l'électronique, la biologie et les matériaux composites. Même si les nanotubes de carbone ont des applications prometteuses, leur insolubilité dans la majorité des solvants organiques et aqueux pose un véritable problème, plusieurs études se sont intéressées à résoudre ce problème, par des méthodes de fonctionnalisation covalente [2-4] ou par adsorption d'agents amphiphiles [5-9]. La fonctionnalisation covalente en utilisant des acides à haute température cause des défauts sur les parois des nanotubes de carbone et diminue leurs longueurs, donc leurs propriétés électriques et mécaniques sont fortement modifiées [10, 11]. Par contre la fonctionnalisation non-covalente par adsorption de tensioactifs ou de polymères moyennant des traitements par ultrasons, centrifugation et filtrage ne perturbe pas la conjugaison  $\pi$ - $\pi$  ni les longueurs des NTCs. Ainsi, les propriétés intrinsèques des NTCs sont conservées [12-14].

D'une part, plusieurs tensioactifs de différentes classes chimiques ont été utilisés pour la mise en suspension des NTCs ; c'est le cas du surfactant anionique SDS (Dodecyl Sulfate de Sodium) [15, 16], du surfactant cationique CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) [17, 18] et du surfactant non ionique Triton X-100 [19] par exemple. Il a été mis en évidence que la nature du tensioactif ainsi que sa concentration jouent un rôle prépondérant dans la dispersion des NTCs dans l'eau et les milieux organiques [20, 21].

D'autre part, les travaux antérieurs ont montré que les liquides ioniques ont un pouvoir dispersant supérieur à celui des tensioactifs classiques [22-25]. Les liquides ioniques sont des sels liquides à température ambiante ou, par extension, dont la température de fusion est inférieure à 100 °C. Ils possèdent une tension de vapeur faible et une grande stabilité thermique, ils sont relativement peu coûteux et faciles à synthétiser. Ils offrent une bonne solvataion dans le milieu dans lequel un certain nombre de solutés organiques ou inorganiques peuvent être dissous. Les liquides ioniques sont en général constitués d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique. Les cations les plus fréquemment rencontrés sont les *N,N*-dialkylimidazoliums, les alkylpyridiniums, les alkylammoniums et les alkylphosphoniums.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail de thèse est la contribution à la mise en suspension des nanotubes de carbone à double paroi (DWCNT) dans le milieu aqueux, en utilisant les liquides ioniques à base d'imidazolium synthétisés à partir de matières naturelles à savoir les acides gras. Au cours de cette étude, la capacité de l'Iodure de 2-alkyl-1-(2-hydroxyéthyl)-1-méthylimidazolium à disperser les DWCNTs a été mise en évidence, ainsi que l'effet de la longueur de la chaîne hydrocarbonée et de la concentration. Pour comparer l'efficacité des trois liquides ioniques, nous avons réalisé une étude de caractérisation par mesures des densités optiques avec un spectrophotomètre UV/Vis, des mesures des potentiels Zêta, des mesures des tailles par granulométrie et des viscosités, ainsi que des observations au microscope électronique à transmission.

Dans un second volet, et dans le but d'applications antérieures des suspensions dans des études d'écotoxicité des nanotubes de carbone, la toxicité orale aiguë du liquide ionique a été évaluée. A cet effet deux méthodes ont été utilisées à savoir par classe de toxicité aiguë (méthode proposé par l'OCDE et par le test d'inhibition de la bioluminescence de la bactérie *Vibrio fischeri*).

Enfin, une contribution aux tests d'études d'écotoxicité des nanotubes de carbone a été réalisée par le test d'inhibition de la bioluminescence de la bactérie *Vibrio-fischeri*.

Ce manuscrit est composé de cinq chapitres :

Dans le premier chapitre, une description des nanotubes de carbone a été réalisée. Après un bref historique, les structures et les propriétés spécifiques contribuant à des avancées technologiques importantes sont abordées. Nous détaillons ensuite les différentes applications des nanotubes de carbone et les techniques disponibles à ce jour pour les produire. Enfin l'état de l'art de l'étude de toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone est présenté.

Le deuxième chapitre est consacré à la présentation de quelques éléments de physico-chimie des colloïdes nécessaires à la compréhension du comportement des nanotubes en suspension, ainsi que l'état de l'art de leurs dispersions dans le milieu aqueux.

Les liquides ioniques ont été décrits dans le troisième chapitre. Après un bref historique, les structures et les propriétés physico-chimiques ainsi que les nombreuses applications seront présentées. Nous nous intéressons par la suite, aux diverses méthodes de synthèse des liquides ioniques à base d'imidazolium. Un intérêt particulier est accordé aux liquides ioniques à base d'imidazolium, ainsi que leur toxicité. Enfin l'état de l'art de la dispersion des NTCs par les liquides ioniques à base d'imdzolium est aussi exposé.

Les techniques expérimentales utilisées en termes de synthèse et de caractérisation ainsi que de la mise en suspension des nanotubes de carbone à double parois (DWCNT) dans le milieu aqueux sont détaillées dans le quatrième chapitre. Aussi, l'étude de la toxicité aigue des liquides ioniques et l'écotoxicité des DWCNTs par le test d'inhibition de la bioluminescence de la bactérie *Vibrio fischeri* sont décrits dans ce chapitre.

Les résultats expérimentaux obtenus lors des différentes étapes expérimentales lors de la synthèse des liquides ioniques, la caractérisation, l'influence des différents paramètres sur la mise en suspension des nanotubes de carbone et les méthodes physico-chimiques sont exposés dans le dernier chapitre. Une discussion et des interprétations ont permis de comparer nos résultats aux travaux déjà réalisés dans ce contexte.

Enfin, cette thèse est achevée par une conclusion générale qui résume les principaux résultats auxquels cette étude a permis d'aboutir et elle met en évidence l'originalité par rapport à l'état d'art, tout en proposant des recommandations et perspectives pour la poursuite et la continuité des travaux.

## **CHAPITRE 1 : NANOTUBES DE CARBONE**

### 1.1. Introduction

Les nanotubes de carbone (NTCs) représentent une nouvelle classe de matériaux possédant d'excellentes propriétés mécaniques, thermiques et électroniques. Grâce à ces propriétés étonnantes et leurs applications potentielles, les recherches qui concernent les NTCs touchent à de nombreux domaines. En particulier, ils sont des matériaux clefs dans la physico-chimie de la matière condensée. Ils suscitent un intérêt considérable dans le monde de la recherche, comme dans celui de l'industrie.

Dans ce chapitre, un bref historique sur les nanotubes de carbone sera présenté. Un intérêt particulier sera consacré à leurs structures, leurs propriétés, leurs applications potentielles et les techniques disponibles à ce jour pour les produire.

### 1.2. Historique

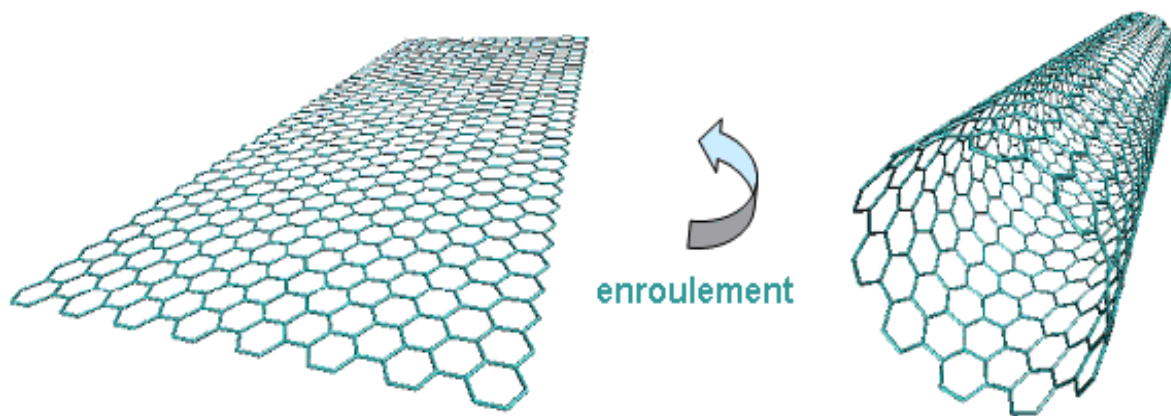
En 1991 Sumio Iijima [1], chercheur Japonais, travaille sur la synthèse des fullerènes. A l'issue d'une expérience par arc électrique dans laquelle il a changé l'alimentation en courant alternatif par du courant continu, Iijima observe en microscopie électronique dans la suie carbonée de longs filaments. Il confirme qu'ils sont constitués de feuillets de graphène enroulés sous forme de tubes, et imbriqués de façon coaxiale les uns dans les autres à l'image des poupées russes. Il les appelle nanotubes, en référence à leur diamètre de quelques nanomètres. Néanmoins, dans les années 1970 [26], les chercheurs commencent à s'intéresser aux différentes molécules présentes au sein des gros nuages de gaz de notre galaxie et c'est dans ces conditions extrêmes, propices au développement d'une multitude de molécules exotiques, qu'ils ont découverts de longues chaînes carbonées.

Ses observations n'ont toutefois pas beaucoup attirés l'attention, notamment pour des raisons techniques puisque les scientifiques ne disposaient pas d'outils expérimentaux permettant l'étude et la manipulation d'objets si petits. En 1993, Iijima et Ichihashi de chez NEC [27] et Bethune et al. de chez IBM [28], rapportent simultanément la première fabrication de nanotubes possédant une seule paroi de carbone : les nanotubes monoparoi (SWCNTs).

Depuis, la recherche sur les nanotubes de carbone n'a cessé de prendre de l'ampleur. D'abord pour leurs propriétés intrinsèques, puis sur les mises en œuvre de ceux-ci, et aujourd'hui sur les applications industrielles que ce soit en physique, chimie ou encore biologie.

### 1.3. Structure

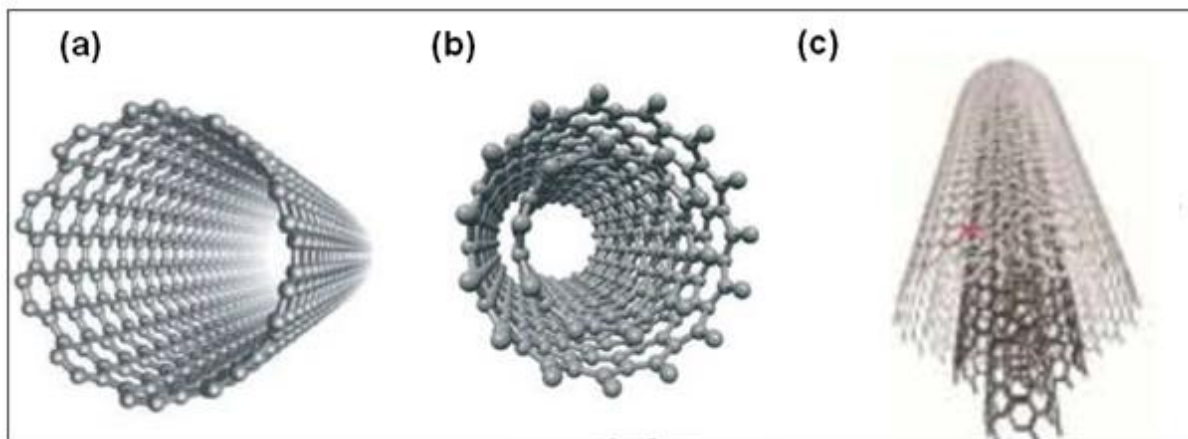
Les nanotubes constituent avec les fullerènes, la troisième forme allotropique du carbone. Le graphite et le diamant en sont les deux premières. Le diamant est constitué d'atomes de carbone répartis selon deux réseaux cubiques à faces centrées interpénétrés, de sorte que les atomes de carbone présentent une hybridation  $sp^3$ , ce qui leur procure des liaisons chimiques avec quatre carbones voisins et donc une extrême solidité. Le graphite est, quant à lui, constitué de plans d'atomes de carbone répartis en réseaux hexagonaux, de sorte que les atomes de carbone présentent cette fois une hybridation  $sp^2$ , c'est-à-dire qu'ils forment une liaison chimique de type  $\sigma$  avec trois atomes de carbone voisins. Ces plans sont également appelés feuillets de graphène et sont faiblement liés entre eux. Un nanotube de carbone peut être décrit comme un feuillet de graphène enroulé sur lui-même, de telle sorte qu'il génère une forme cylindrique et tubulaire (figure 1.1). A l'extrémité, les NTC peuvent ou non être fermés par un demi-fullerène.



**Figure 1.1** : Enroulement d'un feuillet de graphène (à gauche) donnant un SWCNT (à droite).

On peut ainsi distinguer deux types de NTCs : les mono-parois ou single-wall carbon nanotubes (SWCNTs) et les multi-parois ou multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs). Les SWCNTs ne possédant qu'un seul feuillet de graphène enroulé sur lui-même (figure 1.2.a), ils ont un diamètre généralement compris entre 0.7 et 10 nm [29], bien que la plupart des nanotubes monoparoi observés aient un diamètre inférieur à 2 nm et une longueur de l'ordre du micron. Si l'on se focalise sur leur très grand facteur de forme, c'est-à-dire le rapport entre leur longueur et leur diamètre qui peut être aussi grand que  $10^3$  à  $10^5$ , ces nanotubes peuvent être considérés comme des structures unidimensionnelles. Les SWCNTs, après synthèse, ne sont pas sous forme individualisée mais sont sous forme de faisceaux ou « bundles », c'est-à-dire un assemblage de quelques jusqu'à cent SWCNTs alignés selon un réseau hexagonal. La densité des NTCs varie en fonction de leur diamètre, pour les SWCNTs, elle est comprise entre  $0.4\text{--}4.40\text{ g.cm}^{-3}$  [30]. Un tiers entre eux ont un comportement métallique et les deux tiers de type semi-conducteur.

Les MWCNTs possèdent un empilement coaxial de feuillets de graphène (figure 1.2.b). Ils présentent un diamètre variant de quelques nanomètres à quelques centaines de nanomètres selon les conditions de synthèse. Le diamètre interne est de l'ordre de quelques nanomètres et la distance séparant les parois entre elles, correspond environ à la distance entre deux plans de graphène dans le graphite, qui est de  $3.4\text{ \AA}$  [1]. Ils ont une densité qui varie entre  $0.6$  et  $2.9\text{ g.cm}^{-3}$  [30]. Ces nanotubes ont un caractère plus métallique et leur utilisation est recherchée lors de la fabrication de nano-composites conducteurs.



**Figure 1.2 :** Représentation schématique de la structure d'un nanotube de carbone, (a) mono-paroi, (b) double-parois et (c) multi-parois.

Il existe également une grande variété de morphologies de MWCNT parmi lesquelles les nanotubes double-parois (Double-Walled carbon nanotubes : DWCNTs). Ce type de nanotubes est caractérisé par de petits diamètres extérieurs (1,1– 6,7 nm) [31] et par le fait que, n'ayant que deux parois (figure 1.2.c), ils ont des propriétés proches de celles des SWCNTs. En particulier, l'enroulement joue un rôle important et, comme les SWCNTs, ce type de nanotube peut avoir un comportement semi-conducteur ou métallique, avec une forte proportion de nanotubes métalliques.

Les nanotubes sont des particules dont les caractéristiques géométriques fortement anisotropes (diamètre de taille moléculaire) sont couplées à des propriétés physiques très intéressantes pour de nombreuses applications.

#### 1.4. Propriétés

Depuis leur découverte, les nanotubes de carbone ont attiré l'attention de la communauté scientifique et de nombreuses recherches ont été, et sont encore menées afin de mieux identifier leurs structures et appréhender leurs caractéristiques intrinsèques. Les résultats obtenus jusqu'à ce jour sont particulièrement intéressants et les nanotubes présentent des propriétés remarquables qu'elles soient mécaniques, électroniques ou thermiques, et souvent différentes de celles du graphite.



#### 1.4.1. Propriétés mécaniques

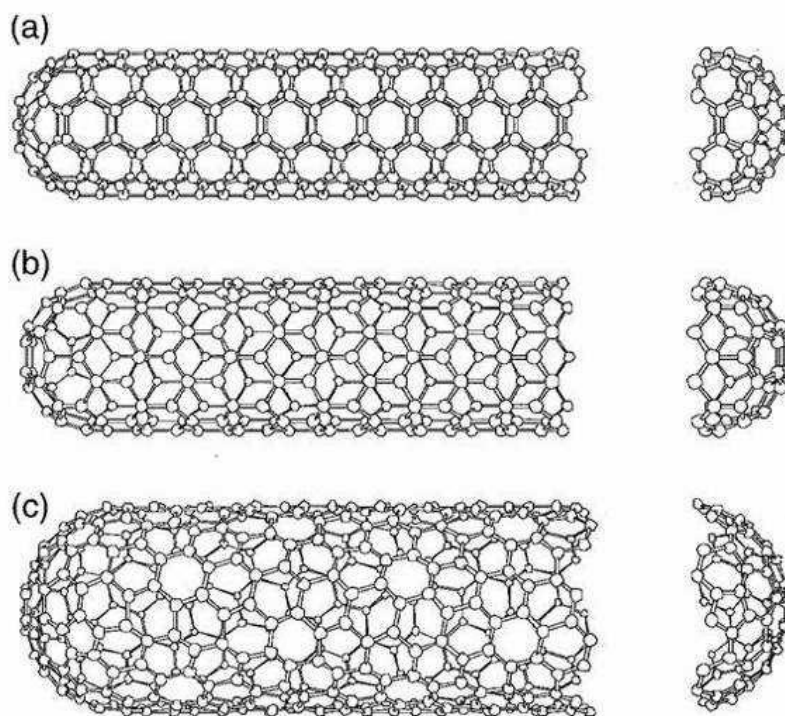
Etant donné que la liaison C-C est une très forte liaison covalente, les nanotubes sont souvent considérés comme des fibres au potentiel exceptionnel, notamment en regard de leurs propriétés axiales [32]. Pour pouvoir exploiter les nanotubes dans des applications, il est nécessaire d'étudier leurs différents comportements mécaniques tels que les réponses élastiques et inélastiques ou leurs résistances à la rupture.

Il existe de nombreux calculs théoriques pour le module d'élasticité (ou module d'Young) dont les valeurs s'échelonnent de 600 à 5500 GPa, selon le modèle utilisé [29, 33, 34]. Le comportement élastique a été étudié par Treacy en analysant l'amplitude des vibrations intrinsèques d'un nanotube dans un microscope électronique à transmission. Les résultats montrent que le module de Young est de l'ordre de 1,05 TPa [35]. De plus, il est à noter que la résistance à la traction pour les deux types de nanotubes est de l'ordre de 150 GPa [36, 37], largement plus élevée que celle d'autres matériaux « classiques » tels que les fibres de carbone, l'acier, le bois ou les résines époxydes. Les nanotubes possèdent en outre une faible densité, 6 fois plus faible que celle de l'acier, environ  $1,4\text{g/cm}^3$  ainsi qu'une grande résistance à la flexion [38, 39]. La contrainte à la rupture des nanotubes, c'est-à-dire la force (par unité de surface) nécessaire pour induire leur rupture, est comprise entre 30 et 50 GPa [36, 40]. Ces caractéristiques font des nanotubes parmi les matériaux solides qui existent actuellement.

#### 1.4.2. Propriétés électriques

Les propriétés de conduction des nanotubes diffèrent selon leur hélicité et leur diamètre [41]. Toutefois, il n'existe pas seulement une façon d'enrouler un feuillet de graphène, les nanotubes présentent en général différentes conformations à l'issue de la synthèse. On peut ainsi dans un premier temps distinguer deux types : les nanotubes chiraux et achiraux. Un nanotube de carbone achiral est défini par une structure dont l'image miroir est identique à l'original. Il n'existe que deux cas de nanotubes achiraux : les nanotubes armchair (configuration chaise) et les nanotubes zigzag, représentés respectivement aux figures 1.3 a et b.

Les nanotubes chiraux présentent une hélicité dont l'image miroir ne peut être superposée au nanotube original, comme représenté à la figure 1.3 c. Il existe de nombreux types de nanotubes chiraux, qui sont définis selon l'enroulement du feuillet de graphène.



**Figure 1.3** : Schéma des nanotubes à hélicité différentes. (a) armchair, (b) zigzag et (c) chiral.

Des calculs théoriques montrent ainsi que les SWCNTs de type armchair sont exclusivement métalliques, alors que les nanotubes chiraux ou ceux de type zigzag peuvent être métalliques ou semi-conducteurs selon le mode d'enroulement du feuillet de graphène [42]. Les MWCNTs, quant à eux, sont très majoritairement métalliques [43].

Les nanotubes de carbone ont une conductivité électrique qui peut aller de  $1,5 \cdot 10^4$  à  $2 \cdot 10^7$  S.m<sup>-1</sup> [44], ce qui en fait d'excellents candidats pour les applications électroniques.

Comme pour les propriétés mécaniques, la présence de défauts structuraux ou d'impuretés peuvent altérer le comportement électronique des nanotubes [45].

### 1.4.3. Propriétés thermiques

Une autre caractéristique importante à considérer en vue de l'utilisation des CNTs est leur conductivité thermique. Les nanotubes ont une conductivité thermique très élevée le long de l'axe et comparable à celle du graphite [46-48]. Les mesures sur des nanotubes multi parois individuels montrent des valeurs de 3000 W/m K [49], alors qu'en théorie, on prédit une valeur plus haute pour SWCNTs (6600 W/m K) [46]. Comme pour les propriétés mécaniques et électriques, ces valeurs théoriques ne correspondent probablement pas à la réalité à cause des défauts structuraux et des impuretés [48].

## 1.5. Applications des nanotubes de carbone

En raison des nombreuses propriétés citées ci-dessus, il est évident que les nanotubes de carbone représentent une famille de matériaux qui trouvent de nombreuses applications dans différents domaines.

### 1.5.1. Electronique

La combinaison de la taille, de la légèreté et des propriétés électriques des nanotubes de carbone, a incité la communauté scientifique à s'investir massivement afin de découvrir les applications des NTCs dans le domaine de l'électronique.

La propriété remarquable des NTCs de supporter de forts courants a été exploitée par Seidel et al. [50], qui à leur tour ont réussi moyennant des SWCNTs alignés à fabriquer des transistors de contrôle des dispositifs macroscopiques, par exemple, des diodes électroluminescentes et des moteurs électriques. Parmi les autres applications dans l'électronique où les nanotubes, principalement les SWCNT sont utilisés dans la fabrication de batteries rechargeables pour l'électronique portable (téléphones, ordinateurs) [51].

Une autre propriété intéressante a retenu l'attention de la communauté scientifique, elle concerne l'utilisation des NTCs comme sources émettrices par effet de champ [52]. A cause de leur structure nanométrique, leur forte conductivité électrique, leur stabilité chimique, les NTCs sont de bons candidats pour remplacer les matériaux actuels dans la fabrication de canons à électrons dans différentes applications, source de lumière pour écrans plat, source de rayons X, les microscopes électroniques, etc.

Actuellement, ces nombreuses applications prometteuses se heurtent à un grand défi technologique, concernant la maîtrise de fabrication de structures bien définies des NTCs ainsi que leur manipulation pour la création des circuits complexes.

#### 1.5.2. Chimie

Les NTCs avec leurs propriétés remarquables offrent actuellement un grand potentiel de développement dans plusieurs domaines liés à la chimie. Parmi ces domaines on peut citer les capteurs de gaz, la catalyse, la dépollution,...

Une nouvelle méthode pour la détection du monoxyde d'azote (NO) permettant le contrôle de l'asthme consiste en des mesures de conductivité en utilisant un transistor à effet de champ à base de SWCNTs [53]. Un autre domaine où les NTCs montrent des potentialités très intéressantes en comparaison avec les matériaux utilisés à ce jour est la catalyse. Les NTCs semblent être d'excellents supports de catalyseurs. De nombreux exemples de leurs utilisations en catalyse existent dans la littérature et mettent en évidence les avantages de ces matériaux, fonctionnalisés ou non, en termes d'activité et de sélectivité [54-56].

#### 1.5.3. Biomédical

Plusieurs applications pourraient prendre d'avantage d'importance dans le futur et touchent à la médecine et aux biotechnologies, où les nanotubes de carbone pourraient être utilisés en tant que prothèses, ou vecteurs de médicament [57].

Au niveau thérapeutique, Raffa et al. ont confirmé a travers des expériences in vitro, que la combinaison MWCNTs et champ électromagnétique favorise considérablement l'absorption intracellulaire du médicament [58]. Pantarotto et al. ont montré que des SWCNTs fonctionnalisés sont capables de traverser la membrane d'un fibroblaste et de s'accumuler dans le cytoplasme sans induire de cytotoxicité. Ces résultats laissent envisager l'utilisation de ces particules comme vecteur de médicament [59]. Les DWCNTs oxydés sont conçus de manière qu'ils peuvent être utilisé comme des nano-vecteurs pour la livraison de fragments thérapeutiques [60]. Bédrier et al. démontrent qu'une mince couches de DWCNTs peuvent servir pour l'interfaçage des neurones [61]. Tlili et al. ont fonctionnalisé les SWCNTs avec des anticorps anti-alpha-amylase salivaire pour la réalisation d'un immunocapteur. Cette technologie des nano-immunocapteurs présente des applications potentielles dans le diagnostic clinique des biomarqueurs de stress exprimées dans la salive humaine [62]. Lors des maladies auto-immunes, des NTCs interagissant avec des protéines spécifiques, permettraient la reconnaissance d'anticorps exprimés lors de ces maladies et d'en permettre le diagnostic [63]. Lors de leurs travaux, Kam et al. ont fonctionnalisé les SWCNTs avec une protéine spécifique des récepteurs aux folates présents au niveau des cellules cancéreuses. Ils ont montré que des SWCNTs ainsi fonctionnalisés se retrouvent dans le cytoplasme des cellules cancéreuses. Ainsi, et grâce à la capacité des SWCNTs à absorber la lumière dans le proche infrarouge, les cellules cancéreuses peuvent être détruites [64]. Fiorito et al. ont constaté que l'activité redox des DWCNTs inhibent la prolifération des cellules cancéreuses [65]. Cependant, ce domaine reste délicat car la toxicité des nanotubes et leur impact sur le corps humain, reste encore en phase d'étude.

#### 1.6. Synthèse des nanotubes de carbone

Depuis leur découverte en 1991, différentes techniques de synthèse ont été proposées, et à ce jour deux grandes familles de procédés restent d'actualité : les méthodes physiques à hautes températures et les méthodes chimiques à des températures plus basses.

### 1.6.1. La méthode physique

Ce procédé consiste à sublimer du graphite à l'aide d'un arc électrique [1], ou d'un faisceau laser [66, 67], sous atmosphère protectrice. Les atomes de carbone qui constituent les feuillets des NTCs proviennent de l'évaporation d'une cible de graphite. Le carbone en phase vapeur peut alors dans certaines conditions se condenser sous forme de nanotubes dans des zones de plus basses températures.

Cette méthode présente l'avantage de produire des NTCs de haute qualité structurale, mais présente l'inconvénient de ne pas permettre un contrôle des caractéristiques des NTCs (diamètre, longueur) et avec un faible rendement. Les échantillons préparés par arc électrique contiennent de nombreuses impuretés, souvent difficile à éliminer.

### 1.6.2. La méthode chimique

Pour la méthode de synthèse par décomposition chimique en phase vapeur (CCVD, Catalytic Chemical Vapor Deposition), une source de carbone gazeux (hydrocarbure, CO) est décomposée par voie catalytique (Ni, Fe, Co) [68, 69]. Ce procédé permet une synthèse en continu par l'apport d'une source de carbone sous forme de gaz. En adaptant les catalyseurs, il est également possible de contrôler le nombre de parois et d'obtenir des nanotubes doubles parois [70]. Elle reste la méthode la plus utilisée actuellement car elle présente un meilleur rendement avec un meilleur contrôle des caractéristiques [71]. Cependant, les NTCs produits par cette méthode présentent plus de défauts structuraux que ceux produits par les méthodes physiques car ils sont produit à plus basse température (entre 450°C et 1000°C en fonction du procédé).

## 1.7. Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone

Une propriété qui doit être impérativement étudiée dans le détail : avant toute commercialisation des NTCs, il convient de s'interroger sur l'introduction de ces nouveaux matériaux en termes d'effets potentiels sur la santé et l'environnement. Le plus grand danger des nanotubes de carbone est sans doute lié à leur facteur de forme élevé (fibres) et à leur non-biodégradabilité (persistance dans l'organisme), en particulier par voie respiratoire [72].

### 1.7.1. Toxicité des nanotubes de carbone

Les voies classiques de pénétration d'un toxique dans l'organisme (cutanée, orale, respiratoire et parentérale) s'appliquent aux NTCs. L'influence des nanotubes de carbone sur l'épiderme in vitro a été étudiée : des cellules de l'épiderme humain ont été exposées à des MWCNTs non traités à une concentration de 0,1 à 0,4mg/ml pour une période variant entre 1 et 48 heures. A l'aide de la microscopie électronique à transmission, des traces de MWCNTs ont été retrouvées dans les vacuoles cytoplasmiques et de fortes irritations ont été observées [73]. Les effets des SWCNTs ont été évalués par des tests in vitro et in vivo (cellules épidermiques des murins et le système immunitaire des souris). Les résultats des tests indiquent que l'exposition aux SWCNTs non purifiés génèrent une réaction inflammatoire, causant ainsi une toxicité cutanée [74]. En revanche, les études in vitro et in vivo sur l'irritation oculaire et cutanée (chez le lapin) par les SWCNTs et les MWCNTs, ont révélé une rougeur réversible de la conjonctive et aucune irritation de la peau [75, 76].

Wang et al. ont montré l'accumulation des SWCNTs dans la majorité des organes et tissus, à l'exception du cerveau, après 3 heures d'administration par gavage (de 100 µL d'une solution à 15 µg/ml) aux souris [77], le suivi de la radioactivité de MWCNTs administrés, a montré que les NTCs sont acheminés rapidement vers l'intestin grêle. Ensuite, la radioactivité a diminuée dans l'intestin grêle et a augmenté dans le gros intestin et les selles. Aucun passage dans la circulation sanguine n'a été observé. Environ 74% de la dose exposée directement a été excrétée dans les excréments après 12 heures d'exposition [78].

Les études de cytotoxicités des DWCNTs (0,5 à 50 µg/ml) sur les cellules épithéliales nasales humaines normales ont montré, après une exposition de 12 jours, les DWCNTs semblent avoir un effet délétère sur les cellules nasales [79]. En plus, une exposition chronique aux NTCs peut entraîner la séquestration des protéines contenues dans le surfactant pulmonaire [80]. Les résultats de l'étude histopathologique des poumons ont indiqué que l'exposition pulmonaire aux SWCNTs (5 mg/kg) ont produit des réponses inflammatoires [72]. Les MWCNTs ont été présents dans les poumons des rats après 60 jours dévoilent une réaction inflammatoire [81].

Les souris instillées par voie intra nasale avec les DWCNTs (1,5 mg/kg), six heures après l'administration, l'examen des poumons et l'élévation de cytokines pro-inflammatoires dans le plasma ont confirmé l'induction d'une réaction inflammatoire. Cette réaction inflammatoire est accompagnée par une diminution du stress oxydatif local [82]. L'étude in vivo (souris) des MWCNTs radio-marqués  $^{14}\text{C}$  a montré qu'après un an de l'administration, les MWCNTs sont éliminées des poumons mais leur accumulation a été rencontrée dans plusieurs organes, y compris la pulpe blanche de la rate et la moelle osseuse [83].

Des injections intraveineuses répétées de MWCNTs sur des souris mâles peuvent causer des dommages réversibles sur les testicules sans affecter la fertilité[84].

La cytotoxicité de différents échantillons de NTCs a été étudiée envers les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine. Aucune cytotoxicité n'a été trouvée pour n'importe quel échantillon [85]. Ainsi, les tests de viabilité cellulaires ont montré aucune cytotoxicité des DWCNTs fonctionnalisés aux concentrations nécessaires pour la livraison optimale des gènes [86]. Neves et al. ont étudié l'absorption et la libération de DWCNTs par les cellules de mammifères (in vitro). Il est démontré que sous les conditions l'expérimentales, les DWCNTs sont absorbés par les cellules en culture, mais ils sont ensuite libéré après 24 heures sans stress perceptible [87]. En outre, exocytose des NTCs a été une nouvelle fois confirmé [88].

Cependant, il a été démontré que les deux types de NTCs (SWCNT et DWCNT) activent le complément du sérum humain par la voie classique, alors que les DWCNTs activent la voie alternative mais les SWCNTs n'activent pas cette voie [89]. Les tests in vitro par les Monocytes humain des DWCNTs, ont présenté que ces nanotubes représentent un danger pour la santé en raison de leur capacité à activer NLRP3 inflammasome, ressemblant à la l'inflammation causées par l'amiante [90].



### 1.7.2. Ecotoxicité des nanotubes de carbone

A ce jour, peu d'études relevant réellement de l'écotoxicologie des nanotubes de carbone sont disponibles, bien que dans les dernières années, il a été étudié leur toxicité sur les bactéries, les crustacés d'eau douce, copépodes marins et poissons. Les résultats de l'étude de toxicité des NTCs (MWCNTs et SWCNTs) sur différentes souches de bactéries gram-négatives et gram-positives, ont montré que les SWCNTs inactivent le plus haut pourcentage de cellules comparés aux MWCNTs [91]. Olivi et al. ont montré que tous les types de NTCs (SWCNT, DWCNT et MWCNT) possèdent une capacité antimicrobienne très significative [92]. L'évaluation de la cytotoxicité des SWCNTs à l'aide de bio-essais avec *Escherichia coli*, a démontré que la viabilité des cellules n'a pas été affectée pour une durée de 48 heures [9]. Les NTCs fonctionnalisés ont été utilisés dans l'étude de viabilité d'*Escherichia coli*. Les résultats ont révélé que les SWCNTs présentent un effet moins important sur la viabilité de la bactérie tandis que les MWCNTs inhibent la viabilité cellulaire [93].

Différents effets des MWCNTs sur la diatomée d'eau douce *Nitzschia palea* ont été examinés. Cette étude démontre que la division cellulaire a été fortement inhibée après une exposition de 48 heures [94]. L'étude de la toxicité aiguë des suspensions de NTCs dans d'eau avec la daphnie, en utilisant l'immobilisation et la mortalité comme effets toxicologiques, a montré que la CE50 et LC50 des MWCNTs sont supérieurs à ceux des SWCNTs [95].

L'évaluation de l'écotoxicité des DWCNTs a été réalisée sur une large gamme de concentrations dans l'eau (de 10 à 500 mg/l), en étudiant la génotoxicité et la mortalité des amphibiens *Xénope Xenopus laevis*. Une mortalité ainsi qu'un retard de croissance ont été mesurés aux fortes concentrations de DWCNTs sans aucune génotoxicité associée [96]. Ainsi, l'inhibition de la croissance des amphibiens *Xénope* exposé à 50 mg/l de MWCNTs été mise en évidence. Cependant, aucune génotoxicité n'a été remarquée [97]. L'inhibition de la croissance était observée à partir de 10 mg/l de DWCNT et 50 mg/l de MWCNTs. Saria et al ont montré que les MWCNTs causent des dommages importants sur l'ADN (amphibiens *Xenopus laevis*) avec une réponse dépendante de la dose [98].

La toxicité aiguë et chronique de SWCNTs ont été évaluées en utilisant des essais biologiques de cycle de vie complet de Copépode estuarien *Amphiascus tenuiremi*. Les résultats montrent une mortalité avec réduction du taux de fertilisation selon les mélanges de NTCs utilisés [99]. L'impact des NTCs sur le milieu aquatique a été étudié en examinant l'effet sur le poisson zèbre *Danio rerio* mettant en évidence un retard à l'éclosion des œufs à partir de 120 µg/ml pour les SWCNTs et 240 µg/ml pour les DWCNTs [100].

La toxicité chronique des DWCNTs a été étudiée avec trois organismes marins (diatomée *Thalassiosira pseudonana*, copépode *Tigriopus japonicus* et médaka *Oryzias melastigma*). Les DWCNTs ont montré une concentration d'inhibition de la croissance (EC50) qui dépend du type de dispersion des DWCNTs (sonication ou agitation) et du type d'organisme marins[101].

#### 1.8. Conclusion

Les nanotubes de carbone sont des matériaux exceptionnels : d'une part pour leurs géométries fortement anisotropes de plusieurs microns de longueur pour un diamètre de quelques nanomètres et d'autre part car ils possèdent des propriétés intéressantes électriques, mécaniques et chimiques hors du commun. Ces caractéristiques offrent aux NTCs des applications prometteuses dans différents domaines. Il n'en reste pas moins que les NTCs nourrissent certaines craintes concernant la santé des personnes qui y sont exposés. Leur insolubilité dans la majorité des solvants organiques et aqueux pose un véritable problème pour pouvoir les étudier.

## **CHAPITRE 2 :**

### **MISE EN SUSPENSION DES NANOTUBES DE CARBONE**

#### **2.1. Introduction**

Les nanotubes de carbone sont connus pour être hydrophobes et très peu solubles dans les solvants organiques. Comme il a été mentionné précédemment, l'étude de la stabilité des nanotubes carbone est une étape cruciale pour l'étude de leur toxicité. De manière générale, pour obtenir de bonnes dispersions stables dans le temps, deux méthodes sont utilisées : la fonctionnalisation chimique des surfaces des nanotubes de carbone ou l'adsorption physique de molécules à caractère amphiphile à leurs surfaces.

Dans cette étude l'intérêt exclusive sera consacré aux dispersions aqueuses préparées par adsorption de molécules à la surface des nanotubes de carbone et application de traitements par ultrasons. L'apport de l'énergie mécanique défait les réseaux enchevêtrés des nanotubes de carbone issus de la synthèse.

Dans ce chapitre quelques éléments de physico-chimie des colloïdes nécessaires à la compréhension du comportement des nanotubes en suspension seront abordés, ainsi que l'état de l'art de leurs dispersions dans le milieu aqueux.

#### **2.2. Interactions à l'échelle colloïdale**

Pour réaliser les dispersions, dans un système colloïdal, il est souvent nécessaire d'induire des interactions répulsives entre les particules. Nous présentons quelques types d'interactions les plus couramment rencontrées dans ces systèmes.

### 2.2.1. Interactions attractives

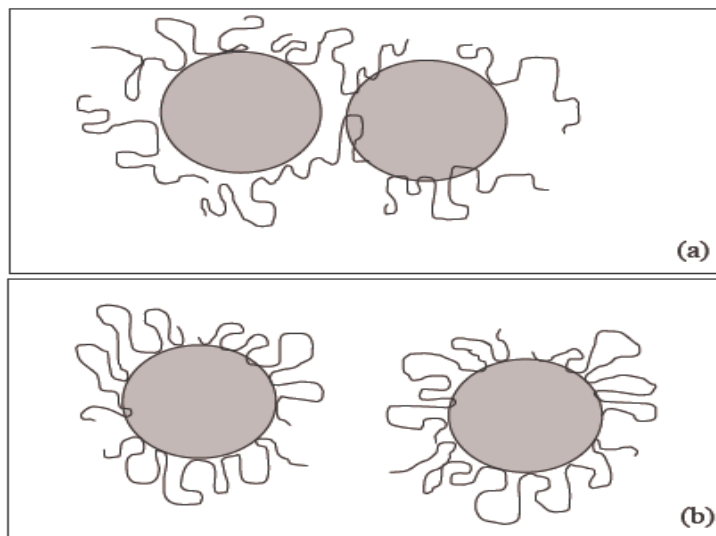
#### 2.2.1.1. Interactions de Van der Waals

La théorie DLVO (Derjaguin et Landau, 1941 [102], Verwey et Overbeek 1948 [103]) décrit le potentiel d'interaction entre deux particules comme la somme des forces de Van der Waals attractives et des forces électrostatiques répulsives. Les forces de Van der Waals sont des interactions dipolaires attractives qui existent quel que soit le système considéré. Pour la plupart des corps, il s'agit principalement d'interactions entre dipôles induits, plus spécialement les forces de London [104].

Il a été démontré que les interactions de Van der Waals qui interagissent entre deux feuillets de graphène sont de l'ordre de 1 MPa [105]. Ces interactions agissent entre deux nanotubes accolés l'un à l'autre ou entre deux parois d'un même nanotube multi-feuillet. En plus, les interactions de Van der Waals peuvent être assez fortes pour maintenir le système dans un état aggloméré. Pour disperser les NTCs, en général il est nécessaire d'apporter de l'énergie par le biais d'une agitation mécanique ou par ultrasons par exemple, puis d'utiliser des stabilisants pour éviter leur agglomération.

#### 2.2.1.2. Interactions de pontage

Les interactions de pontage sont attractives et proviennent de l'adsorption de la longue chaîne de polymère sur plusieurs particules colloïdales à la fois. Ces phénomènes ne sont possibles que pour de faibles concentrations de polymère [104]. A faible concentration en polymère, la longue chaîne va avoir tendance à s'adsorber sur plusieurs particules colloïdales à la fois et induire des interactions attractives entre celles-ci. Lorsque la concentration en polymère augmente, les interactions répulsives de type stériques empêchent les particules d'entrer en contact, ce qui les stabilise dans le solvant (figure 2.1). Ainsi, les interactions de pontage dépendent de la concentration en polymère et de sa masse molaire.

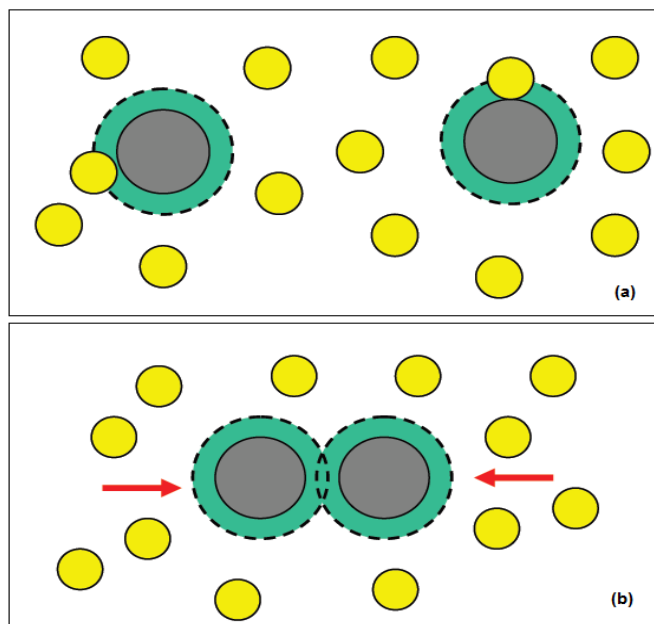


**Figure 2.1** : Représentation schématique du phénomène de pontage (a) à faible concentration et (b) à forte concentration.

#### 2.2.1.3. Interactions de déplétion

Lorsque de petites particules sont mises en présence d'autres plus grosses, elles définissent autour de ces dernières une zone de volume exclu, c'est-à-dire un volume dans lequel leur centre de gravité ne peut pénétrer en raison d'interactions stériques (figure 2.2.a) [106].

Ces petites particules peuvent être solides, mais peuvent aussi être des micelles de tensioactif ou des pelotes de polymère non-adsorbant. Lorsque les grosses particules sont suffisamment éloignées les unes des autres, les petits colloïdes induisent autour de celles-ci une pression osmotique uniforme. Dès lors que les grosses particules sont suffisamment proches pour qu'il y ait recouvrement des zones de volume exclu, les petites particules n'ont plus la possibilité de se glisser entre les gros colloïdes et la pression osmotique s'exerçant sur ces derniers n'est alors plus uniforme. Il apparaît alors une interaction attractive, dite de déplétion, entre les grosses particules (figure 2.2.b) [106].

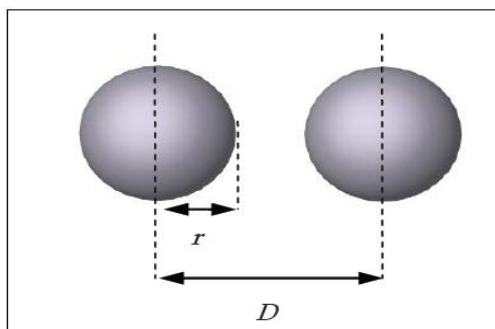


**Figure 2.2 :** Représentation schématique de petites particules en suspension avec de grosses particules. (a) Les petites particules définissent une zone de volume exclu autour des grosses particules. (b) Interaction attractive (flèches rouges) induite entre les grosses particules par le recouvrement des zones de volume exclu.

## 2.2.2. Interactions répulsives

### 2.2.2.1. Répulsion stérique

Il s'agit d'une interaction à très courte portée liée à l'impossibilité qu'ont deux particules de s'interpénétrer. Le potentiel décrivant ce type d'interaction pour des particules sphériques de rayon  $r$  et séparées d'une distance  $D$ , va être infini pour  $D = 2r$  et nul pour  $D > 2r$ . (figure 2.3) [107]. Si des particules sont soumises à des interactions attractives type Van der Waals par exemple, les seules répulsions stériques ne sont pas suffisantes pour stabiliser ces particules en solution car leur portée est beaucoup trop courte. Il est nécessaire d'induire entre les particules des répulsions à plus longue portée pour les stabiliser et contrebalancer les interactions de Van der Waals.



**Figure 2.3 :** Représentation schématique de deux particules sphériques de rayon  $r$ , séparées d'une distance  $D$ .

#### 2.2.2.2. Répulsion électrostatique

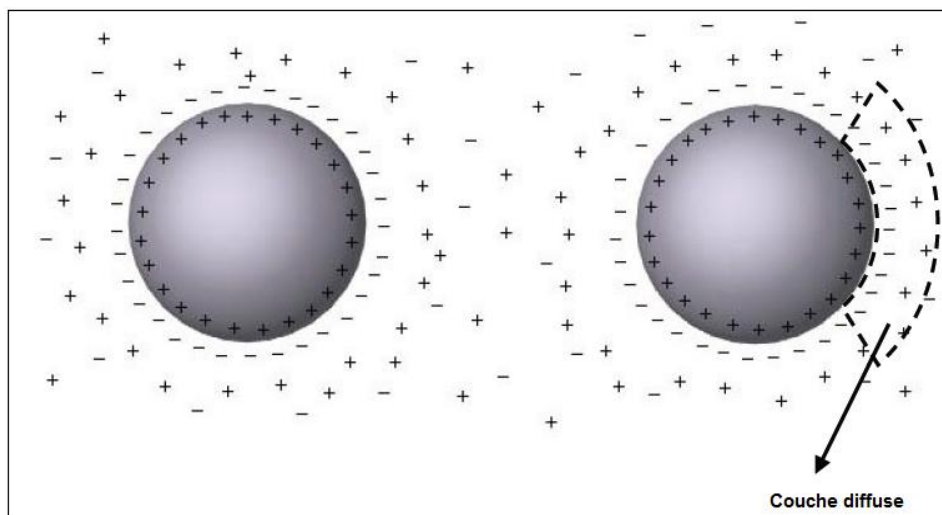
Lorsque des particules colloïdales sont chargées, à cause de l'adsorption de molécules de tensioactif ionique par exemple, la couche de charges adsorbées va induire une certaine distribution des espèces ioniques en solution près de la surface de la particule. Elle est appelée couche diffuse (figure 2.4).

Les interactions entre les particules chargées résultent du recouvrement de leurs couches diffuses lors du rapprochement des surfaces. Pour des particules séparées par une distance  $D$ , et dans le cadre de certaines approximations, le potentiel d'interaction électrostatique s'écrit [107]:

$$W_e = B \exp(-D.K)$$

où  $B$  est un facteur dépendant de la taille, de la géométrie et de la charge des particules et  $\kappa^{-1}$  est la longueur de Debye ; longueur caractéristique décrivant la portée de la répulsion électrostatique.

Le terme « écrantage » est parfois employé pour désigner l'action d'un sel. Plus la concentration en ions est élevée, plus l'écrantage est dit fort car la portée de l'interaction est réduite. Loin de la surface chargée, typiquement quelques longueurs de Debye, le potentiel électrostatique peut être considéré comme négligeable.



**Figure 2.4 :** Schéma de deux particules colloïdales chargées positivement dans une solution ionique.

### 2.3. Dispersion des nanotubes de carbone dans un liquide

Les nanotubes de carbone présentent une structure chimique organisée, ils s'agglomèrent et sédimentent rapidement dans l'eau et la plupart des solvants organiques. Il est nécessaire, pour de nombreuses applications, de disperser les NTCs afin d'exploiter leurs propriétés. Plusieurs voies existent pour disperser les nanotubes de carbone dans des solvants aqueux ou organiques par des méthodes de fonctionnalisations covalentes ou par adsorption d'agents amphiphiles et/ou par agitation magnétique, mais aussi de façon répandue par les ultrasons, sous forme de bain ou de sonde. Les ultrasons à haute puissance délivrés par les sondes fournissent des dispersions métastables de NTCs. Il faut toutefois noter que les ultrasons utilisés pendant une longue durée ou à forte puissance raccourcissent les nanotubes de carbone [108].

#### 2.3.1. Fonctionnalisations covalentes

La fonctionnalisation covalente consiste à greffer chimiquement (via des liaisons covalentes), à la surface des NTCs, des groupements fonctionnels. Ces derniers peuvent leur conférer une plus grande affinité avec le solvant.



Il est possible de moduler les propriétés physico-chimiques des NTCs, en choisissant soigneusement les réactifs de fonctionnalisation chimique covalente, de les rendre solubles dans les solvants organiques et/ou dans les milieux aqueux. Par exemple, la génération de surface hydrophile par des groupements carboxylique, hydroxyle ou acide sulfonique, avec des procédés chimiques appropriés [2, 4]. La fonctionnalisation covalente utilise le plus souvent des acides oxydants à haute température, ce qui peut engendrer des défauts sur les parois des nanotubes de carbone et diminuer leurs longueurs. Par conséquent, leurs propriétés électriques et mécaniques sont modifiées.

### 2.3.2. Fonctionnalisations non-covalente

La fonctionnalisation non-covalente fait intervenir des liaisons non-covalentes entre les NTCs et des molécules amphiphiles. La dispersion des NTCs est basée sur l'adsorption physique de tensioactifs ou de polymères, cette adsorption est liée aux structures chimiques ou physiques de milieux de dispersion [10, 45]. L'avantage de cette fonctionnalisation consiste en la préservation de la structure des NTCs (conjugaison  $\pi$ - $\pi$  non perturbée). Ainsi, les propriétés intrinsèques des NTCs sont conservées.

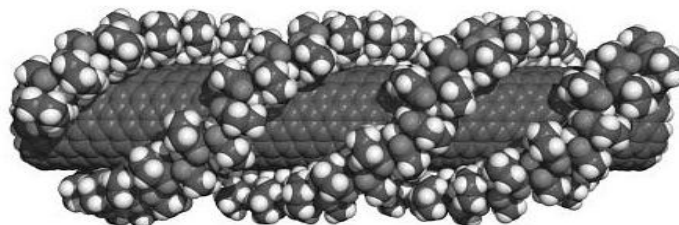
#### 2.3.2.1. Fonctionnalisation par les polymères

Une multitude de polymères ont été étudiés pour stabiliser les dispersions de nanotubes de carbone en milieu aqueux [5, 6]. Les suspensions de MWCNTs dans l'eau ont été préparées par fonctionnalisation non covalente avec un polymère non toxique (la carboxyméthylcellulose ou la gomme arabique) pour des études d'écotoxicité in vivo [109]. Les DWCNTs revêtus de polyéthylèneimine ont été utilisées comme nano vecteur pour la livraison des médicaments[86].

De nombreux polymères peuvent être choisis pour l'enrobage des nanotubes de carbone (Figure 2.5), cependant ces procédés nécessitent généralement l'apport d'une énergie mécanique au système, notamment par les ultrasons.

Pour des applications liées au vivant, d'autres auteurs s'intéressent à la dispersion de NTCs par des biomolécules. Zheng et al. ont montré que l'ADN dénaturé est efficace pour stabiliser les NTCs en milieu aqueux [110]. Sanz et al. ont étudié la fonctionnalisation des différents types de NTCs (SWCNT, DWCNT et MWCNT) par l'ADN plasmatique utilisés pour une éventuelle application biomédicale [111]. Badaire et al. ont confirmé que l'utilisation de ces biomolécules permet d'obtenir des systèmes isotropes ou structures selon la concentration [112].

Par la suite, Lynam et al. ont rapporté la dispersion de SWCNTs par du chitosane ou de l'acide hyaluronique a l'aide d'ondes ultrasonores et permettant la mise en forme de biofibres de carbone aux propriétés mécaniques renforcées [113].



**Figure 2.5** : Enroulements de chaines de polymère sur un SWCNT.

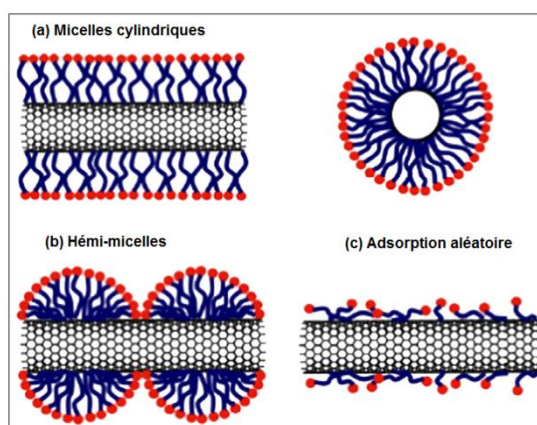
#### 2.3.2.2. Fonctionnalisation par les tensioactifs

De nombreux tensioactifs ont été étudiés pour disperser les nanotubes de carbone. Cependant la nature du tensioactif ainsi que sa concentration jouent un rôle dans la dispersion des NTCs dans le milieu aqueux [20, 21]. Le tensioactif anionique le SDS (sulfate dodécyl de sodium) est le plus utilisé en milieu aqueux [8, 19, 114-117]. Ham et al. ont étudié l'effet de la chaine hydrophobe de différents tensioactifs anioniques et cationiques, pour la mise en suspension des SWCNTs dans l'eau [20]. Utsumi et al. ont montré l'effet de la concentration du tensioactif dodécylbenzène sulfonate de sodium, ils ont proposé un model d'adsorption du tensioactif sur la paroi des SWCNTs [118]. Une étude comparative sur la dispersion des MWCNTs dans l'eau en utilisant le tensioactif non ionique (Triton X-100) et tensioactif anionique (sulfate dodécyl de sodium), a montré que le Triton X-100 a le meilleur pouvoir dispersant [19].

La capacité de dispersion des ultrasons est nettement améliorée par adition de tensioactif (SDS) et d'agent anti-moussant, ce qui augmente la quantité dispersée des NTCs plus de 20 fois [15]. Le Triton X-100 a été utilisé pour préparer les suspensions de SWCNTs lors d'une étude de cytotoxicité [9]. Bai et al. ont montré que l'adsorption d'une série de tensioactifs type Triton X, sur la paroi des NTCs est du type monocouche. En plus, le pouvoir dispersant de ce type de tensioactif augmente avec la diminution de la chaîne hydrophile [119]. Des suspensions de MWCNTs dans des solutions aqueuses de deux tensioactifs anioniques (SDS et SDBS) ont été étudiées. Les études ont porté sur les concentrations de tensioactifs qui étaient proche de la concentration micellaire critique. Il a été constaté que les deux agents dispersants (SDS et SDBS) forment des suspensions stables de NTCs même en dessous de leur limite de CMC (concentration micellaire critique) [120]. Madni et al. ont obtenu des dispersions stables de MWCNTs par un tensioactif cationique, le bromure triméthylammonium Dodecyl et par un tensioactif anionique, l'octanoate de sodium [21]. Rausch et al. ont proposé le mécanisme d'adsorption de tensioactifs anioniques (SDS), cationiques (CTAB) et des tensioactifs non ioniques (Brij76) [121]. Un traitement par ultrasons de faible puissance a été appliqué pour disperser et raccourcir des NTCs dans des solutions aqueuses contenant un tensioactif anionique (désoxycholate de sodium). Les NTCs sont efficacement et significativement raccourcies à moins d'environ 1  $\mu\text{m}$  après le traitement [122]. La capacité de dispersion des MWCNTs par le tensioactif anionique (SDS), cationique (CTAB) et non ionique (Triton-X100) et leur activité antibactérienne ont été étudiées. Parmi les trois suspensions aqueuses de MWCNTs avec les tensioactifs, la suspension de MWCNTs avec le CTAB présente la plus forte activité antibactérienne, même si CTAB a le pouvoir de dispersion plus bas pour les MWCNTs [114]. Blanch et al. ont étudié l'effet de la sonication et de la centrifugation, sur l'augmentation de la concentration des SWCNTs dispersés dans les suspensions aqueuses du tensioactif dodécyl sulfate de sodium [123]. Clark et al. ont montré l'effet du pH et de la concentration d'un certain nombre de tensioactifs anioniques, cationiques et non ioniques sur la dispersion des MWCNTs dans l'eau. Pour des milieux aqueux fortement acide ou basique, il est préférable d'utiliser le tensioactif non ionique avec la longue chaîne (Pluronic F68), tandis que, le tensioactif cationique CTAB augmente la solubilité des MWCNTs au dessus des niveaux réalisables avec les tensioactifs anioniques et non ioniques pour des conditions

proches des pH neutres [124]. Trois types de tensioactifs (anionique, cationique et non ionique) sont utilisés pour l'adsorption d'un contaminant organique (oxytétracycline) sur les MWCNTs. La capacité d'adsorption des NTCs est influencée par la nature et la concentration du tensioactif [125]. Lors d'une étude de la dispersion des NTCs dans le système environnemental, des tensioactifs ont été utilisés [16]. Des suspensions aqueuses de NTCs en utilisant dodecylbenzene sulfonate de sodium comme agent tensioactif pour la préparation des capteurs de gaz ( $\text{NO}_2$ ) [126]. Le liquide ionique à base de phosphonium (alkyl-triphényl phosphonium) peut disperser efficacement les MWCNTs, même à faible concentration [25].

La dispersion des SWCNTs dans des solutions aqueuses par les tensioactifs est expliqué principalement par les interactions hydrophobes / hydrophiles, dans lequel la queue hydrophobe de la molécule du tensioactif est adsorbée sur la surface des faisceaux de SWCNTs, tandis que la tête hydrophiles se dirige vers l'eau [124, 127]. Cependant, il reste un sujet de débat sur la façon dont les molécules amphiphiles sont adsorbées sur les SWCNTs. Trois configurations les plus probables sont illustrées sur la figure 2.6. Les tensioactifs peuvent encapsuler les nanotubes dans des micelles cylindriques (Figure 2.6.a), ou ils sont recouvert de micelles hémisphériques (Figure 2.6.b) ou s'adsorber de manière aléatoire (Figure 2.6.c) [12].



**Figure 2.6** : Représentations schématiques du mécanisme d'adsorption des tensioactifs à la surface des nanotubes de carbone [12].

#### 2.4. Conclusion

Pour la mise en suspension des NTCs dans l'eau, deux approches sont possibles. La première est de greffer chimiquement à la surface des NTCs des espèces qui leur confèrent une plus grande affinité avec l'eau. Cette approche présente cependant l'inconvénient d'affecter la structure et donc les propriétés des NTCs. Nous avons par conséquent choisi l'autre approche, non-covalente, qui consiste à adsorber des espèces amphiphiles à la surface des NTCs. Des travaux antérieurs ont montré que les liquides ioniques ont un pouvoir dispersant supérieur à celui des tensioactifs classiques [22-25]. Dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons à la présentation des liquides ioniques.

## CHAPITRE 3 :

### LIQUIDES IONIQUES

#### 3.1. Introduction

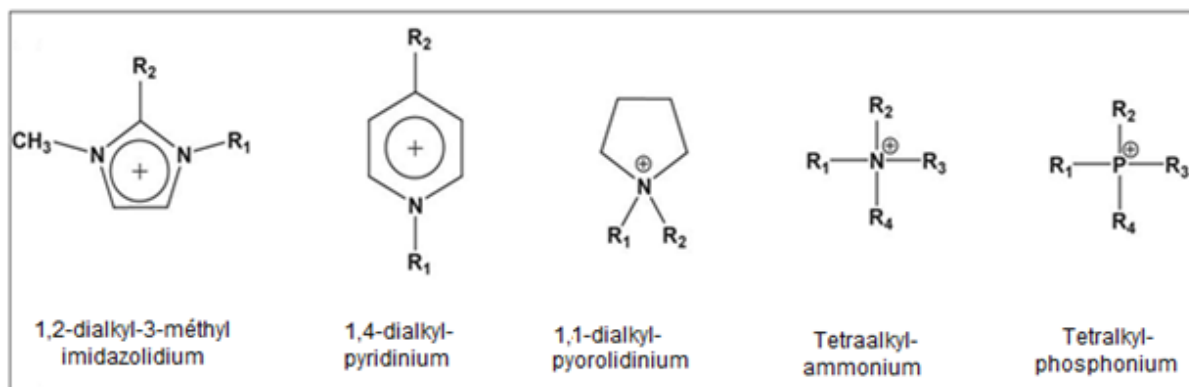
Un liquide ionique (LI) est, par sa définition la plus simple, un sel dont la température de fusion est inférieure à 100°C. Dans le cas idéal, les liquides ioniques possèdent une tension de vapeur très faible voire non mesurable. Ils ont une stabilité thermique élevée et sont relativement peu coûteux et faciles à synthétiser. Ils offrent une forte solvataion car c'est un milieu non coordonnant dans lequel un certain nombre de solutés organiques et inorganiques peuvent être dissous.

#### 3.2. Historique

Le premier liquide ionique, le nitrate d'éthylammonium, fut synthétisé par Walden et al. en 1914 durant la première guerre mondiale, en cherchant de nouveaux explosifs [128]. L'apparition du terme "liquide ionique" et des liquides ioniques à proprement parler date du milieu du 20<sup>ième</sup> siècle. Les chloraluminates constituent la première génération de ces milieux. En 1951, Hurley et al. ont mis au point la première synthèse de LI à base d'anions chloraluminate [129]. Durant les années 1970 et 1980, les liquides ioniques ont été utilisés principalement dans le domaine de l'électrochimie. Ils étaient difficiles à manipuler dans la mesure où ils étaient sensibles à l'oxygène et à l'humidité. La seconde génération de liquide ionique, apparue au début des années 1990, Wilkes et al. ont publié la préparation de 1-éthyle-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate [130]. Cette seconde génération de liquides ioniques possède différents avantages tels que l'inhibition de la croissance de microorganismes, la stabilité à l'air, une faible tension de vapeur et la capacité de dissolution de molécules difficiles à dissoudre dans l'eau. Depuis, les liquides ioniques ont connu un réel engouement de la part de nombreux chercheurs, dans les domaines de l'électrochimie, de la synthèse organique et de la catalyse et plus récemment, dans le domaine des sciences séparatives : l'extraction liquide – liquide, la chromatographie en phase gazeuse et en phase liquide et l'électrophorèse capillaire.

### 3.3. Structure des liquides ioniques

Les liquides ioniques sont en général constitués d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique. Les cations les plus fréquemment utilisés sont de type imidazolium, pyridinium, ammonium, pyrrolidinium ou phosphonium (figure 3.1) [131]. Les liquides ioniques les plus utilisés ces dernières années sont les composés à base de cations asymétriques de N,N-dialkylimidazolium.



**Figure 3.1 :** Structure des principaux cations retrouvés dans la composition des liquides ioniques. Les chaînes alkyles sont représentées par la lettre R.

La nature des anions qui composent les liquides ioniques peut être divisée en trois groupes : tout d'abord, les anions polynucléaires (le plus souvent  $\text{Cl}^-/\text{AlCl}_3$ ) qui constituent la classe dite de "première génération", puis, les anions mononucléaires inorganiques comme les anions halogénures ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^- \dots$ ), l'anion nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), l'anion hexafluorophosphate ( $\text{PF}_6^-$ ) et l'anion tétrafluoroborate ( $\text{BF}_4^-$ ) ; ou enfin, plus récemment, les anions mononucléaires organiques tels que l'anion trifluorométhanesulfonate, l'anion bis(trifluorométhylsulfonyle)imide et l'anion dicyanamide. Les différentes combinaisons cations/anions possibles sont à l'origine de la grande diversité des liquides ioniques. Les propriétés physicochimiques des liquides ioniques vont varier selon la combinaison cation/anion.

### 3.4. Propriétés physico-chimiques des liquides ioniques

Les LI présentent des propriétés physico-chimiques très particulières et très intéressantes vis-à-vis de nombreuses applications. Ces propriétés varient en fonction de la nature du cation et de l'anion qui composent le LI. Ainsi, les liquides ioniques à anions chlorures, bromures ou trifluoroacétates sont miscibles avec l'eau (hydrophiles) alors que, lorsque l'anion est un hexafluorophosphate ou un bis-(trifluorométhanesulfonyl)-imide, la solubilité dans l'eau est très limitée (hydrophobes). Les liquides ioniques sont miscibles avec tous les solvants dont la constante diélectrique est supérieure à 7 (les alcools, les cétones, le tétrahydrofurane, le dichlorométhane...) [132].

Les LI n'ont pas de tension de vapeur voire non mesurable et un bas de point de fusion (inférieure à 100°C). Les bas points de fusion des liquides ioniques sont en général attribués à plusieurs facteurs, par exemple la dissymétrie des chaînes substituant le cation lorsqu'il s'agit d'un LI alkyimidazolium.

Les LI possèdent une grande stabilité thermique. Parfois jusqu'à plus de 400°C [133]. Contrairement aux solvants organiques, ils permettent d'effectuer des réactions à haute température sans avoir à augmenter la pression.

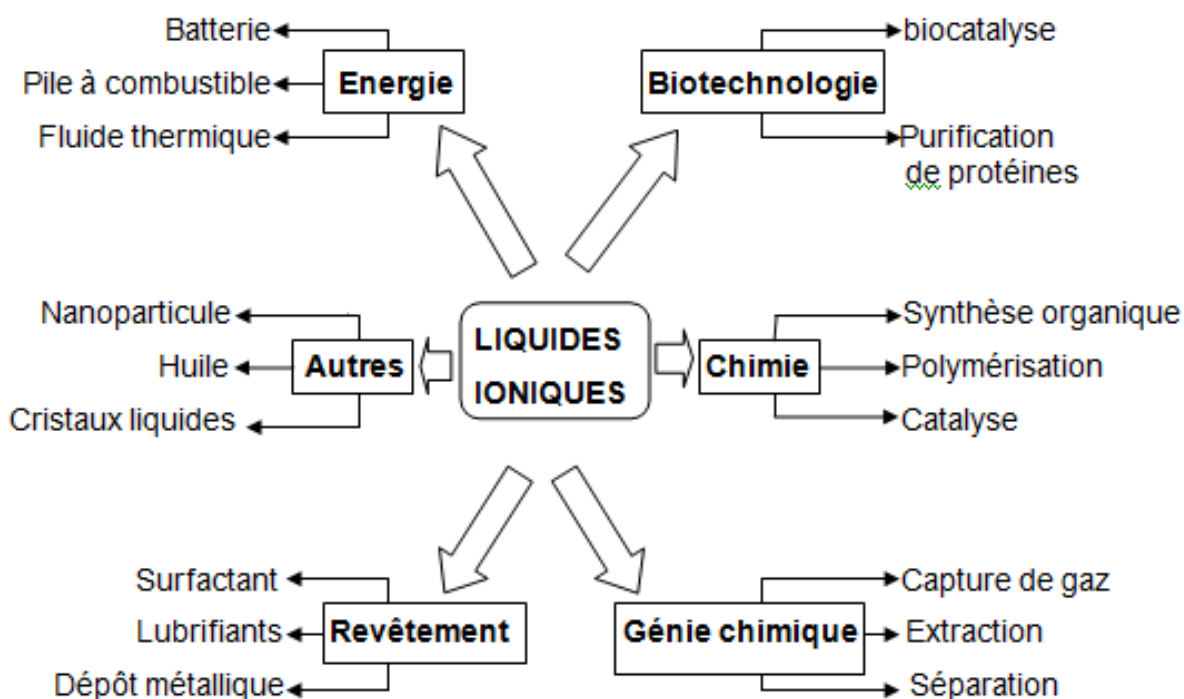
La majorité des LI à la température ambiante ont une densité plus grande que celle de l'eau (0,9 à 1,6 g.cm<sup>-3</sup>). Dans le cas des LI alkyimidazolium, la densité diminue lorsque la chaîne hydrocarbonée augmente [134]. Ainsi, la densité augmente avec l'augmentation de la masse molaire de l'anion [135].

De façon générale, les LI sont plus visqueux que les solvants organiques utilisés classiquement. A température ambiante, leur plage de viscosité s'étend de 10 mPa.s à 500 mPa.s. La viscosité des LI est déterminée essentiellement par leur tendance à former des liaisons hydrogènes et par la force des interactions de Van der Waals [136]. Les LI à alkyimidazolium voient leur viscosité diminuer dans l'ordre suivant des contre-anions : Cl<sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup> puis NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et avec la diminution de la longueur de la chaîne alkyle [133, 137].



### 3.5. Applications des liquides ioniques

Les liquides ioniques ont été développés il y a plus d'une vingtaine d'années dans le domaine de l'électrochimie pour la recherche de nouveaux systèmes d'énergie. Ces nouveaux milieux ont ensuite connu un grand intérêt dans les domaines de la synthèse organique et de la catalyse. Plus récemment, de nombreux chercheurs ont tenté de mettre en évidence l'intérêt des liquides ioniques dans le domaine des procédés de l'analyse, et plus particulièrement dans les sciences séparatives : l'extraction liquide – liquide, la chromatographie en phase liquide et gazeuse, et l'électrophorèse capillaire. Ces procédés de séparation sont au cœur de l'industrie chimique dans des domaines variés tels que la pétrochimie, l'hydrométallurgie, les industries pharmaceutiques, l'agroalimentaire ou encore le nucléaire. Quelques exemples d'applications des liquides ioniques dans différents domaines sont présentés sur la figure 3.2.



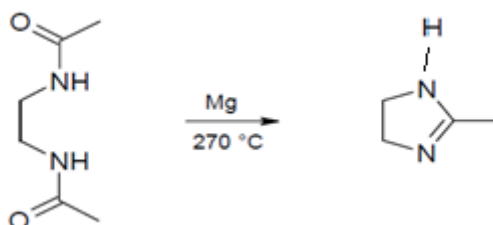
**Figure 3.2** : Exemples d'applications des liquides ioniques.

### 3.6. Synthèses des liquides ioniques à base d'imidazolium

#### 3.6.1. Synthèses de 2-imidazoline

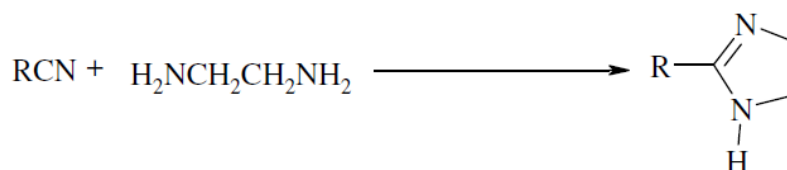
Des méthodes diverses ont été mises au point pour synthétiser l'imidazoline à partir des nitriles, des aldéhydes, des acides carboxyliques et leurs dérivés. De même, un grand nombre de chercheurs ont synthétisé l'imidazoline à partir de différents acides gras.

En 1935, Chitwood et Reid ont synthétisé 2-imidazoline par l'utilisation de métaux réducteurs (magnésium). Cette méthode a été décrite par Hoffman, où la 2-méthyl-2-imidazoline a été préparée par distillation du diacétyléthylènediamine sous flux de chlorure d'hydrogène (figure 3.3) [138].



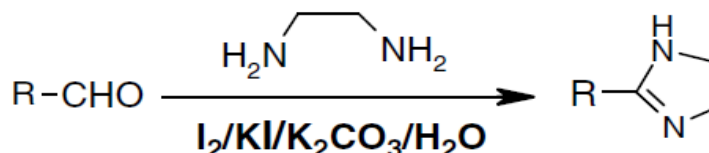
**Figure 3.3** : Synthèse de 2-méthyl-2-imidazoline.

D'autre part, la synthèse de 2-imidazoline à partir des nitriles et l'éthylène diamine a été étudiée par plusieurs auteurs (figure 3.4) [139-142]. Néanmoins, cette réaction présente plusieurs inconvénients tels que l'utilisation de température élevée, de longue durée de réaction qui peut aller jusqu'à quatre jours, des rendements bas, et nécessite plusieurs étapes. Pour éviter ces limitations, plusieurs auteurs ont découvert des catalyseurs avec une activité catalytique élevée pour donner une amélioration utile de la réaction. Ainsi, la technologie des micro-ondes a été appliquée avec succès pour accélérer le taux de formation de 2-imidazoline à partir des nitriles [143].



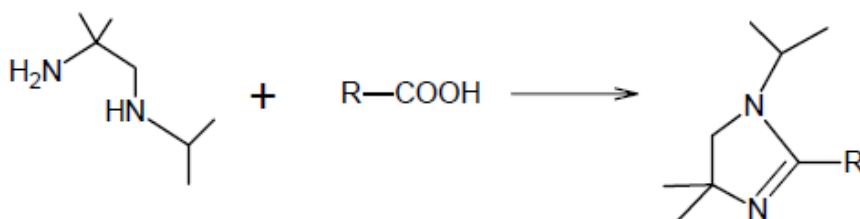
**Figure 3.4** : Réaction de synthèse de 2-imidazoline à partir des nitriles.

Parallèlement à ces travaux, un certain nombre de méthodes ont été rapportées pour la synthèse de l'imidazoline qui comprend la conversion entre les aldéhydes avec les diamines (figure 3.5). Cependant, cette réaction de synthèse a été étudiée seulement au cours des dernières années [144, 145]. Ces réactions nécessitent la présence d'oxydant.



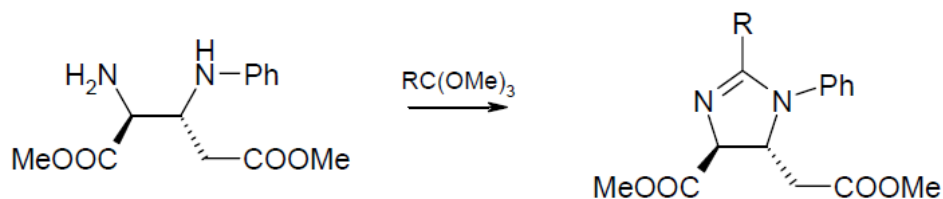
**Figure 3.5 :** Synthèse de 2-imidazoline à partir des aldéhydes.

La synthèse de 2-imidazoline est obtenue par condensation d'une 1,2-diamine dont une fonction amine primaire et l'autre secondaire, sur un acide carboxylique dans le benzène, l'eau formée étant éliminée par distillation azéotropique (figure 3.6). Seulement, cette réaction est caractérisée par un faible rendement et les imidazolines sont obtenues sous forme de sels qu'il suffit de traiter par une solution basique pour obtenir l'imidazoline correspondante libre [146, 147].



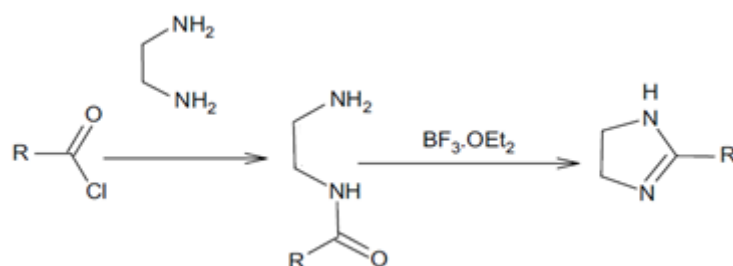
**Figure 3.6 :** Réaction de synthèse de 2-imidazoline à partir des acides carboxyliques.

Les esters carboxyliques ont aussi été utilisés sur le même principe que les acides carboxyliques. Une condensation avec une diamine avec une libération d'une molécule d'alcool et une molécule d'eau, la plupart du temps éliminées par distillation azéotropique (figure 3.7)[148].



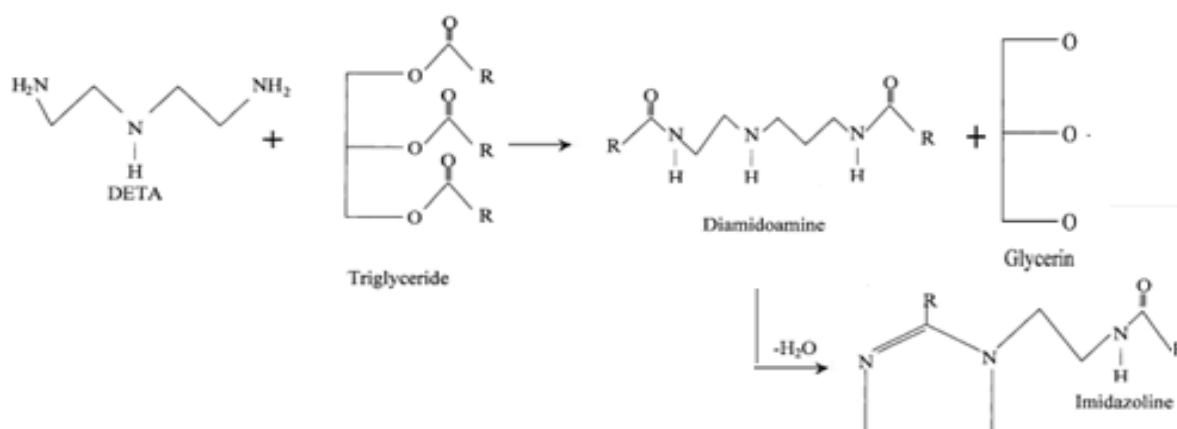
**Figure 3.7:** Réaction de synthèse de 2-imidazoline en utilisant les esters.

De même, le 2-imidazoline a été synthétisé par réaction entre le chlorure d'acétyle et l'éthylène diamine (figure 3.8). Le rendement de cette réaction est beaucoup plus élevé qu'avec l'acide carboxylique (entre 86 et 89%) [149].



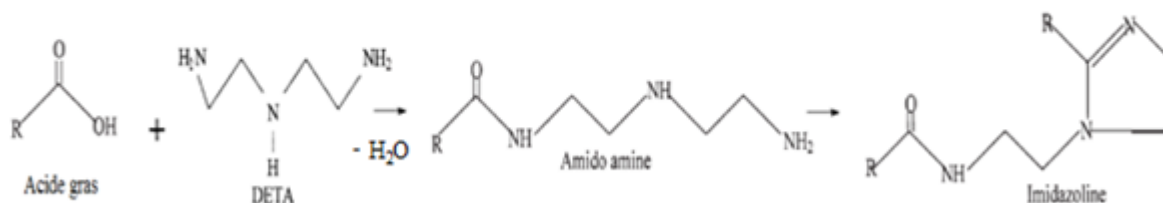
**Figure 3.8:** Réaction de synthèse de 2-imidazoline à partir de chlorure d'acétyle.

La réaction de la figure 3.9 a été développée par Earl et al. qui ont fait réagir le triglycéride avec la diéthylène triamine (DETA) pour la préparation de 2-imidazoline [150].



**Figure 3.9:** Réaction de synthèse de 2-imidazoline à partir de triglycéride.

La dernière méthode se base sur la réaction de la diéthylène triamine et plusieurs acides gras, l'eau formée est éliminée par distillation azéotropique (figure 3.10). Le rendement de cette réaction est élevé (90%) [150-154].



**Figure 3.10:** Réaction de synthèse de 2-imidazoline à partir d'acide gras.

### 3.6.2. Synthèse de sels d'imidazolinium:

Les sels d'alkyles imidazolium occupent une place importante dans le domaine des tensioactifs. Les sels d'imidazoliums dérivent de la N-alkylation qui se traduit par une fixation d'un alkyl ou aryl sur le noyau d'imidazolium. Dans les dernières quatre décennies, beaucoup de brevets ont été publiés décrivant la synthèse de sels d'imidazolines parmi lesquels, en 1950, Mannheimer et al. ont synthétisé un agent tensioactif de type imidazolium dans lequel 1-(2-hydroxyéthyl)-2-alkyl-2-imidazolinium a réagi avec le monochlorate de sodium [154]. Wang et al. ont également synthétisé un tensioactif imidazoline sulfonate, à partir d'acides gras et *N*-hydroxyethylethylenediamine, le produit résultant (1-(2-hydroxyéthyl)-2-alkyle-2-imidazoline) réagit avec 3-chloro-2-hydroxypropanesulfonate [153]. D'autre part, d'autres chercheurs ont synthétisé des sels imidazolines par une quaternisation par le sulfate de diméthyle [150, 152].

### 3.7. Application des liquides ioniques à base d'imidazolinium

Les liquides ioniques à base d'imidazolinium sont utilisés sur une grande échelle comme base tensioactive dans les formulations cosmétiques telles que shampooings, produits de nettoyage, détergents et autres en raison de leur caractère biodégradable et de l'absence d'effet irritant sur la peau.

Également, ils ont de diverses applications dans la préparation des émulsions de lubrifiant où ils sont connus pour agir en tant qu'émulsifiants, stabilisateurs, et inhibiteurs de corrosion [155].

En outre, ils trouvent des applications dans la synthèse chimique comme catalyseur ou solvant de réaction [156, 157]. Un ensemble de liquides ioniques à base d'imidazolium ont été utilisés comme électrolytes des batteries de dioxyde de manganèse [158]. Le liquide ionique (1-butyl-3-méthylimidazolium sulfate d'hydrogène) est décrit en tant que milieu solvantant (que ce soit sous forme de liquide pur et ou sous forme de mélanges aqueux) pour la lixiviation de métaux (or, argent et cuivre) [159].

De plus, les liquides ioniques ont été utilisés dans les sciences séparatives telles que l'extraction liquide-liquide, ils ont offert une alternative intéressante aux solvants organiques volatils [160]. Dans la Chromatographie liquide en phase inverse, en l'absence d'additifs, des composés basiques cationiques donnent lieu à des pics larges et asymétriques à la suite d'interactions ioniques avec des silanols libres résiduels sur les phases stationnaires à base de silice. Les liquides ioniques, ajoutés à la phase mobile, ont été utilisés comme solutions de recharge aux amines pour bloquer l'activité de silanols [161].

### 3.8. Toxicité des liquides ioniques à base d'imidazolium

Les liquides ioniques ont reçu une mauvaise presse dans les premiers jours quand il a été découvert, les sels imidazolium avec des substituant d'alkyles longues chaînes étaient extrêmement toxiques [162]. Actuellement, plusieurs recherches sont dirigées vers l'étude de la toxicité des liquides ioniques. Madria et al. ont montré que les 1-méthyl-3-alcoxyalkyl et de 1-méthyl-3-imidazolium fluoroalkyl sont relativement non toxiques pour la santé humaine [163]. Ainsi, les liquides ioniques à base d'imidazolium peuvent être considérés comme des composés chimiques présentant une légère toxicité pour la croissance et le développement des premiers stades des plantes supérieures terrestres [164]. Les liquides ioniques obtenus à partir des composés bio choline et acides aminés ont montré une faible toxicité pour l'homme et l'environnement [165].

De ce fait, décrivent des application des sels d'imidazolium avec de grande envergure et polyvalence dans plusieurs domaines de les bio-applications, y compris anti-tumorales, antimicrobiennes, antioxydantes et de la bio-ingénierie [166].

### 3.9. Etat de l'art sur la dispersion des NTCs par les LI à base d'imidazolium

Certaines recherches ont été menées sur les liquides ioniques à base d'imidazolium, Kim et al. ont pu préparer un gel en utilisant un liquide ionique à base d'imidazolium (1-butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate) et des SWCNTs [167]. Les nanotubes de carbone mono-feuillets en suspension dans les liquides ioniques à base d'imidazolium forment un gel appelé Bucky gel [168]. Une fonctionnalisation non covalente des nanotubes de carbone monofeuillets oxydés par les liquides ioniques à base de poly-imidazolium est utilisée pour la synthèse de gel [169]. Les SWCNT dispersés dans un liquide ionique à base d'imidazolium sont employés comme cathode dans des batteries à haute puissance au lithium [170]. Une suspension de MWCNT avec le 1-éthyl-3 -méthyl- imidazolium tétrafluoroborate dans le diméthylformamide a été utilisée comme immunocapteur pour la détection de la myéloperoxydase dans le sérum humain [171]. Un matériau magnétiquement sensible a été préparé avec les SWCNT et le 1-butyl-3-méthylimidazolium  $[\text{FeCl}_4]$  qui trouve des applications dans la recherche biomédicale [172]. Une méthode a été développée pour décorer les MWCNT avec les particules d'un métal noble (l'or) à l'aide d'un liquide ionique 1-hexadecyl-3-méthylimidazolium bromide [24]. Juan et al. ont réalisé une caractérisation quantitative par spectrophotométrie UV/Vis des SWCNT préparés dans des suspensions de liquides ioniques (1-N-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate) [173]. Di Crescenzo et al. ont montré que le liquide ionique à longue chaîne hydrocarbonée 1-hexadecyl-3-vinyl-imidazolium bromide a formé des suspensions aqueuses stable homogènes avec les SWCNT au-dessus de sa concentration micellaire critique [23]. Yonghui et al. déclarent avoir obtenu des suspensions aqueuses stables de MWCNT avec le liquide ionique type gémeaux imdazolium  $[\text{C}_n\text{-C}_4\text{-C}_{\text{nim}}] \text{Br}_2$ ,  $n = 12, 14$ ) même à faible concentration (1mM) [22]. Le liquide ionique avec une fraction aromatique polycyclique et une longue chaîne hydrocarbonée 1-[n-(N-carbazole) alkyl]-3-méthylimidazolium bromide a donné des suspensions satisfaisantes de NTC dans des suspensions aqueuses [174].

### 3.10. Conclusion

Cette étude bibliographique nous a permis de décrire différentes caractéristiques des liquides ioniques qui en font de bons candidats pour la mise en suspension des nanotubes de carbone. Ainsi, leurs synthèses à partir des produits naturels, peu coûteux, associée de leur faible toxicité, laissent la possibilité de leur utilisation dans une éventuelle étude d'écotoxicité des nanotubes de carbone.



## CHAPITRE 4 :

### MATERIELS ET METHODES

#### 4.1. Introduction

L'objectif principal de cette étude est la contribution à la mise en suspension des nanotubes de carbone à double parois (DWCNTs dans le milieu aqueux, en utilisant les liquides ioniques à base d'imidazolium synthétisés à partir de matières premières naturelles ; à savoir trois acides gras qui diffèrent par la longueur de la chaîne hydrocarbonée, et par la suite contrôler la toxicité orale aiguë du liquide ionique sélectionné comme étant le dispersant ayant donné la meilleure stabilité des suspensions de DWCNTs et enfin réaliser quelques tests de toxicité des suspensions de DWCNTs.

Au cours de ce travail, la capacité de l'Iodure de 2-alkyl-1- (2-hydroxyéthyl)-1-methylimidazolium à disperser les DWCNTs en solution aqueuse a été mise en évidence, ainsi que l'effet de la longueur de la chaîne hydrocarbonée et la concentration.

Dans ce contexte la démarche suivie pour aboutir à l'objectif visé se résume selon les étapes suivantes :

➤ Une première partie: la synthèse des trois liquides ioniques et leurs caractérisations par des méthodes physico-chimiques et spectrophotométriques.

➤ Une deuxième partie: comparaison de l'efficacité des trois liquides ioniques dans la dispersion des nanotubes en réalisant une étude physico-chimique par mesures des densités optiques par spectrophotométrie UV/Vis, les potentiels Zêta, les granulométries et les viscosités, ainsi que, des images prises au microscope électronique à transmission.

➤ Une troisième partie: étude de la toxicité orale aiguë du liquide ionique.

➤ Une quatrième partie : test de la toxicité des suspensions de DWCNTs avec le liquide ionique synthétisé par test d'inhibition de la bioluminescence de la bactérie *Vibrio fischeri*.

## 4.2. Matériels

Les acides gras utilisés comme matières premières pour la synthèse des liquides ioniques sont d'origine Sigma-Aldrich. Il s'agit de l'acide Myristique (99%), palmitique (99%) et stéarique (99%).

Les autres produits chimiques tels que le N (2-hydroxyéthyl) éthylène diamine et l'iodure d'éthyle proviennent du même fabricant.

Les autres produits chimiques usuels de laboratoire sont mentionnés en appendice A.

Les nanotubes de carbone à double parois (DWCNTs) ont été synthétisés au CIRIMAT (Centre interuniversitaire d'ingénierie des matériaux de Toulouse) par le procédé de dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD) [70].

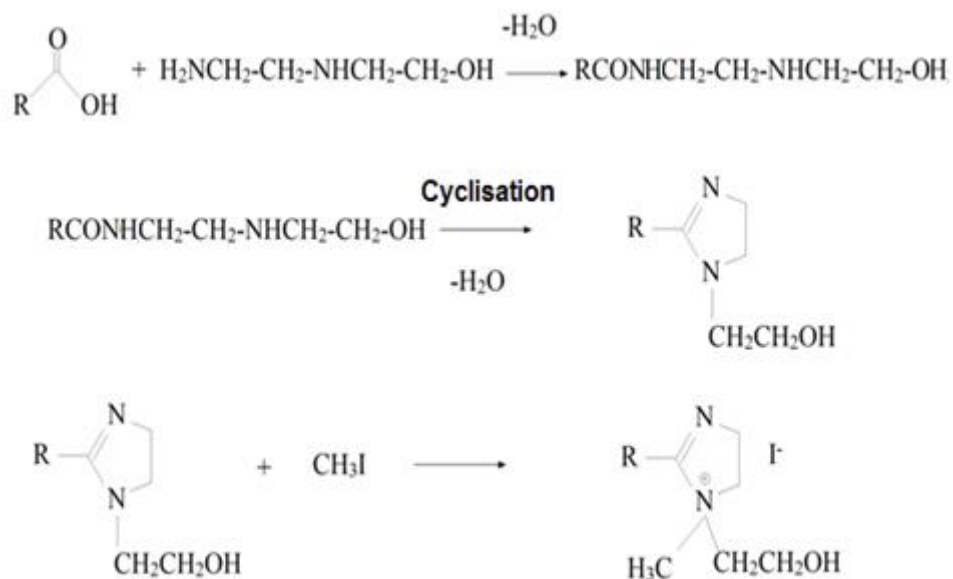
Pour les études de toxicité in-vivo, les souris utilisés sont des NMRI/ albinos fournies par le laboratoire Animal Breeding-Hanovre (Allemagne) ; il s'agit de femelles d'âge moyen entre 8 et 12 semaines.

Enfin la souche bactérienne de référence utilisée pour la mise en évidence de la toxicité des nanotubes de carbone est l'espèce *Vibrio fischeri* NNRL-B-11177. Elle est commercialisée sous forme lyophilisée et maintenue dans des conditions stériles.

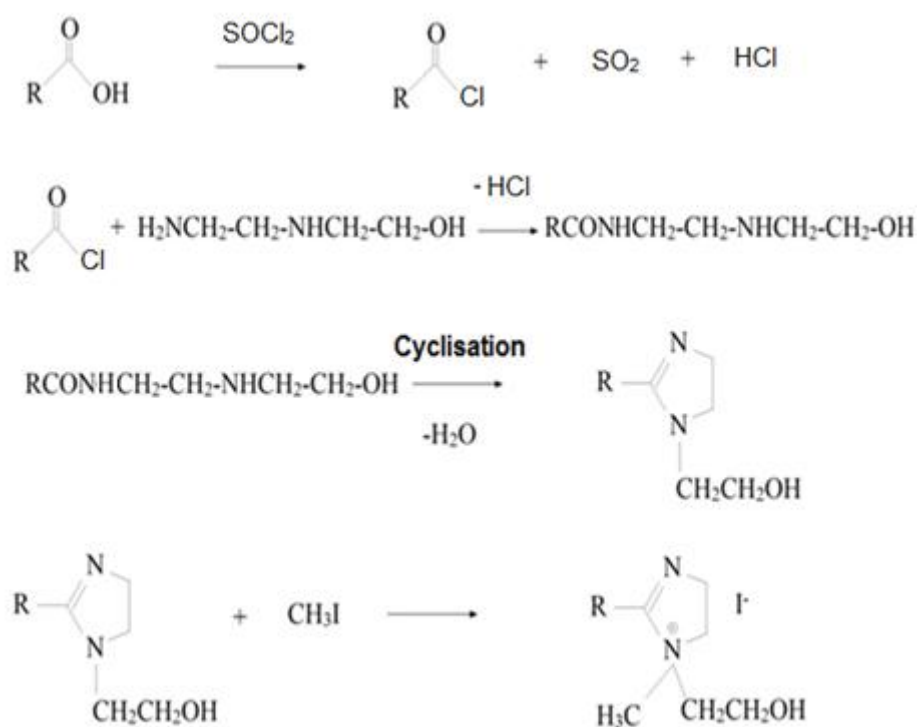
## 4.3. Méthode de synthèse et caractérisation des liquides ioniques

### 4.3.1. Synthèse des liquides ioniques

Les liquides ioniques à base d'imidazolium sont synthétisés par deux méthodes, une méthode qui fait réagir l'acide gras directement avec N (2-hydroxyéthyl) éthylène-diamine (figure 4.1) et l'autre méthode a une étape de plus, qui est de faire réagir l'acide gras avec le chlorure de thionyle, puis le produit résultant (dérivé chloré d'acide gras) réagit avec le N (2-hydroxyéthyl) éthylène-diamine (figure 4.2).



**Figure 4.1** : schéma général des réactions de synthèse du liquide ionique.



**Figure 4.2**: schéma de la deuxième voie des réactions de synthèse du liquide ionique.

On introduit dans un ballon l'acide gras (palmitique ou stéarique) avec le chlorure de thionyle (les réactifs sont de même rapport molaire) et 20 ml de toluène. On adapte le réfrigérant et on porte à reflux en maintenant une ébullition douce pendant six heures.

Après refroidissement du ballon, la deuxième étape de la réaction est entamée, on ajoute le N (2-hydroxyéthyl) éthylène-diamine. On adapte le réfrigérant et le Dean-Stark. En suite, le mélange sous agitation est chauffé à 140°C avec un bain d'huile, dans le toluène pendant 8 heures. L'eau formée est éliminée par voie azéotrope, en utilisant l'appareil Dean-Stark. Le produit résultant est refroidi et filtré. On élimine le solvant par évaporation rotatoire. Le solide est précipité par addition de 1-butanol, puis recristallisé dans l'éthanol.

Par la suite, l'iodure d'éthyle, le solide précipité et l'isopropanol sont introduit dans un ballon. On adapte le réfrigérant, on porte à reflux et on chauffe avec un bain d'huile, à 80°C sous agitation pendant 4 heures. Le produit résultant est filtré et le solvant est évaporé. Le solide est précipité par addition d'éther de pétrole [153, 155].

#### 4.3.2. Caractérisation des liquides ioniques

La caractérisation des produits de synthèse a été réalisée par des méthodes physico-chimiques (détermination du point de fusion, de la concentration micellaire critique et les mesures de viscosité) ainsi que par des méthodes spectroscopiques telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$ ).

Les points de fusion (Pf en °C) des composés synthétisés sont déterminés à l'aide d'un appareil à plaque chauffante de FISCHER-JONES (à lamelles). La concentration micellaire critique (CMC) a été réalisée par des mesures de conductivités à différentes concentrations moyennant un conductimètre de type Hanna Instruments (EC215). Les mesures des propriétés rhéologiques par déterminations des viscosités en fonction du taux de cisaillement ont été réalisées avec un rhéomètre (Physica Anton Paar, Allemagne), fonctionnant avec un cylindre concentrique et relié à un bain d'eau afin d'assurer une température constante de 25°C.

Les analyses FT-IR ont été effectuées par un spectromètre Perkin Elmer fonctionnant avec UATR (Universel Atténuation de Réflection Totale). La gamme spectrale est comprise entre 4000 à 650  $\text{cm}^{-1}$ , avec  $4\text{cm}^{-1}$  de résolution. Les analyses par GCMS ont été réalisées avec un appareil Perkin Elmer Clarus 500, équipé d'une colonne capillaire de CG RTX-5MS (60 m, 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ). Le four a été chauffé de 100 à 290 °C avec un palier de température de 8°C/min et maintenu à 290 °C pendant 10 min. La température de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 250 °C et 200 °C.

La caractérisation par RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C a été réalisée avec un Bruker advance (500 MHz) équipé d'une sonde de type TCI (Triple Cryoprobe inverse). Les échantillons ont été dissous dans du  $\text{CDCl}_3$ .

#### 4.4. Méthode de mise en suspension des nanotubes de carbone

##### 4.4.1. Extraction et filtration des nanotubes de carbone

L'extraction des NTCs à partir de la poudre composite permet d'éliminer le catalyseur (magnésie, oxyde de magnésium) et les nanoparticules métalliques (Co, Mo) n'ayant pas réagit.

L'attaque chimique de la poudre composite est réalisée avec un excès d'acide chlorhydrique (HCl, 37% ; 15 ml HCl pour gramme de poudre composite [70]) mouillée auparavant avec une quantité d'eau (2 à 3g d'eau par gramme de poudre de composite) pour éviter que la poudre de composite ne s'envole hors de l'erenmeyer lors de l'ajout de l'acide par la suite. Cette réaction est très exothermique, il est préférable d'immerger l'erenmeyer dans de l'eau froide ou de la glace. Une fois l'acide versé, la suspension est agitée pendant 15 min sous ultrasons. La suspension se colore en bleu (MgO est dissout, formation du complexe  $\text{CoCl}_4^{2-}$ ). Une durée de douze heures est nécessaire (réaction « overnight ») pour que l'attaque acide des particules catalytiques soit complète. Une étape de filtration sous vide de la suspension permet de récupérer les NTCs mouillés qui ne traversent pas la membrane en nitrate de cellulose (Whatman, diamètre des pores égal à 0,45  $\mu\text{m}$ ), mais également les sous-produits de synthèse non éliminés lors de l'extraction.

L'ensemble est rincé à l'aide d'eau désionisée jusqu'à pH neutre. Les NTCs sont récupérés et conservés dans un volume d'eau désionisée, les NTCs ainsi préparés sont nommés "tubes bruts humides".

#### 4.4.2. Dispersion des nanotubes de carbone

Les suspensions DWCNTs sont préparées dans l'eau désionisée. Une suspension mère de DWCNTs a été préparée. Pour les trois liquides ioniques synthétisés, des solutions mères ont été préparées dans l'eau désionisée, sous agitation magnétique pendant 4 heures afin d'assurer la dissolution des trois tensioactifs. Le mélange des deux suspensions, solution mères (DWCNTs et tensioactifs) est réalisé de telle façon à obtenir un volume de 10 ml de suspension de DWCNTs à une concentration égale à 50mg/l et des concentrations égales à 1, 1,5 et 10 mM des trois liquides ioniques.

Le choix d'une forte concentration de DWCNTs (50 mg/l), est justifié par les travaux antérieurs liés à l'évaluation de l'impact environnemental de suspensions de DWCNTs avec les dérivés de cellulose tel que la carboxyméthylcellulose [96, 109] et avec les dérivés de xanthane [14], afin de comparer les performances de liquides ioniques synthétisés par rapport à ces dérivés.

Les suspensions de DWCNTs obtenues sont mélangées dans un bain à ultrasons (Bioblock T570, 35 KHz, 160 W) pendant 10 min, puis en utilisant une sonde à ultrasons (Modèle Vibra cell 75 042, 20 kHz, 500 W) pendant 30 min à 25 % d'amplitude. L'agitation de l'échantillon provoque généralement une élévation de la température, le récipient contenant la suspension est donc immergé dans un bain de glace, comprenant une phase de sonication (5 sec ON) suivie d'une phase d'arrêt (5 sec OFF). Ce cycle améliore le traitement en permettant aux NTCs de revenir sous la sonde après chaque décharge.

Le contrôle de la sédimentation des échantillons a été suivi pendant vingt jours par des observations visuelles, des mesures d'absorbance et des mesures granulométrie.

#### 4.5. Méthode de caractérisation des dispersions de nanotubes de carbone

Les suspensions DWCNTs ont été caractérisées par spectrophotomètre UV/Vis (Varian Cary 300). Les mesures d'absorbance sont effectuées dans un domaine de 400 à 900 nm, instantanément et suivant une cinétique de 20 jours. Les mesures de potentiel Zêta sont réalisées avec un zêtasizer (Modèle ZEN 3691, Malvern Instruments), sur des suspensions centrifugées à 1600 tpm pendant 30min tout en récupérant le surnageant des suspensions laissées au report pendant 24 heures. Le taux de viscosité en fonction du taux de cisaillement est déterminé par un rhéomètre (Physica Anton Paar, Allemagne), fonctionnant avec un cylindre concentrique et relié à un bain d'eau afin d'assurer une température constante de 25°C.

Les mesures de taille des colloïdes en suspension ont été réalisées par la technique de Diffusion Dynamique de la Lumière DLS en utilisant un appareil de type SZ-100 (Horiba Scientific), la granulométrie des suspensions est mesurée pendant 48 heures à des intervalles de temps réguliers.

Les suspensions de DWCNTs sont également caractérisées par le microscope électronique à transmission (JEOL TEM 1400), avec une tension d'accélération de 120kv. Les échantillons ont été préparés par pipetage, quelques gouttes des suspensions ont été déposées sur des grilles à trous Lacey Carbon, 400 Mesh Cu (3,05 mm de diamètre) d'origine Agar Scientific.

#### 4.6. Méthode de l'étude de toxicité orale aiguë du liquide ionique





Pour pouvoir étudier la toxicité des nanotubes de carbone mis en suspension dans l'eau, il faut s'assurer au préalable que les agents dispersants eux même ne présentent aucun danger par détermination in-vivo de la toxicité orale aiguë. En effet, cette dernière est l'effet néfaste qui résulte de l'administration par voie orale d'une dose d'une substance pendant une période de 24 heures au minimum. Elle s'exprime en poids de substance testée par unité de poids de l'animal d'expérience. Plusieurs doses sont utilisées et on analyse les signes d'intoxication et la mortalité.

Une étude de toxicité aiguë aboutit classiquement à la détermination de la DL50 (dose létale 50). C'est la valeur statistiquement dérivée d'une dose unique de substance dont l'administration par voie orale peut provoquer la mort de 50 % des animaux d'expérience. C'est ce critère de DL50 qui permet le classement des substances chimiques en vue de leur étiquetage réglementaire Mortel, toxique, ou nocif [175-177].

En Décembre 2008, un nouveau règlement a été publié avec les principaux objectifs de faciliter le commerce international des produits chimiques et de maintenir le niveau actuel de protection de la santé humaine et de l'environnement. CLP est le règlement relatif à la classification, à l'étiquetage et l'emballage des substances et des mélanges. Ce règlement aligne la législation de l'Union Européen relative à la classification précédente, l'étiquetage et l'emballage des produits chimiques au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH).

Les substances peuvent être attribuées à une des quatre catégories de toxicité aiguë sur la base de leur toxicité [178]. Le tableau 4.1 représente les catégories de danger de toxicité aiguë et des valeurs d'estimation de la toxicité aiguë définissant les catégories respectives.

**Tableau 4.1** : Catégories de danger de toxicité aiguë et des valeurs d'estimation de toxicité aiguë définissant les catégories respectives [178].

Classification Toxicité aiguë par voie orale	Catégorie 1 <5mg/kg P.C	Catégorie 2 5-50mg/kg P.C	Catégorie 3 50-300mg/kg P.C	Catégorie 4 300-2000mg/kg P.C	Non classé >2000mg/kg P.C
UE CLP pictogrammes					Aucun
Mention d'avertissement Mention de danger :- orale	Danger H300: Mortel en cas d'ingestion	Danger H300: Mortel en cas d'ingestion	Danger H301: toxique en cas d'ingestion	Attention H302: Nocif par ingestion	Aucun Aucun



Le test de toxicité classique, qui a d'abord été décrit par Trevan en 1927 [179], qui nécessite un grand nombre d'animaux, auparavant utilisé par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques) dans la ligne directrice 401 qui a été remplacé par trois lignes directrices de l'OCDE 420 [176], 423 [177] et 425 [180] où un nombre moindre d'animaux sont utilisés dans les expériences [178].

Afin d'évaluer la toxicité orale aiguë, nous avons à choisir entre la méthode classique et les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le tableau en appendice C représente les critères de comparaison entre ces méthodes.

La méthode par classe de toxicité aiguë a été choisie, cette procédure est reproductible, respecte les critères d'éthique (peu d'animaux) et, comparée aux autres méthodes de toxicité aiguë, elle permet de classer les substances par ordre de toxicité de façon similaire et renseigne de manière extensive *in vivo* par rapport à des données de DL50 de la littérature, sur le plan international.

#### 4.6.1. Description de la méthode

##### 4.6.1.1. Choix de l'espèce animale

Le rat est l'espèce préférée mais d'autres espèces peuvent être utilisées. Pratiquement, on utilise des femelles. Cependant, si la connaissance des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins indique que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient de les employer. Dans ce cas, il faut fournir une justification adéquate [176].

Des animaux adultes sains provenant de souches couramment utilisées en laboratoire ont été utilisés. Les femelles sont nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer à un intervalle de  $\pm 20\%$  par rapport au poids moyen des animaux précédemment exposés [176].

#### 4.6.1.2. Conditions d'hébergement et d'alimentation

La température du local des animaux d'expérience doit être de 22°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ). Le taux d'humidité relative devrait être 30% au moins et ne pas dépasser 70%. Sauf pendant le nettoyage de la salle, une humidité relative entre 50 et 60% est idéale. Un éclairage artificiel est utilisé et la séquence doit être de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose [176].

Toutefois le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal [176].

#### 4.6.1.3. Préparation des animaux

Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience [176].

#### 4.6.1.4. Préparation des doses

En aucun cas, le volume de la dose maximale ne peut être dépassé. Ce dernier peut être administré en une seule fois et dépend de la taille de l'animal d'essai. Pour les rongeurs, le volume ne doit pas dépasser 1ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2ml /100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution, suspension ou émulsion chaque fois que cela est possible, on peut aussi utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de maïs) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules non aqueux dont la toxicité doit être connue.

Les doses doivent être préparées juste avant l'administration sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable [176].

#### 4.6.2. Mode opératoire

##### 4.6.2.1. Administration des doses

La substance d'essai est administrée en une seule dose en utilisant une sonde gastrique ou toute autre canule pour intubation appropriée [176].

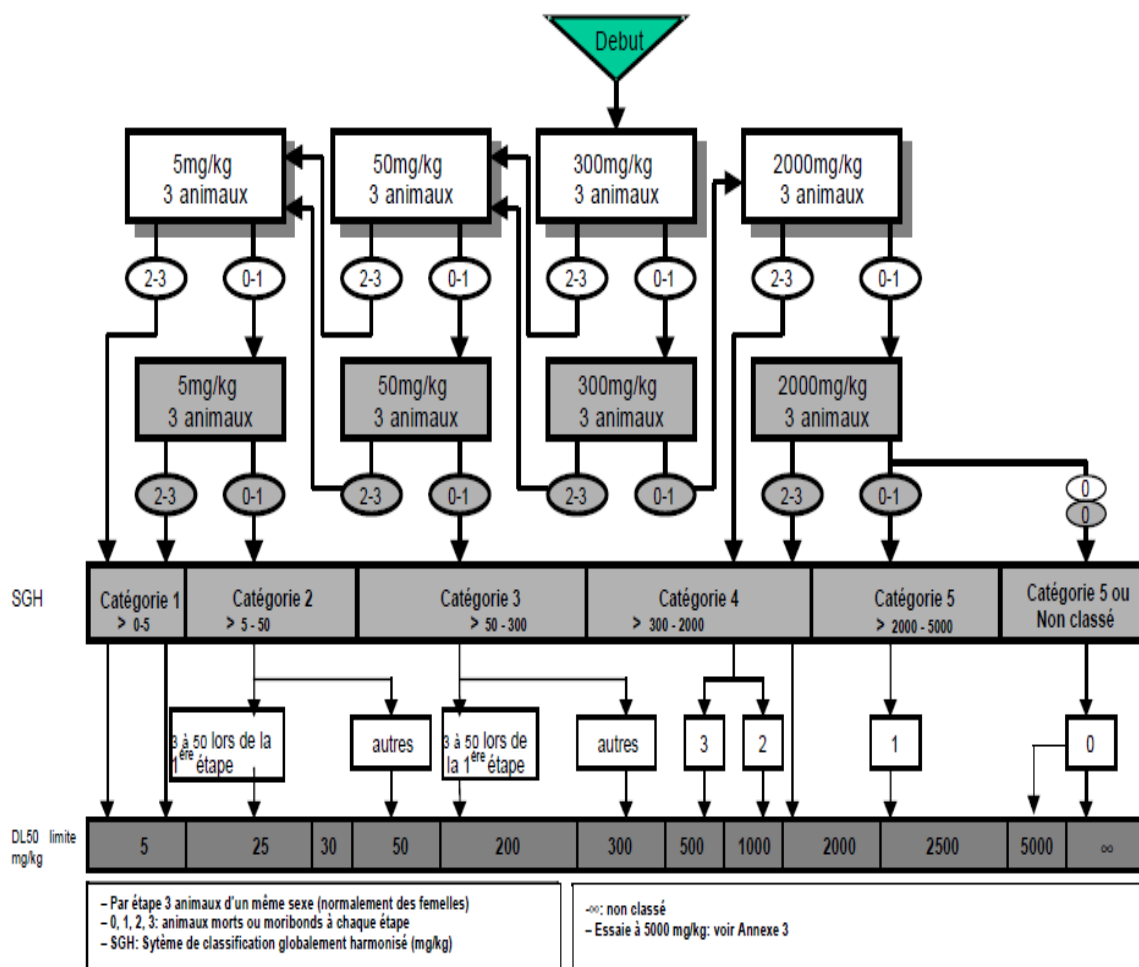
Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance ; pour les rats, on supprime la nourriture tout en laissant l'eau, pendant la nuit et pour les souris, on réalise cette opération pendant 3 à 4 heures. Après la période à jeune, les animaux doivent être pesés et la substance d'essai leur est administrée. Au-delà, les animaux sont à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et 1 à 2 heures pour les souris [176].

##### 4.6.2.2. Nombre d'animaux et niveaux des doses

Chaque étape nécessite trois animaux. Pour la dose initiale on choisit un niveau parmi les quatre suivants: 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer la mortalité parmi quelques-uns des animaux traités. La figure 4.4 illustre le mode opératoire à suivre pour la dose initiale égale 300 mg/kg [176].

Lorsque des informations qui suggèrent une mortalité peu probable sont disponibles au niveau de dose initiale la plus élevée (2000 mg/kg de poids corporel), il faut procéder à un essai limite. En l'absence de telles informations sur la substance d'essai, la dose initiale qui est recommandée pour des raisons liées au bien-être des animaux est de 300 mg/kg [176].

L'intervalle de temps entre l'administration de chaque niveau de dose est dicté par le début, la durée et la sévérité des effets toxiques observés. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce qu'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu [176].



**Figure 4.3** : Mode opératoire à suivre pour la dose initiale égale 300mg/kg [176].

#### 4.6.3. Observations

Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement pendant les premières 24 heures après le traitement.

Une attention particulière s'impose pendant les 4 premières heures et quotidiennement pendant 14 jours après l'administration de la substance, à l'exception des animaux qui sont morts au cours de l'étude ou qui sont retirés de l'étude et tués avec éthique. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée d'une manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la longueur de la période de récupération. Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal [176].

#### 4.6.3.1. Poids corporel

Le poids individuel de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et ensuite au moins une fois par semaine. Les changements de poids doivent être calculés et enregistrés. A la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis tués avec éthique [176].

#### 4.6.3.2. Pathologie

Tous les animaux d'essai (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons de protection des animaux) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus après l'administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagés, car cet examen peut fournir des renseignements utiles [176].

#### 4.7. Méthode de l'étude de d'écotoxicité des DWCNTs

Après étude de la toxicité des substances dispersantes, une des méthodes de la mise en évidence l'écotoxicité des NTCs a été proposée dans cette étape. En effet, les nanotubes de carbone peuvent potentiellement se retrouver dans l'environnement en cas d'accident lors de leur production industrielle mais aussi dans des résidus de produits usés, ou encore sous forme de déchets. Ils représentent donc une source potentielle de contamination nouvelle qui, mise au contact de l'environnement, peut constituer un risque pour les écosystèmes, qu'il s'agit d'évaluer. Dans notre étude, nous nous sommes focalisés essentiellement sur le milieu aquatique considéré comme le réceptacle ultime de toute pollution.

En comparaison avec l'analyse chimique qui est seulement capable de déterminer les composants et les concentrations des contaminants rejetés dans l'environnement, l'analyse biologique pourrait intuitivement refléter les préjudiciables effets des contaminants sur les organismes. Le test d'inhibition de la bioluminescence de *Vibrio fischeri* selon la norme ISO / CD 11348 (1994) [181] est largement utilisé dans les essais biologiques standardisés, pour la détermination de la toxicité aiguë des substances chimiques et des effluents. Cette méthode est relativement rapide avec un temps d'incubation de 30 minutes, mais aussi comme un essai biologique à faible coût qui peut être recommandé comme une méthode d'essai précieux dans le contrôle de la pollution de l'eau [182].

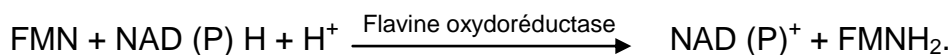
#### 4.7.1. Principe de la méthode

Le test permet d'évaluer la toxicité aiguë d'un ou de plusieurs produits vis-à-vis des bactéries. *Vibrio fischeri*, la bactérie marine utilisée dans ce test, émet naturellement de la lumière. En présence de toxiques, son métabolisme est affecté ; inhibition de la luciférase, une enzyme qui catalyse son oxydation et s'accompagne d'une émission de lumière. Les bactéries lumineuses émettent une lumière de couleur bleu-verte avec une bande spectrale plutôt étroite avec un maximum proche de 490 nm [183]. La bioluminescence est donc un très bon indice de l'état de la bactérie. Par mesure de l'intensité lumineuse des bactéries exposées à l'échantillon de test et la comparaison avec celle du contrôle, l'inhibition peut être calculée pour quantifier la toxicité.

En utilisant cette propriété, ce test permet donc de déterminer dans les conditions définies par la norme, la concentration de l'échantillon qui en 30 minutes diminue de 50% de la luminescence de la bactérie étudiée [184].

#### 4.7.2. Mécanisme de la bioluminescence de la bactérie

La lumière émise par les bactéries luminescentes s'appuie principalement sur le système enzymatique qui se compose d'une flavine oxydoréductase et la luciférase. Tout d'abord, flavine mono-nucléotide (FMN) est réduite en flavine mono-nucléotide réduite (FMNH<sub>2</sub>) en présence adénine di-nucléotide de phosphate réduite (NAD (P) H) dans un milieu acide, la réaction est catalysée par l'enzyme flavine oxydoréductase [184, 185].



Ensuite, la luciférase bactérienne catalyse l'oxydation de FMNH<sub>2</sub> pour produire FMN en présence d'un aldéhyde à chaîne longue (RCHO) et l'oxygène, dans cette réaction une lumière bleu-verte de longueur d'onde 490 nm est émise [184-186].



#### 4.7.3. Mode opératoire

##### 4.7.3.1. Préparation de la suspension cellulaire

La souche bactérienne lyophilisée de *Vibrio fischeri* est reconstituée avec 1ml de la solution PBS1-G (tableau 4.2). Un volume de 0,1ml de la souche reconstituée de la bactérie, est ensemencé sur un milieu solide spécifique à l'aide d'une anse en platine. Les boîtes sont ensuite incubées à la température de 23°C pendant 48 heures.

**Tableau 4.2 :** Constitution de la solution tampon PBS-1-G.

Constituants	Quantité
Tampon phosphate, pH7	100 ml
Chlorure de sodium	10 g
Glucose	20 g
Eau distillée	900 ml

Après visualisation des colonies bioluminescentes dans l'obscurité totale, une colonie de *Vibrio fischeri* présentant une forte luminescence, est ensemencée à l'aide d'une anse en platine dans une fiole qui renferme 50ml du milieu de culture (tableau 4.3). L'incubation se fait à 23°C pendant 18 heures sous agitation à 225 cycles/minute.

**Tableau 4.3** : Constitution du milieu de culture.

Constituants	Quantité
Chlorure de sodium	20 g
di-Potassium hydrogénophosphate	3,9 g
Chlorure d'ammonium	5 g
Sulfate de Magnésium hepta hydraté	1 g
Chlorure de potassium	0,75 g
Extrait de levure	5 g
Typotone	5 g
Tris (hydroxyméthyl) aminométhane chlorhydrate, 1M, pH 7,5	50 ml
Glycérol	3 ml
Eau distillée	947 ml

#### 4.7.3.2. Préparation des dilutions

Les dilutions des échantillons à analyser, doivent être préparées dans six cuvettes, mises dans le block d'analyse de l'appareil Toxtracer. Les cuvettes sont remplies avec 0,5 ml de la solution de dilution Hepes (tableau 4.4). Dans la première cuvette, 0,5ml de la solution à analyser est déposée, on prélève de chaque cuvette 0,5 ml qu'on dépose dans la cuvette suivante jusqu'à la sixième cuvette. Le blanc doit être préparé en déposant 0,5ml de solution Hepes dans la septième cuvette.

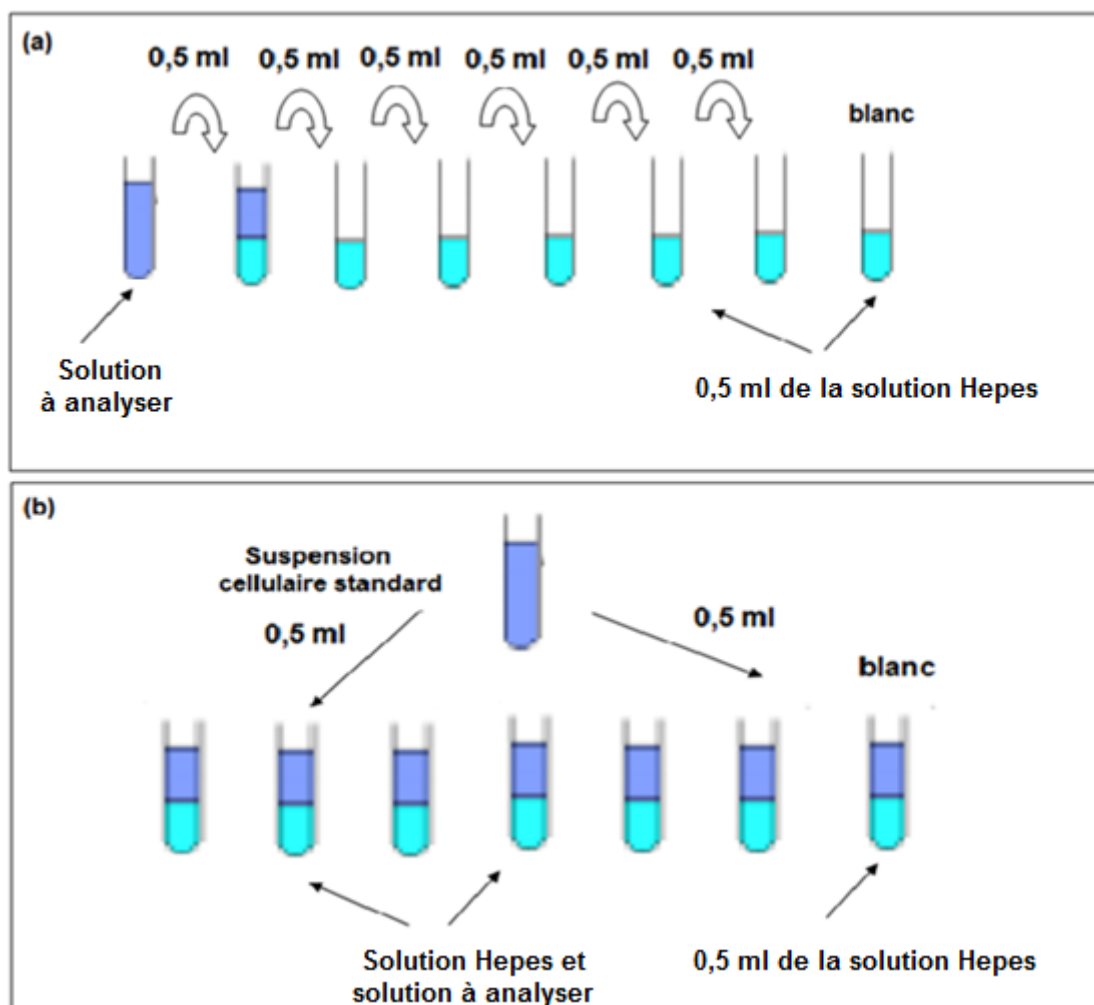
**Tableau 4.4** : Constitution de la solution dilution Hepes.

Constituants	Quantité
2-4(2-hydroxyéthyl) 1-piperazinyll éthansulfonique 1M, pH7	50 ml
Chlorure de sodium	20 g
Chlorure de potassium	0,3 g
Eau distillée	950 ml



La suspension cellulaire préparée (paragraphe 4.7.2.2) est analysée au luminomètre, si la luminescence est supérieure à 500 R.L.U (Unité Relative de Luminescence), 1ml de la solution est mélangé aux 12 ml de la solution Hepes. 0,5 ml de la suspension cellulaire sont ajoutés dans chaque cuvette afin d'obtenir un volume final de 1ml. L'intervalle pour chaque rajout est de 10 secondes. Il faut débiter par le blanc, puis de la solution moins concentrée vers les solutions les plus concentrées (figure 4.5).

La lecture se fera au luminomètre après 30 min d'incubation à 15°C dans le « cooling block », en débutant par le blanc, puis de la solution moins concentrée vers les solutions plus concentrées.



**Figure 4.4 :** Mode opératoire à suivre pour l'essai de la bioluminescence, (a) préparation des dilutions, (b) addition de la suspension cellulaire standard.

## CHAPITRE 5 :

### RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### 5.1. Introduction

Dans ce chapitre sont présentés les résultats des trois étapes principales de cette étude :

- La synthèse des liquides ioniques ainsi que leurs caractérisations, par les méthodes physico-chimiques (détermination de point de fusion, la CMC et mesures de viscosités) et par les méthodes spectroscopiques (FT-IR, GCMS, RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$ ).

- En deuxième étape, sont présentés les résultats de la mise en suspension des nanotubes de carbone en utilisant les trois liquides ioniques synthétisés et la mise en évidence de l'influence de la longueur de la chaîne hydrocarbonée.

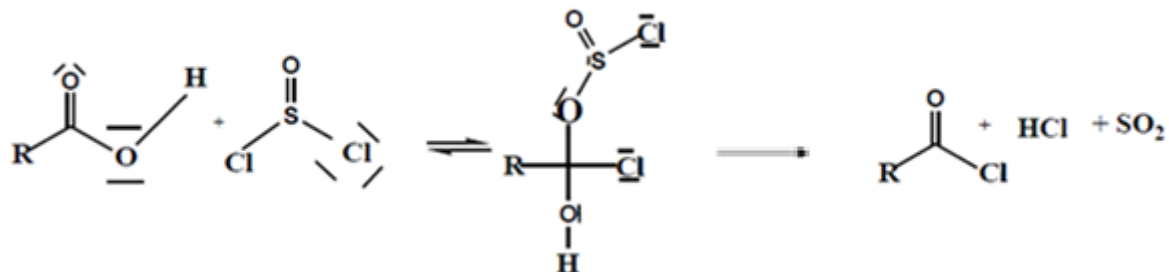
- L'étude de la toxicité orale aiguë du liquide ionique sélectionné comme étant le liquide ionique qui a donné la meilleure dispersion des DWCNTs. Enfin, l'étude de la toxicité des suspensions de DWCNTs avec le liquide ionique synthétisé par le test de luminosité en utilisant les bactéries vibrio-fescheri.

#### 5.2. Synthèse et caractérisation des liquides ioniques

##### 5.2.1. Synthèse des liquides ioniques

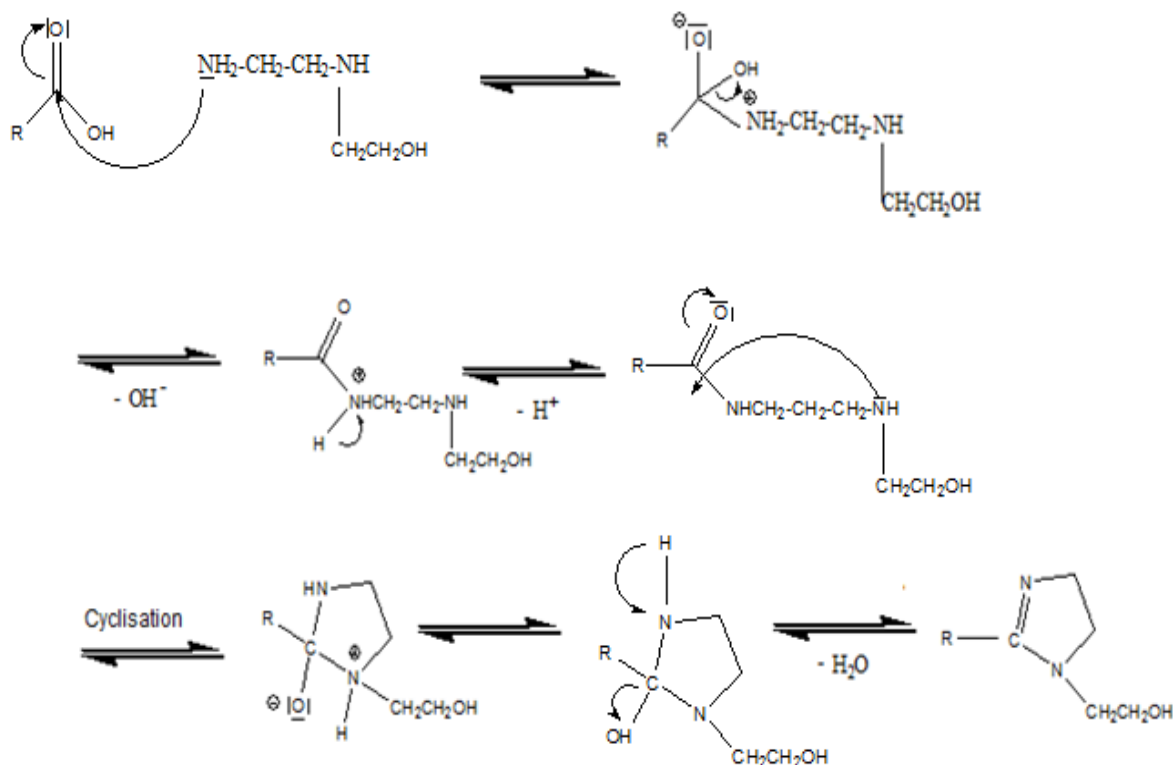
La synthèse des liquides ioniques est réalisée par deux méthodes, à partir d'acides gras directement ou à partir de dérivés chloré d'acide gras correspondant. Ainsi, la première méthode se déroule en trois étapes ; synthèse de dérivés chloré d'acide gras, puis la synthèse de 2-alkyl-imidazoline et enfin, la synthèse de sel d'imidazolium. Cependant, la deuxième méthode se déroule en deux étapes, synthèse de 2-alkyl-imidazoline, en suite, la synthèse de sel imidazolium correspondant.

La synthèse de dérivés d'acide gras est une réaction très simple, sous l'effet de la chaleur le chlorure de thionyle réagit avec l'acide gras pour donner le dérivé chloré d'acide gras :



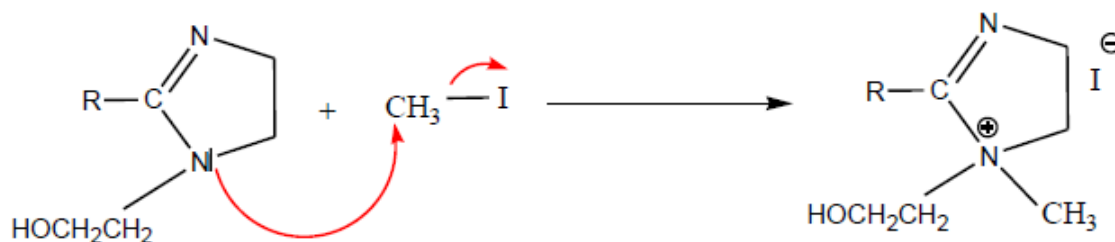
**Figure 5.1** : Mécanisme réactionnel de la synthèse de dérivé chloré d'acide gras.

La synthèse de 2-imidazoline est une réaction qui se déroule selon le processus de cyclisation d'une imidazoline stable. La réaction entre l'acide gras et l'éthylène diamine permet de préparer des amides avec élimination d'une molécule d'eau. Ce dernier se transforme en imidazoline par réaction de cyclisation avec libération d'une molécule d'eau à la fin de la réaction. Un mécanisme de réaction selon le schéma suivant a été proposé:



**Figure 5.2** : Mécanisme réactionnel de la synthèse de 2-alkyl-imidazoline.

La synthèse du sel imidazolium, se déroule par réaction d'alkylation directe du dérivé imidazoline et dérivé halogéné (iodure de méthyle dans notre cas). Il s'agit d'une réaction de substitution nucléophile utilisant le groupement amine du cycle imidazoline comme réactif nucléophile et le groupement  $\text{CH}_3\text{I}$  comme substrat (le doublet libre de l'atome d'azote attaque des groupements  $\text{CH}_3\text{I}$ ). Pour cette raison, un mécanisme de réaction selon le schéma suivant a été proposé:



**Figure 5.3** : Mécanisme réactionnel de synthèse de sel imidazolium.

## 5.2.2. Caractérisation des produits de synthèse par méthodes physico-chimiques

### 5.2.2.1. Détermination du point de fusion

La température de fusion est une valeur caractéristique d'un composé et permet d'en vérifier sa pureté. Les résultats des mesures du point de fusion obtenus ainsi reportés dans la publication [150], sont portés dans le tableau 5.1. Les valeurs obtenues sont en concordance avec la littérature avec une légère baisse qui peut être attribuée à la présence d'impuretés (traces de réactifs).

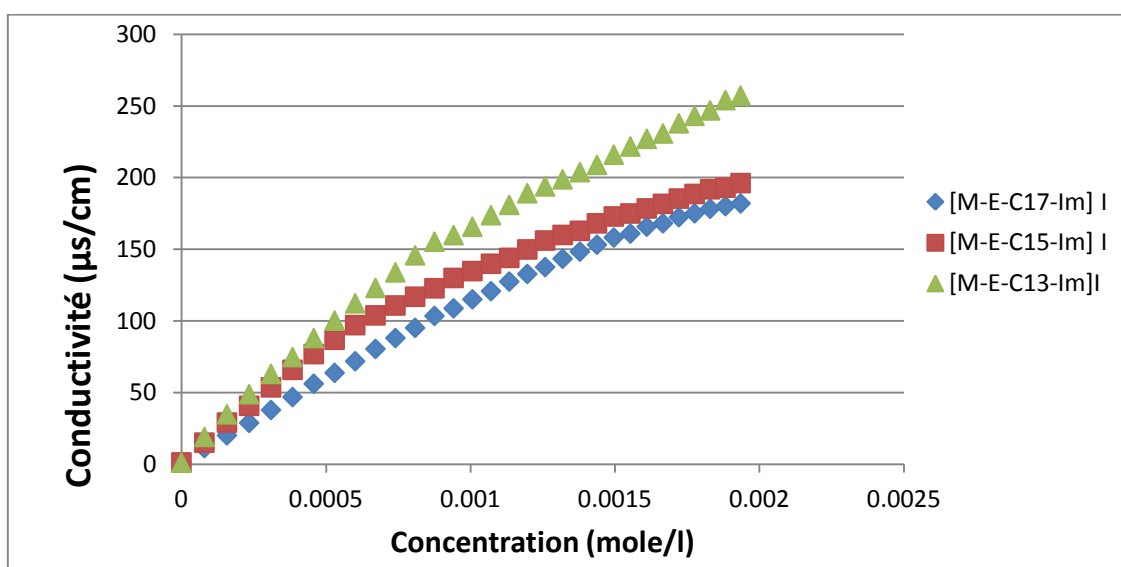
**Tableau 5.1** : Points de fusions des trois tensioactifs.

Tensioactif	Point de fusion (°C)	Point de fusion (°C)*
[M-E-C <sub>13</sub> -Im] I	69	70-71
[M-E-C <sub>15</sub> -Im] I	77	78-79
[M-E-C <sub>17</sub> -Im] I	84	84-85

\* Points de fusion reportés dans la littérature[150].

### 5.2.2.2. Détermination de la CMC

Pour déterminer la concentration micellaire critique des produits de synthèse, les variations des conductivités en fonction de la concentration molaire des trois tensioactifs ont été mesurées. Pour cela, une solution mère de concentration molaire égale à 4mM de chaque tensioactif a été préparée. On mesure la conductivité en faisant des ajouts de 1mL de la solution initiale dans 125 ml d'eau déminéralisée à la température ambiante. Ce qui nous permettra de tracer la courbe conductivité en fonction de la concentration pour les trois tensioactifs (Figure 5.4).



**Figure 5.4.** Variation de conductivité en fonction de la concentration des trois tensioactifs.

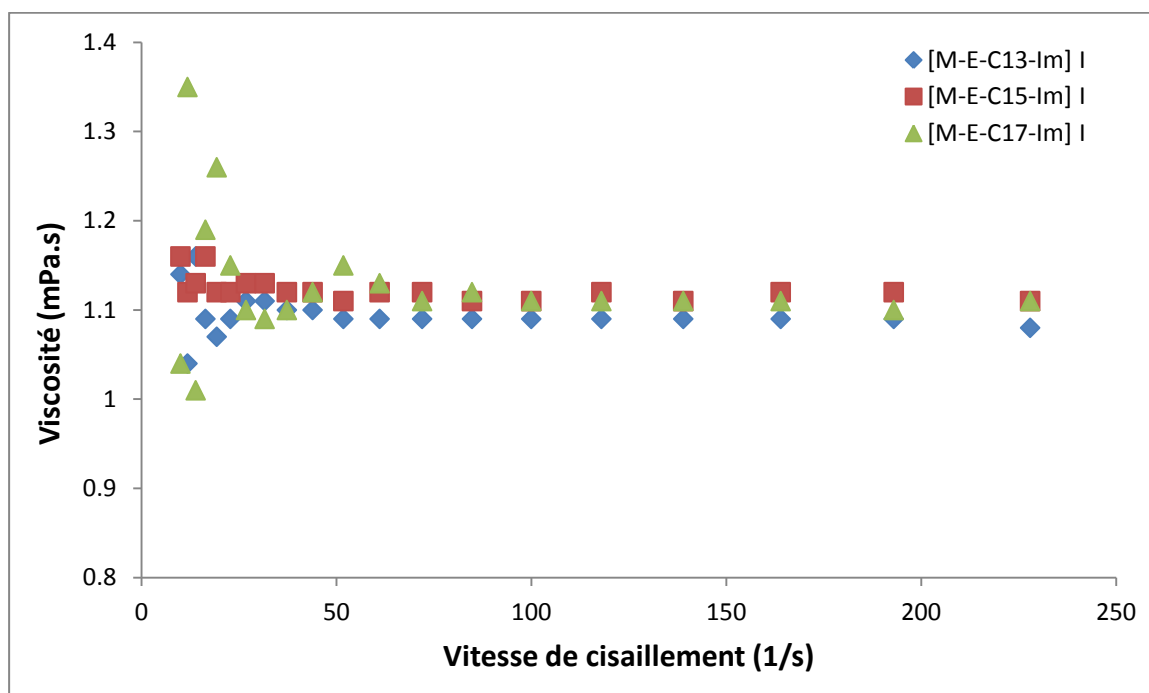
Pour les trois liquides ioniques, la conductivité croît avec la concentration jusqu'à l'atteinte d'un point correspondant au changement de pente de la courbe, ceci est vraisemblablement attribué à l'apparition de micelles qui se forment spontanément à partir d'une certaine concentration : la concentration micellaire critique (CMC). Les micelles gênent fortement les déplacements des charges dans la solution. Avant d'atteindre la CMC, les molécules sous forme de monomères de tensioactifs n'ont qu'une influence réduite sur la conductivité. La valeur de la CMC est déterminée en considérant l'abscisse du point d'intersection des deux tangentes des deux demi droites. Les valeurs des CMC pour les trois liquides ioniques sont listées dans sur le tableau 5.2.

**Tableau 5.2 :** Concentration micellaire critique des trois tensioactifs.

Tensioactif	CMC (mM)
[M-E-C <sub>13</sub> -Im] I	0,74
[M-E-C <sub>15</sub> -Im] I	0,80
[M-E-C <sub>17</sub> -Im] I	0,87

### 5.2.2.3. Mesure de viscosité

La viscosité d'un fluide représente la résistance à la déformation sous l'effet d'une contrainte de cisaillement. Pratiquement, on associe la viscosité au comportement d'un fluide ou à sa résistance à l'écoulement. La variation de la viscosité en fonction du taux de cisaillement pour les trois liquides ioniques à la concentration de 1 mM est représentée sur la figure 5.5. Une faible viscosité a été obtenue pour les trois liquides ioniques, variant entre 1 et 1,4 mPa.s, cette viscosité est comparable à celle de l'eau, ce qui facilitera les études antérieures d'écotoxicité.

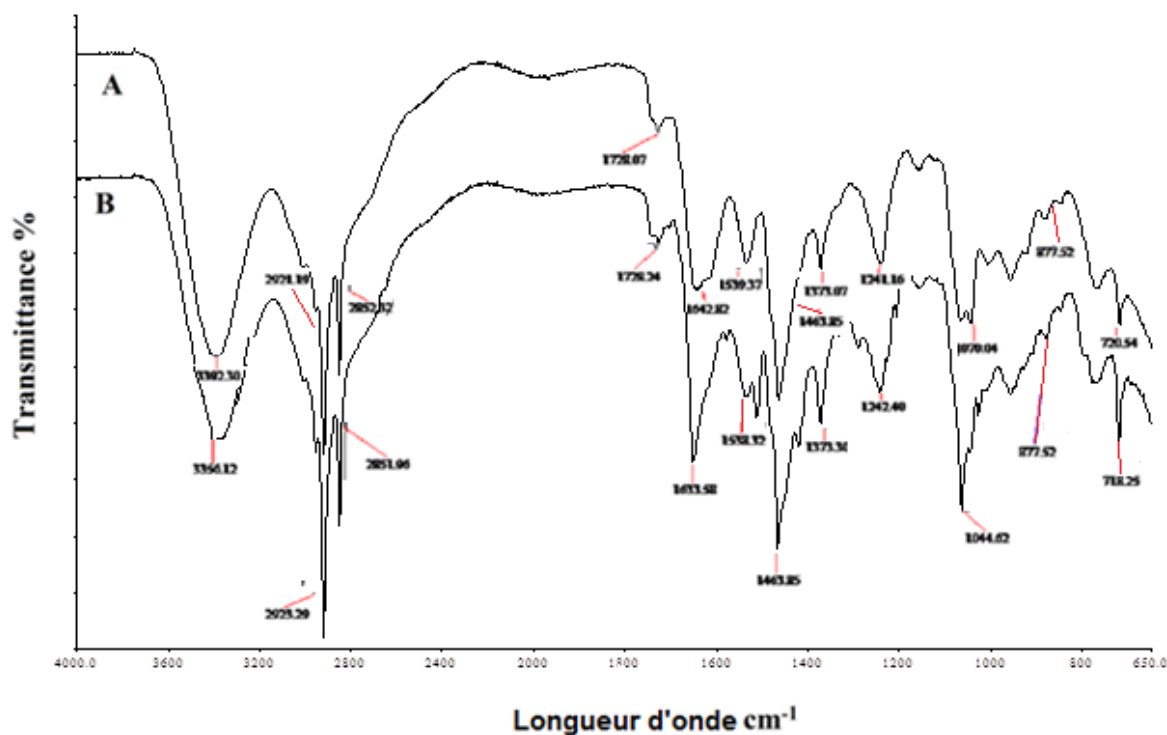


**Figure 5.5:** Variation de la viscosité en fonction du taux de cisaillement pour les trois liquides ioniques.

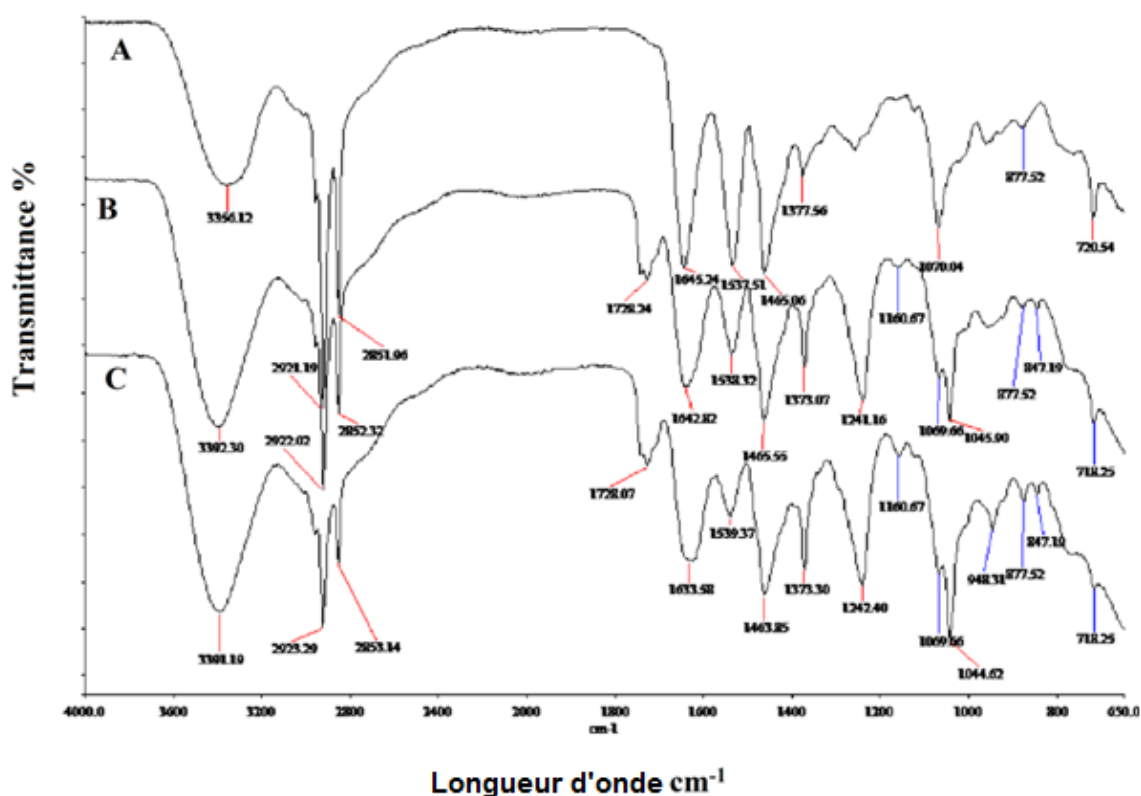
### 5.2.3. Caractérisation des produits de synthèse par méthodes spectrophotométriques

#### 5.2.3.1. Les analyses FT-IR

Les spectres IR des liquides ioniques synthétisés par la première méthode et par la deuxième méthode sont représentés respectivement sur les Figures 5.6 et 5.7. La présence de la bande  $2922\text{ cm}^{-1}$  correspond aux groupements  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2$ . La présence d'une bande forte à  $3392\text{ cm}^{-1}$  caractéristique au groupement OH. En outre, l'apparition d'une bande  $1642\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de la vibration d'élongation de la liaison (C=N). Notons également la présence de bande d'adsorption à  $1055\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques de la vibration d'élongation de la liaison (C-N) [149]. En comparant les spectres IR des liquides ioniques synthétisés par les deux méthodes, on constate que les spectres IR sont semblables.



**Figure 5.6 :** Spectres IR de (A) [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I et (B) [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I synthétisés par la première méthode.

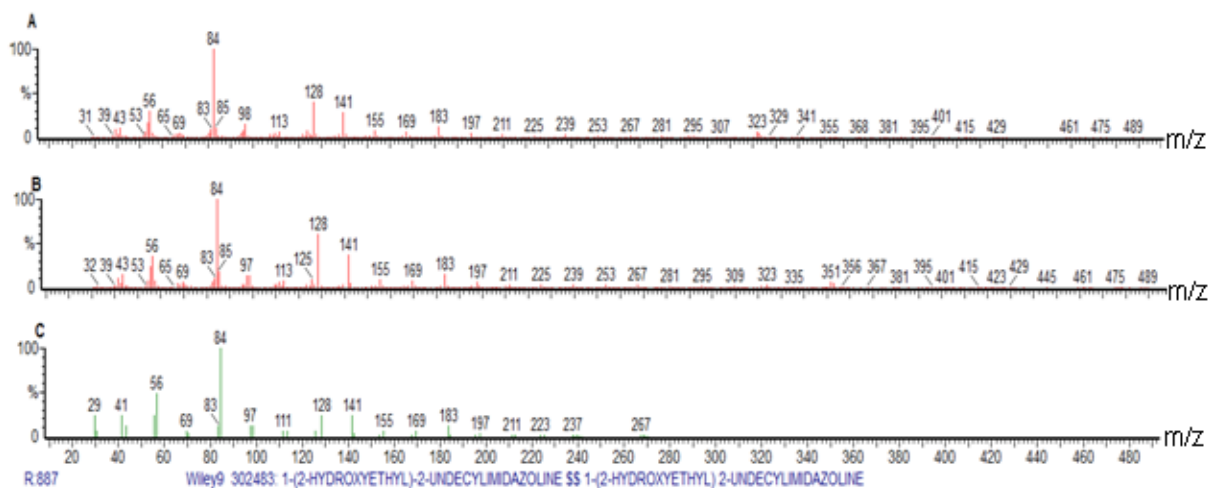


**Figure 5.7 :** Spectres IR de (A) [M-E-C<sub>13</sub>-Im] I, (B) [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I et (C) [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I synthétisés par la deuxième méthode.

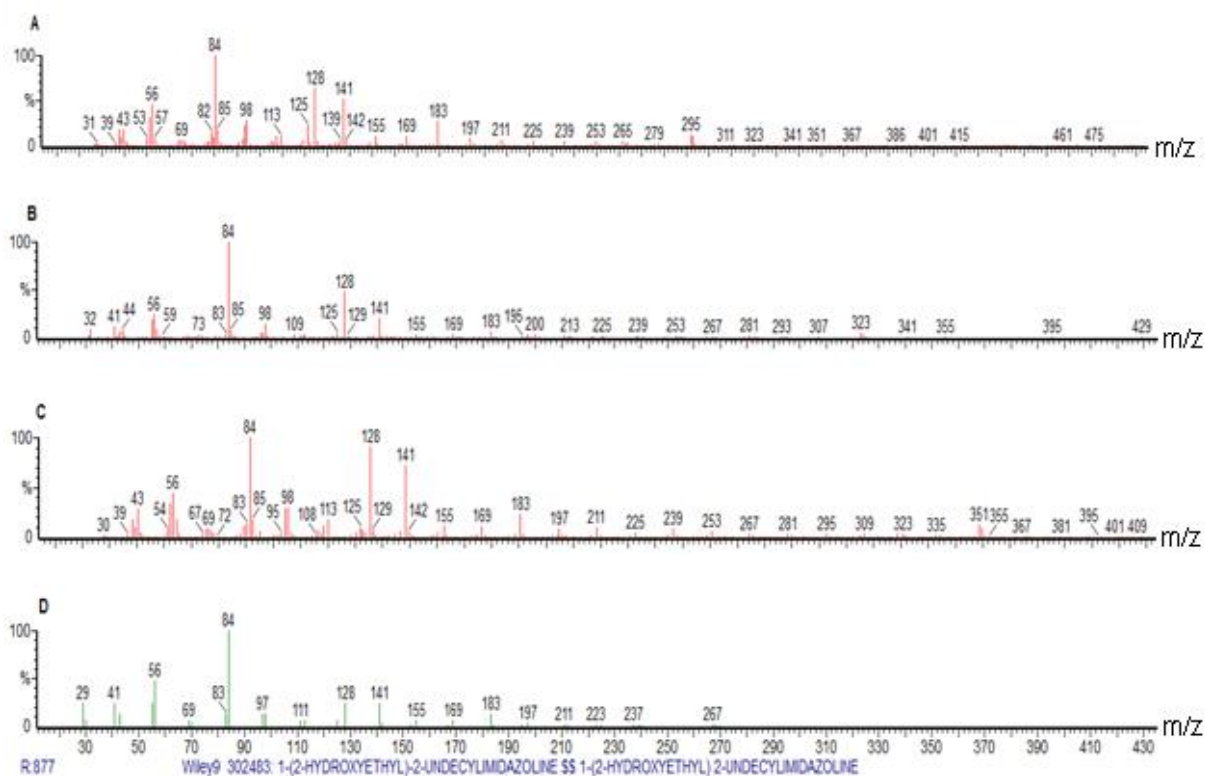
#### 5.2.3.2. Les analyses GCMS

Les spectres de masse des liquides ioniques synthétisés par la première méthode et par la deuxième méthode sont illustrés respectivement sur les Figures 5.8 et 5.9. L'identification des spectres est effectuée par comparaison au spectre de référence de la bibliothèque Nist Ms Search. L'examen des spectres de masse des liquides ioniques synthétisés par les deux méthodes permet de conclure que les liquides ioniques obtenu par les deux méthodes sont similaires.





**Figure 5.8 :** Spectres de masse de (A) [M-E-C<sub>13</sub>-Im] I, (B) [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I synthétisés par la première méthode, comparés au (C) spectre de référence de la bibliothèque.

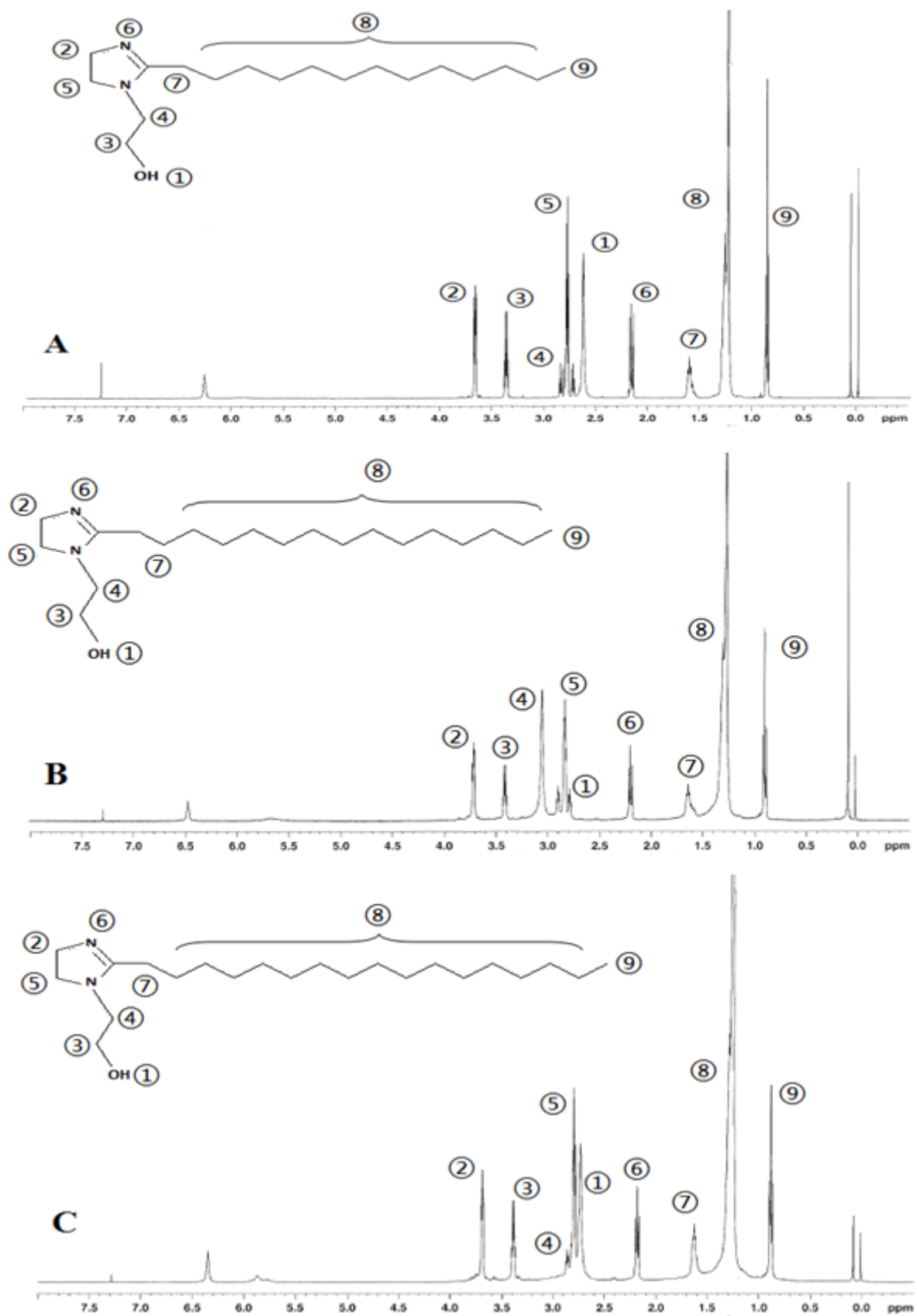


**Figure 5.9 :** Spectres de masse de (A) [M-E-C<sub>13</sub>-Im] I, (B) [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I et (C) [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I synthétisés par la deuxième méthode, comparés au (D) spectre de référence de la bibliothèque.

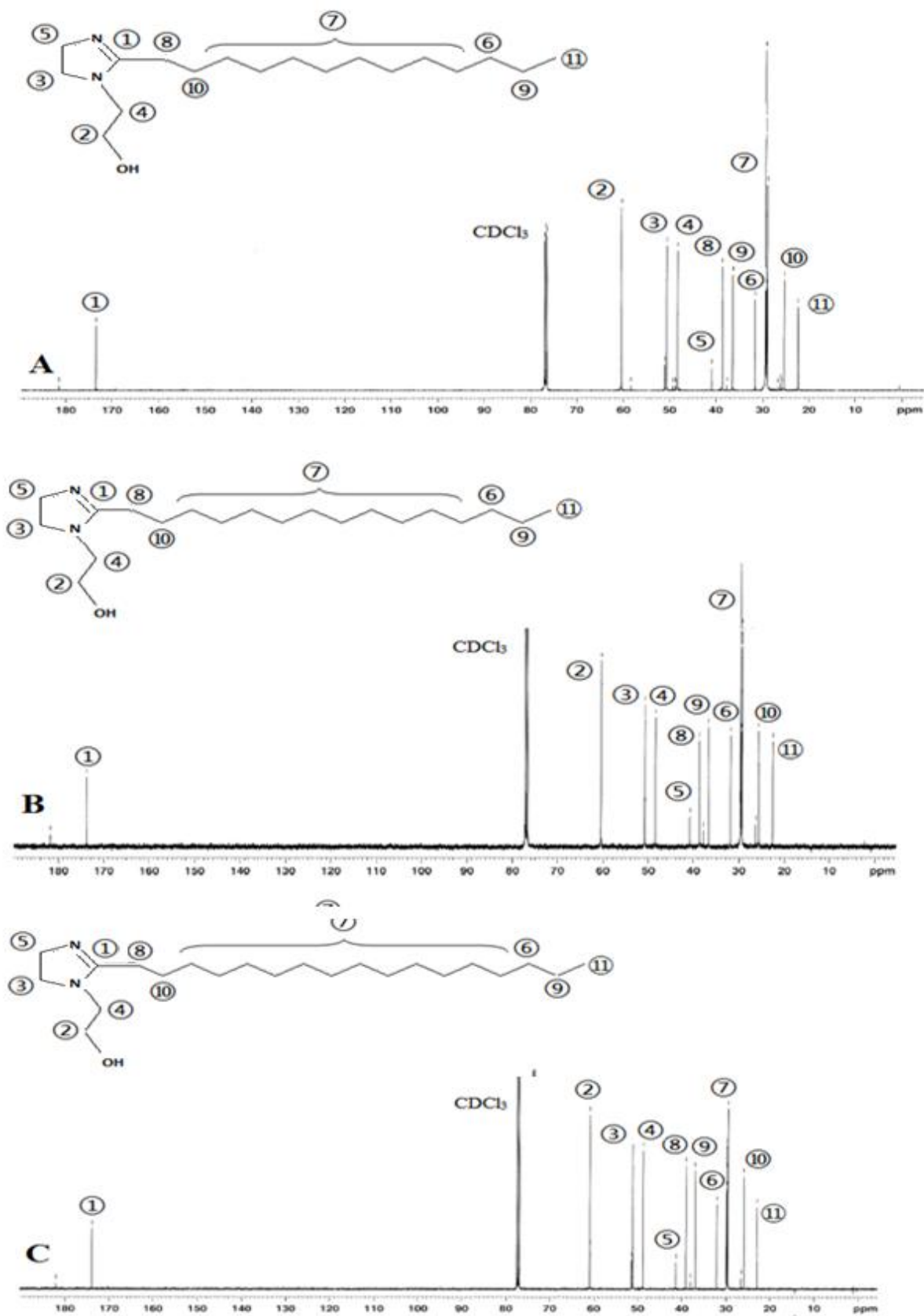
### 5.2.3.3. Les analyses RMN

La caractérisation par RMN  $^1\text{H}$  a donné les spectres représentés sur la figure 5.10. L'identification des pics est la suivante :  $\delta = 3,04$  ppm (t, 2H,  $-\text{C}=\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}-$ ),  $\delta = 3,38$  ppm (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{C}-\text{OH}$ ),  $\delta = 3,71$  ppm (t, 2H,  $-\text{C}=\text{N}-\text{CH}_2-$ ),  $\delta = 2,21$  ppm (t, 2H,  $-\text{N}=\text{C}-\text{CH}_2-$ ). Dans la figure 5.11 sont représentés les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  qui montrent la formation du pic  $\delta = 173,80$  ppm ( $-\text{N}=\text{C}-\text{N}-$ ) et le  $\delta = 60,48$  ppm ( $-\text{C}-\text{OH}$ ).

Une différence entre les trois spectres RMN  $^1\text{H}$  a été observée dans la zone 3 ppm, elle semble être due à la présence d'impuretés (traces de réactifs). Les pics caractéristiques de nos produits de réaction sont présents.



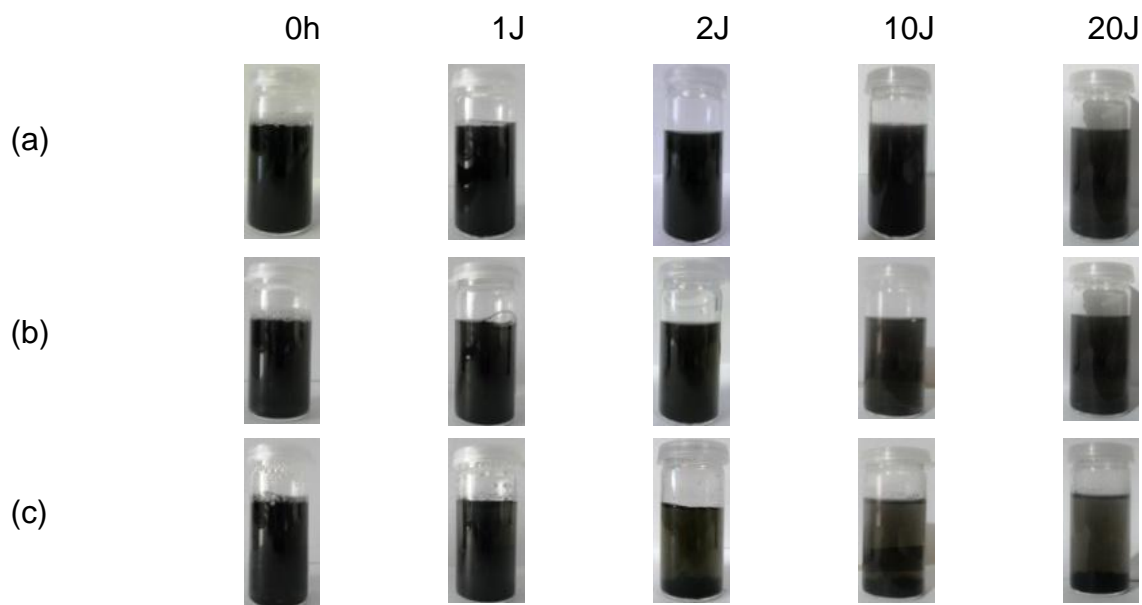
**Figure 5.10:** Spectres RMN<sup>1</sup>H de (A) [M-E-C<sub>13</sub>-Im] I, (B) [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I et (C) [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I



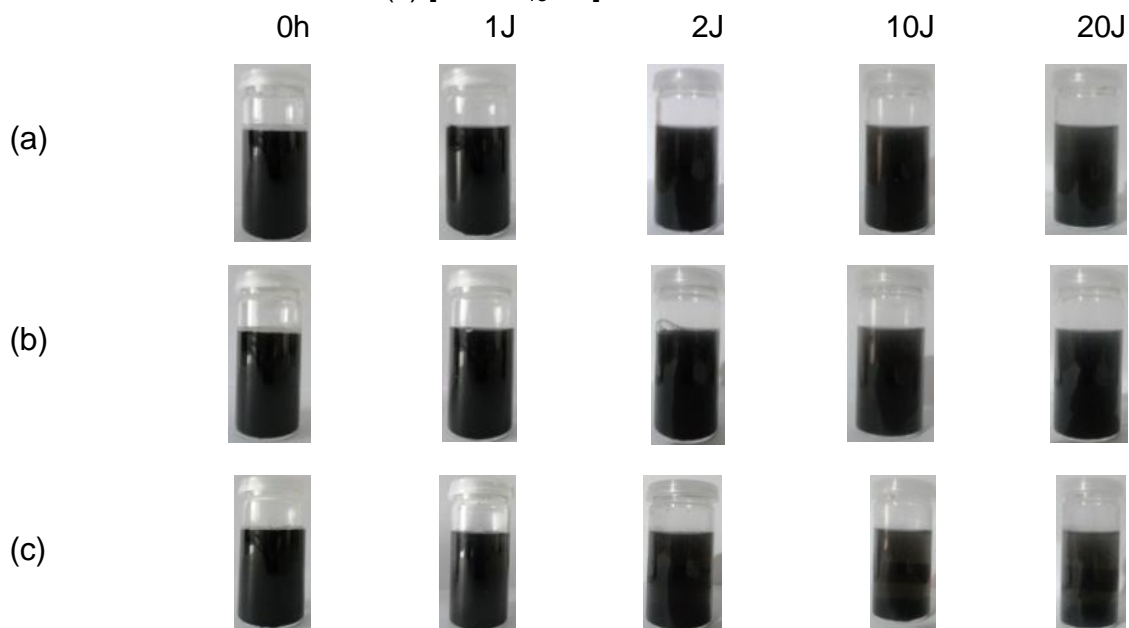
**Figure 5.11:** Spectres RMN $^{13}\text{C}$  de (A) [M-E-C<sub>13</sub>-Im] I, (B) [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I et (C) [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I.

### 5.3. Dispersion des nanotubes de carbone

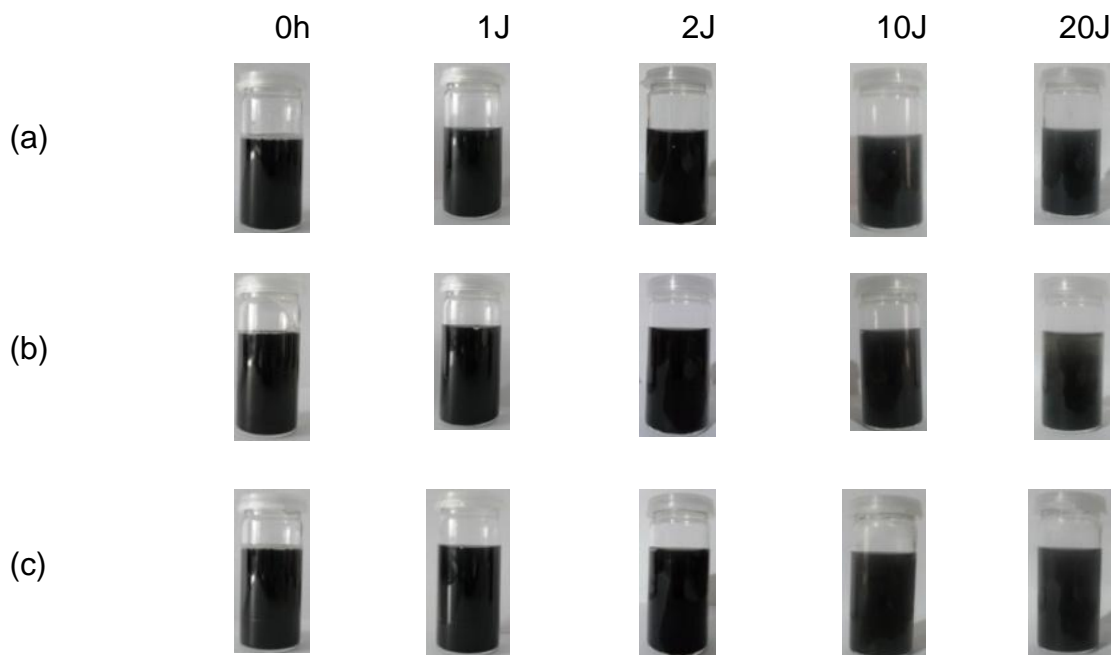
La stabilité des suspensions formulées a été suivie par des observations visuelles sous lumière intense pendant 20 jours. La sédimentation des dispersions de DWCNTs à 50mg/l, préparées avec les trois liquides ioniques synthétisés à des concentrations égales à 1, 1,5 et 10mM, est illustrée dans les figures 5.12, 5.13 et 5.14.



**Figure 5.12:** Illustrations de la sédimentation de la dispersion des DWCNTs à  $C= 50\text{mg/ml}$  par les liquides ioniques (a) [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I, (b) [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I et (c) [M-E-C<sub>13</sub>-Im] I à  $C= 1\text{ mM}$ .



**Figure 5.13:** Illustrations de la sédimentation de la dispersion des DWCNTs à  $C= 50\text{mg/ml}$  par les liquides ioniques (a) [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I, (b) [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I et (c) [M-E-C<sub>13</sub>-Im] I à  $C= 1,5\text{ mM}$ .



**Figure 5.14:** Illustrations de la sédimentation de la dispersion des DWCNTs à  $C= 50\text{mg/ml}$  par les liquides ioniques (a)  $[\text{M-E-C}_{17}\text{-Im}] \text{ I}$ , (b)  $[\text{M-E-C}_{15}\text{-Im}] \text{ I}$  et (c)  $[\text{M-E-C}_{13}\text{-Im}] \text{ I}$  à  $C= 10 \text{ mM}$ .

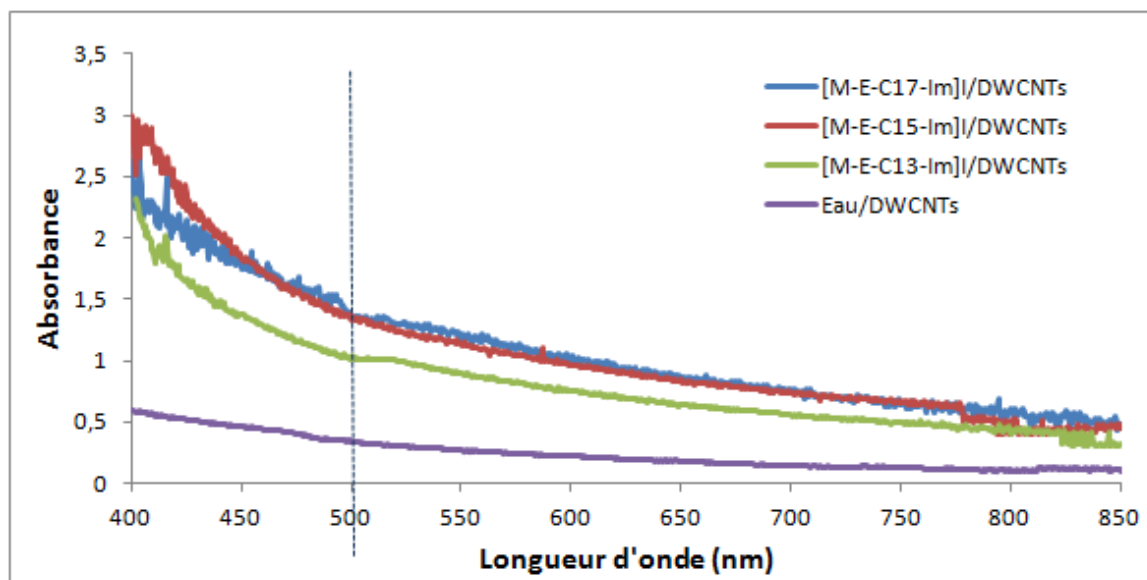
D'après les observations des suspensions, aux faibles concentrations (1 et 1,5 mM) la sédimentation des NTCs est constatée à partir du deuxième jour, pour les suspensions préparées avec les deux liquides ioniques ( $[\text{M-E-C}_{15}\text{-Im}] \text{ I}$  et  $[\text{M-E-C}_{13}\text{-Im}] \text{ I}$ ) et à partir du dixième jour pour la suspension préparée avec le liquide ionique  $[\text{M-E-C}_{17}\text{-Im}] \text{ I}$ . Cependant, à la concentration 10mM aucune sédimentation des NTCs n'a été observée.

#### 5.4. Caractérisation des dispersions de nanotubes de carbone

##### 5.4.1. Les analyses UV/Vis

La caractérisation des suspensions de DWCNTs a été réalisée par spectrophotométrie UV/Vis, les NTCs agglomérés ne sont pas actifs dans la région UV/Vis, seul les NTCs individualisés sont actifs dans cette région (400 à 900 nm), ce qui est expliqué par les singularités de Van Hove [9, 22]. La Figure 5.15 représente l'absorbance des suspensions de DWCNTs à la concentration égale à 50 mg/ml avec les trois liquides ioniques ( $[\text{M-E-C}_n\text{-Im}] \text{ I}$ ,  $n= 13, 15$  et 17) à la concentration égale à 10 mM ainsi que celle préparée dans l'eau désionisée.

Bien que nous n'ayons pas obtenu une bande d'absorbance maximale correspondant à l'absorbance des NTCs, l'effet de l'addition d'un agent tensioactif a été assez clair en termes d'augmentation de l'absorbance. Comme les liquides ioniques ne possèdent pas de bande d'absorption dans la gamme analysée, l'absorption obtenue ne peut être attribuée qu'à l'absorbance des NTCs.



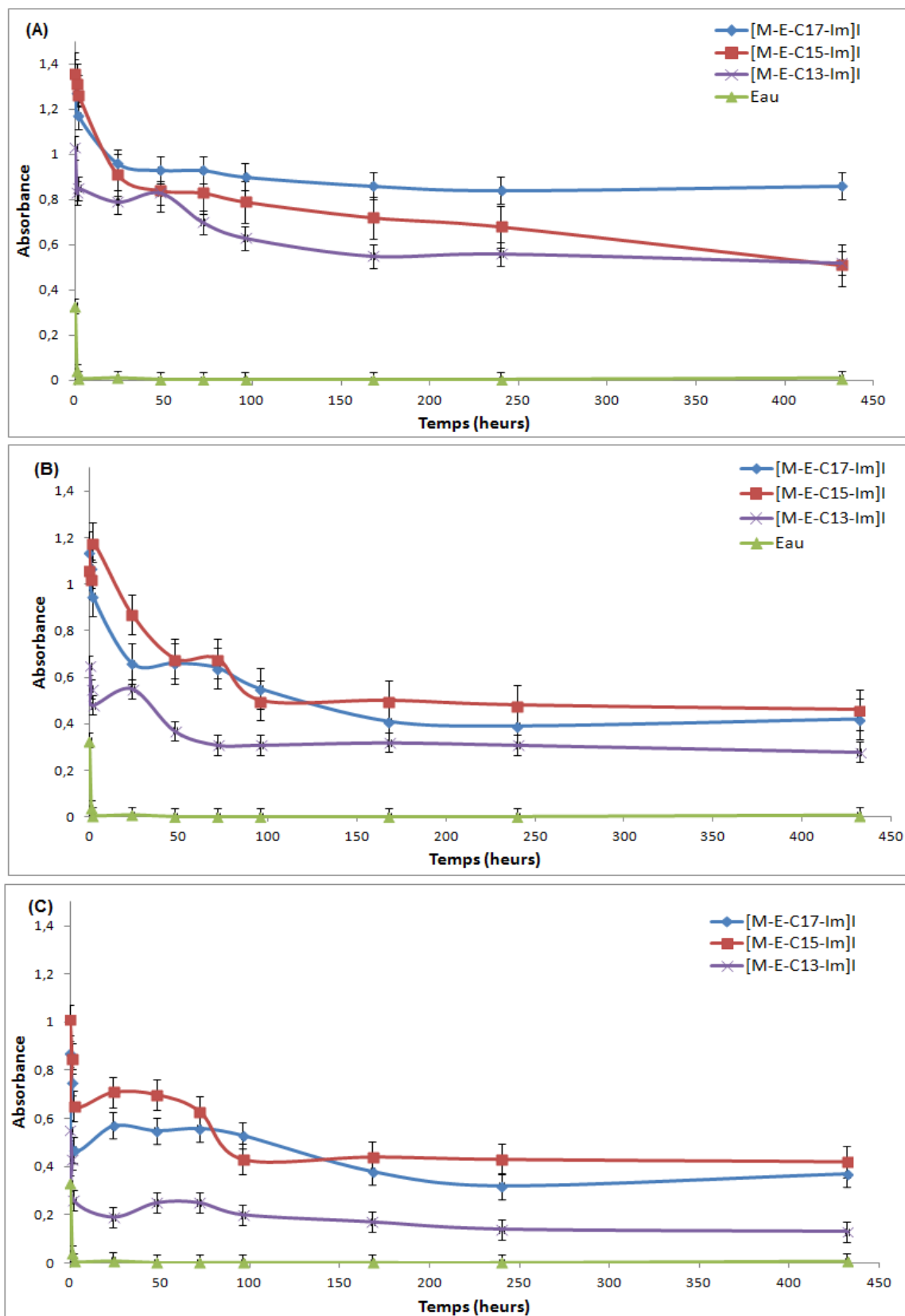
**Figure 5.15:** Spectres UV/Vis des suspensions de DWCNTs avec les liquides ioniques [M-E-C<sub>13</sub>-Im] I, [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I, [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I et avec l'eau.

Les courbes d'absorbance en fonction du temps (20 jours) pour les suspensions DWCNTs préparées avec les trois liquides ioniques à des concentrations molaires égales à 1, 1,5 et 10 mM sont représentées sur la figure 5.16. La mesure d'absorbance est fixée à 500 nm [19, 187].

Selon nos résultats, aux concentrations égales à 1 et 1,5 mM, nous avons obtenu une absorbance presque identique avec les deux liquides ioniques [ME-C<sub>15</sub>-Im] I et [ME-C<sub>17</sub>-Im] I. Les faibles concentrations (1 mM et 1,5 mM) sont juste au-dessus de la concentration micellaire critique des trois liquides ioniques (CMC égale à environ 0,8 mM, évaluée au paragraphe 5.3.2) et n'avons pas obtenu une bonne dispersion ni une bonne stabilité. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que la dispersion des nanotubes avec les amphiphiles est uniquement possible au-dessus de la limite de la CMC [116, 118]. Ainsi, le pouvoir de dispersion des liquides ioniques à proximité de la CMC a été faible comparé à la concentration de 10 mM (10 fois plus).

A la concentration 10 mM de liquide ionique, l'absorbance des suspensions augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne hydrophobe. La meilleure valeur d'absorbance a été obtenue avec le liquide ionique [ME-C<sub>17</sub>-Im] I. De même, l'absorption de la suspension préparée avec [ME-C<sub>15</sub>-Im] I est plus élevée que celle préparée avec [ME-C<sub>13</sub>-Im] I. Les trois liquides ioniques ont une structure homologue. La seule différence réside dans la longueur de la chaîne hydrocarbonée (C = 13, 15 et 17). L'augmentation de l'efficacité de la dispersion avec l'augmentation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée peut être expliquée par l'augmentation de l'interaction hydrophobe entre les chaînes hydrocarbonées des liquides ioniques et DWCNTs [22, 119] (en général, parce que les NTCs ont une surface très hydrophobe, les chaînes hydrocarbonées ont tendance à être fortement adsorbées [127, 188]). Une meilleure interface entre la chaîne hydrophobe et les nanotubes signifie une plus grande stabilité de l'adsorption et des échanges moins possibles avec le solvant environnant. Dans cette comparaison, il n'y a probablement pas de modification de l'encombrement stérique dû aux légères différences en termes de nombre d'atomes de carbone dans la chaîne alkyle. En tenant compte du fait que la charge provient exactement du même groupe chimique dans la série de liquides ioniques, la répulsion électrostatique ne devrait pas être différente. Si la différence de longueur de chaîne a été suffisante pour conduire à des taux de couverture différents sur les nanotubes, ceci devrait finalement conduire à un nombre différent de charges, ce qui serait en faveur du liquide ionique avec la chaîne alkyle la plus courte (C<sub>13</sub>). Par conséquent, nous supposons que le paramètre clé est la stabilité de l'interaction entre le liquide ionique adsorbé et les nanotubes.





**Figure 5.16 :** Cinétique d'absorbance UV/Vis des suspension de DWCNTs avec les liquides ioniques [M-E-C<sub>13</sub>-Im] I, [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I, (C)[M-E-C<sub>17</sub>-Im] I et avec l'eau à (A) C= 10mM, (B) C= 1,5mM et (C) C= 1mM.

#### 5.4.2. Les analyses par Zétamétrie

La mesure du potentiel Zêta est importante pour expliquer la stabilité des particules colloïdales en suspension aqueuse [25, 121]. La distribution du potentiel Zêta des suspensions de DWCNTs avec les trois liquides ioniques à la concentration molaire égale à 1mM a été mesurée. Nous avons obtenu des valeurs de Potentiel Zêta supérieures à 40mV. D'après Dong et al., les particules qui ont un Potentiel Zêta supérieur à 15mV en valeur absolue sont considérés comme stabilisés par des interactions de répulsion électrostatique[174]. Une forte valeur positive du potentiel Zêta indique une forte adsorption du liquide ionique sur la surface des DWCNTs, ce qui conduit à des suspensions stables en raison de la force de Coulomb entre les nanotubes de carbone [22]. Par conséquent, une grande stabilité des suspensions des DWCNTs a été mise en évidence. Le tableau 5.3 illustre les valeurs de Potentiel Zêta des suspensions de DWCNTs avec les trois liquides ioniques. La plus grande valeur de potentiel Zêta est obtenue avec la suspension de DWCNTs préparée avec le liquide ionique [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I, même si elle est assez similaire à la valeur obtenue pour [ME-C<sub>17</sub>-Im] I. Ces valeurs sont toutefois nettement plus élevées que le potentiel Zêta mesuré pour la suspension de DWCNTs préparée avec le liquide ionique [ME-C<sub>13</sub>-Im] I dans les mêmes conditions expérimentales.

**Tableau 5.3 : Potentiel Zêta des suspensions de DWCNTs avec les liquides ioniques (1mM).**

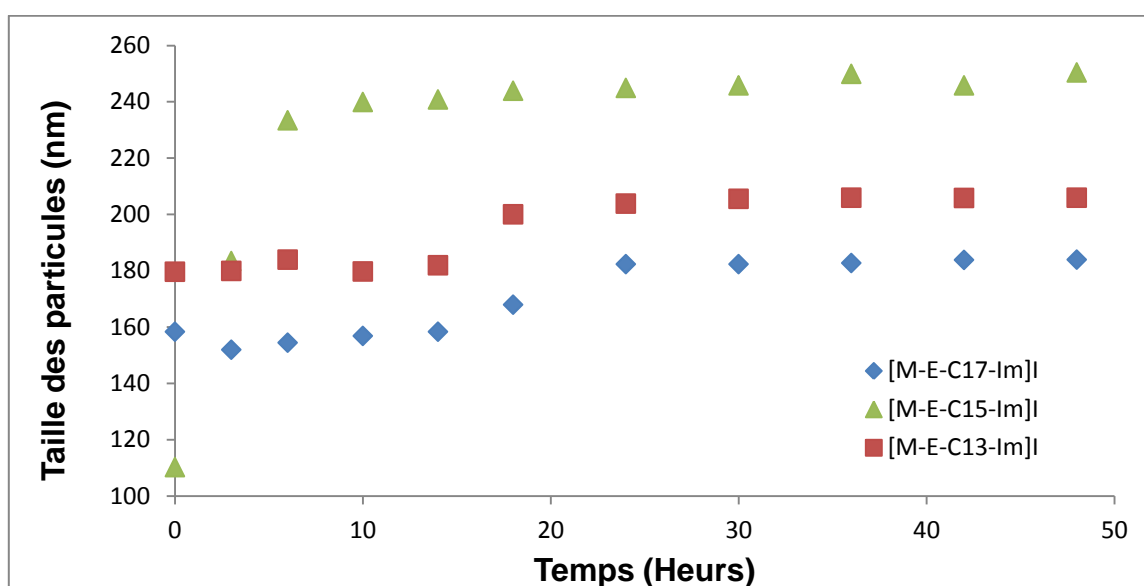
suspensions DWCNTs avec le liquide ionique	Zêta potential (mV)
[M-E-C <sub>17</sub> -Im] I	60,6
[M-E-C <sub>15</sub> -Im] I	66,0
[M-E-C <sub>13</sub> -Im] I	45,0

#### 5.4.3. Les analyses de granulométrie

Afin de mettre en évidence la stabilité au cours du temps des DWCNTs mis en suspension, des mesures de taille de colloïdes dispersés ont été réalisées par la technique de Diffusion Dynamique de la Lumière DLS. Dans ce but, des suspensions de nanotubes de carbone ont été préparés avec les trois liquides ioniques à 1 mM en tant que stabilisants. Les dimensions ont été mesurées pendant 48 heures à des intervalles de temps réguliers (figure 5.17).

Les mesures de granulométrie des suspensions de DWCNTs avec les trois liquides ioniques montrent clairement que les NTCs sont sous forme de très petits agglomérats, d'un diamètre moyen variant entre 150 et 250 nm avec une distribution granulométrique de type monomodal avec un indice de polydispersité de 0,068, la valeur de cet indice renseigne sur un système monodispersé.

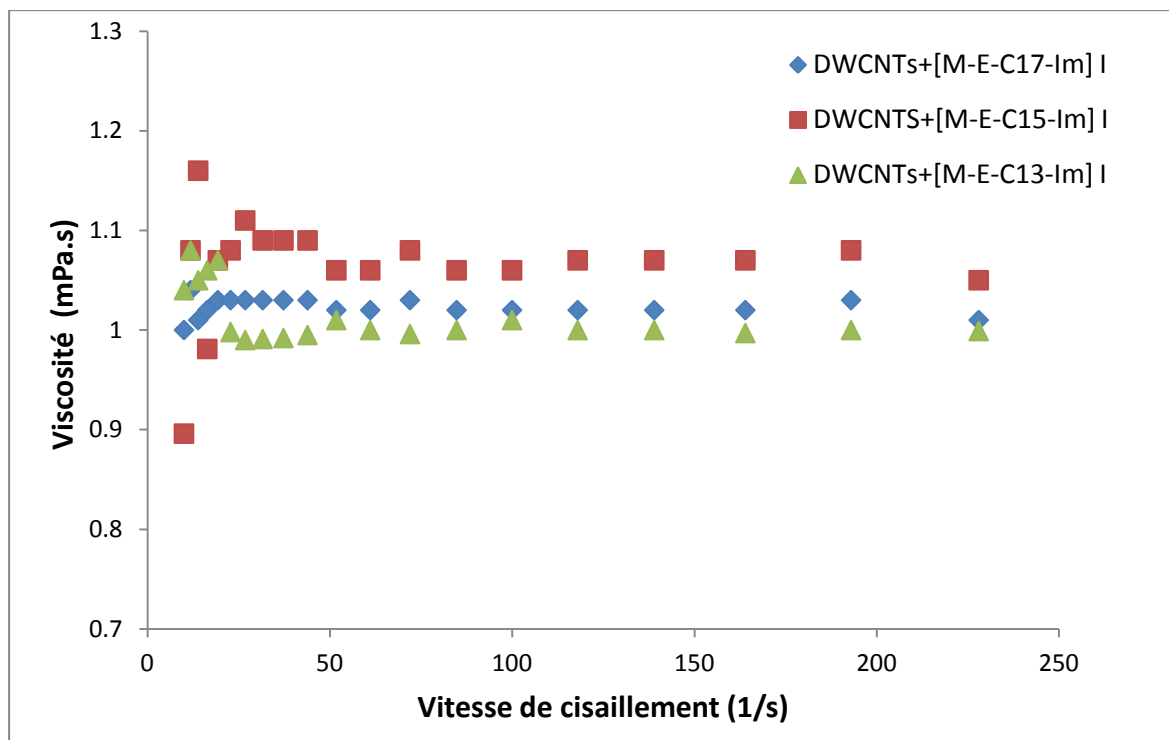
La taille des agglomérats dans les suspensions de DWCNTs est pratiquement stable au cours des 48 heures de mesure, et en particulier après 20 heures, qui confirme la stabilité des suspensions pendant 48 heures.



**Figure 5.17 :** Granulométrie des suspensions de DWCNTs à 50mg/l avec les trois liquides ioniques à la concentration égale à 1mM.

#### 5.4.4. Les analyses par rhéomètre

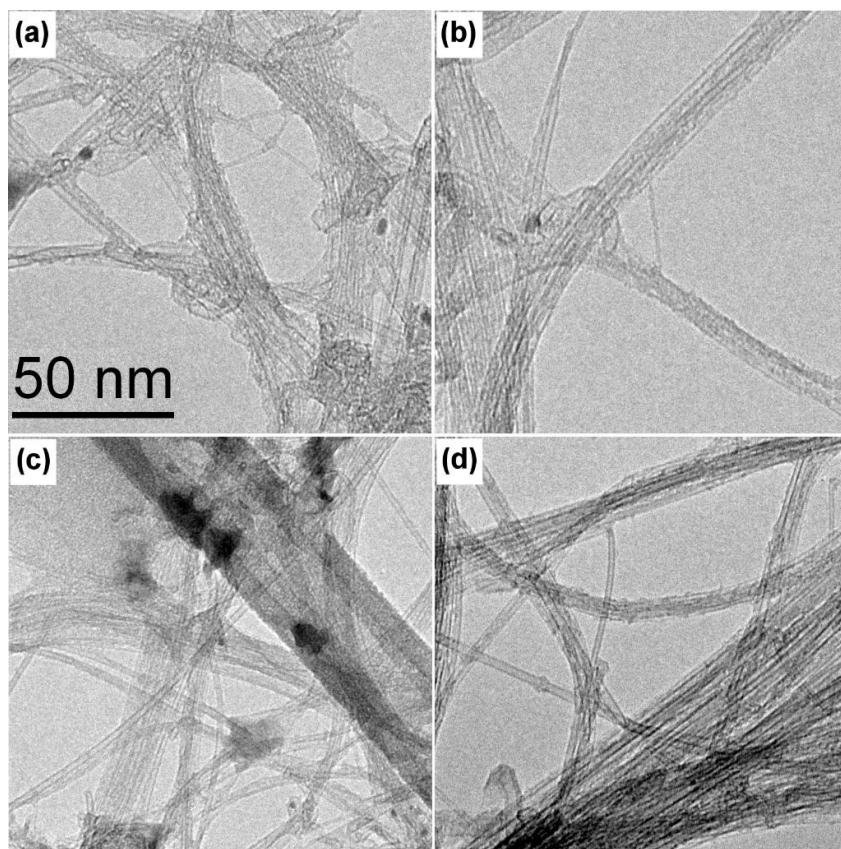
La variation de la viscosité en fonction du taux de cisaillement des suspensions de DWCNTs à 50mg/l avec les trois liquides ioniques à la concentration de 1 mM est représentée sur la figure 5.18. Nous avons observé une viscosité faible des suspensions de DWCNTs avec les trois tensioactifs, qui varie entre 0,9 et 1,2 mPa.s, cette faible viscosité peut être expliquée par une meilleure répulsion de charge entre les groupements hydrophobes (les grandes chaînes hydrocarbonées) orientés vers les NTCs alors que les têtes hydrophiles se dirigent vers la phase aqueuse et qui empêchent l'agglomération des NTCs [14, 189, 190].



**Figure 5.18** : Variation de la viscosité en fonction du taux de cisaillement des suspensions DWCNTs avec les trois liquides ioniques.

#### 5.4.5. Microscope électronique à transmission

Les images au microscope électronique à transmission (JEOL 1400) des suspensions DWCNTs à 50 mg/l préparées avec les trois liquides ioniques à la concentration de 1mM, ainsi que celles préparées avec de l'eau désionisée, sont présentées sur la figure 5.19. Ces images montrent que les trois échantillons de DWCNTs stabilisés par les liquides ioniques forment des faisceaux plus petits par rapport aux DWCNTs dans l'eau désionisée. Par conséquent, l'utilisation de liquides ioniques diminue l'agglomération des DWCNTs. Cependant, il est important de noter que les observations au MET ont été effectuées après séchage des échantillons sur les grilles de MET, donc probablement les images ne montrent pas la situation réelle dans les suspensions en présence de liquide (agglomération après séchage lors de la préparation de l'échantillon).



**Figure.5.19** : Images MET des suspensions de DWCNTs à 50 mg/l avec les liquides ioniques à 1 mM (a) [M-E-C<sub>13</sub>-Im] I, (b) [M-E-C<sub>15</sub>-Im] I, (c)[M-E-C<sub>17</sub>-Im] I et (d) avec l'eau désionisée.

## 5.5. Etude de toxicité orale aiguë du liquide ionique

### 5.5.1. Conditions d'essai

Les souris utilisées (trois souris dans chaque étape) sont hébergées dans des cages de taille moyenne, en plastique couvertes d'une grille en acier inoxydable, la température est réglée entre 18,5 et 21°C, le taux d'humidité est de 48% à 54%.

L'alimentation est un mélange de céréales formulé sous forme de petits bouchons avec une quantité de 5g/ souris/ jour et de l'eau du robinet [177]. La description de la cage et l'alimentation utilisées, est donnée en appendice D.

La solubilisation de la substance d'essai (liquide ionique [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I) est effectuée dans l'eau physiologique pour la réalisation des tests de toxicité. La solution du liquide ionique est administrée en une seule dose en utilisant une sonde gastrique, avec un volume égal à 1ml.

Le volume utilisé est supérieur au volume exigé par l'OCDE (2ml/100g de poids d'animal)[177] a cause de la viscosité du liquide ionique, mais le volume utilisé reste sans conséquence apparentes.

Après la période de jeune (4 heures), les souris sont marquées sur leurs queues et pesées individuellement, leurs poids sont notés puis la suspension de liquide ionique est administrée en utilisant la sonde gastrique. En absence des informations sur la dose initiale de la substance d'essai, la dose initiale qui est recommandée pour des raisons liées au bien-être des animaux est 300 mg/kg[177]. Les photos illustrant le protocole de l'étude de toxicité in vivo sont représentées en annexe 3. Après l'administration de la suspension, les souris sont privées de nourriture, pendant 2 heures [177].

#### 5.5.2. Résultats

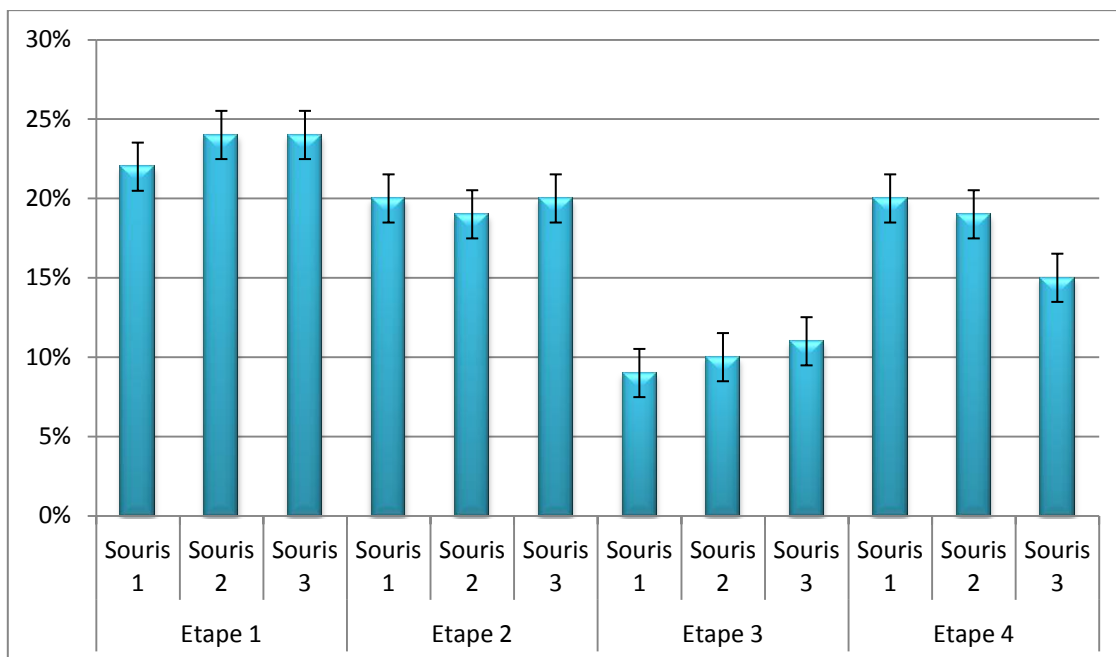
Le mode opératoire décrit dans la ligne directrice de l'OCDE 423 est suivi, la dose initiale qui est préconisée est de 300 mg/kg [177]. Le test de toxicité effectué a comporté quatre étapes ; la première est à 300mg/kg, aucune mortalité n'a été observée. Nous sommes passés à une deuxième avec la même concentration à 300mg/kg. Lors de la deuxième étape aucune mortalité n'a été observée donc nous avons entamé une troisième à 2000mg/kg. A la suite des résultats de la troisième étape (aucune mortalité), nous avons terminé par une quatrième avec la même concentration à 2000mg/kg. La figure 4.3 illustre les différentes étapes suivies. Les trois souris de chaque étape sont hébergées dans une cage, la photo représente les quatre cages étiquetées pour différencier entre elles, est en appendice D. Les poids corporels avec les changements du poids de chaque étape sont résumés dans le tableau 5.4.

**Tableau 5.4 :** Poids corporel des souris et les changements du poids de chaque étape.

	Souris	Poids à J0 en g	Poids à J7 en g	Poids à J14 en g	Variation du poids
1 <sup>ère</sup> étape 300mg/kg	Souris 1	22.9	24.8	28.5	22%
	Souris 2	22.5	23.6	28.6	24%
	Souris 3	22.5	26.4	28.8	24%
2 <sup>ème</sup> étape 300mg/kg	Souris 1	21.7	24.9	26.6	20%
	Souris 2	16.5	18.4	20.0	19%
	Souris 3	19.7	21.5	24.2	20%
3 <sup>ème</sup> étape 2000mg/kg	Souris 1	24.0	25.8	26.3	9%
	Souris 2	21.5	24.0	24.2	10%
	Souris 3	16.4	17.8	18.3	11%
4 <sup>ème</sup> étape 2000mg/kg	Souris 1	21.4	23.9	26.4	20%
	Souris 2	21	22.8	25.4	19%
	Souris 3	21.8	23.2	25.4	15%

Dans les groupes de souris traités par le liquide ionique avec les doses de 300 à 2000 mg/kg de poids corporel, aucune mortalité, ni signe et symptôme toxique n'a été observé. Les animaux n'ont pas montré de changement par rapport à l'aspect général au cours de la période d'observation (14 jours).

La variation de poids corporel des souris a montré une augmentation qui varie entre 9 et 24%. La figure 5.20 illustre la variation du poids corporel des souris.



**Figure 5.20** : Variation du poids corporel des souris.

### 5.5.3. Discutions

La présente étude de toxicité orale aiguë du liquide ionique a montré que lors de la période d'observation fixée à 14 jours, aucun symptôme de toxicité n'est observé, aucun changement de comportement ou de mortalité chez les souris traitées jusqu'à la dose de 2000 mg/kg. L'augmentation de poids est une augmentation physiologique qui ne témoigne pas de signes de toxicité. D'après la ligne directrice 423 la substance étudiée est classée dans la catégorie 5 [177, 178]. L'examen microscopique des organes n'est pas réalisé car notre but était de pouvoir classer la toxicité du tensioactif étudié.

Par conséquent, le liquide ioniques [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I peut être considéré comme étant une molécule non toxique car il n'a causé ni mortalité ni incidence défavorable lors du test de toxicité orale aiguë à un niveau allant jusqu'à la dose de 2000 mg / kg par poids corporel [177, 178].



## 5.6. Etude d'écotoxicité des DWCNTs

L'étude d'écotoxicité des DWCNTs est réalisée en utilisant la bactérie *Vibrio fischeri* comme model biologique.

### 5.6.1. Conditions d'essai

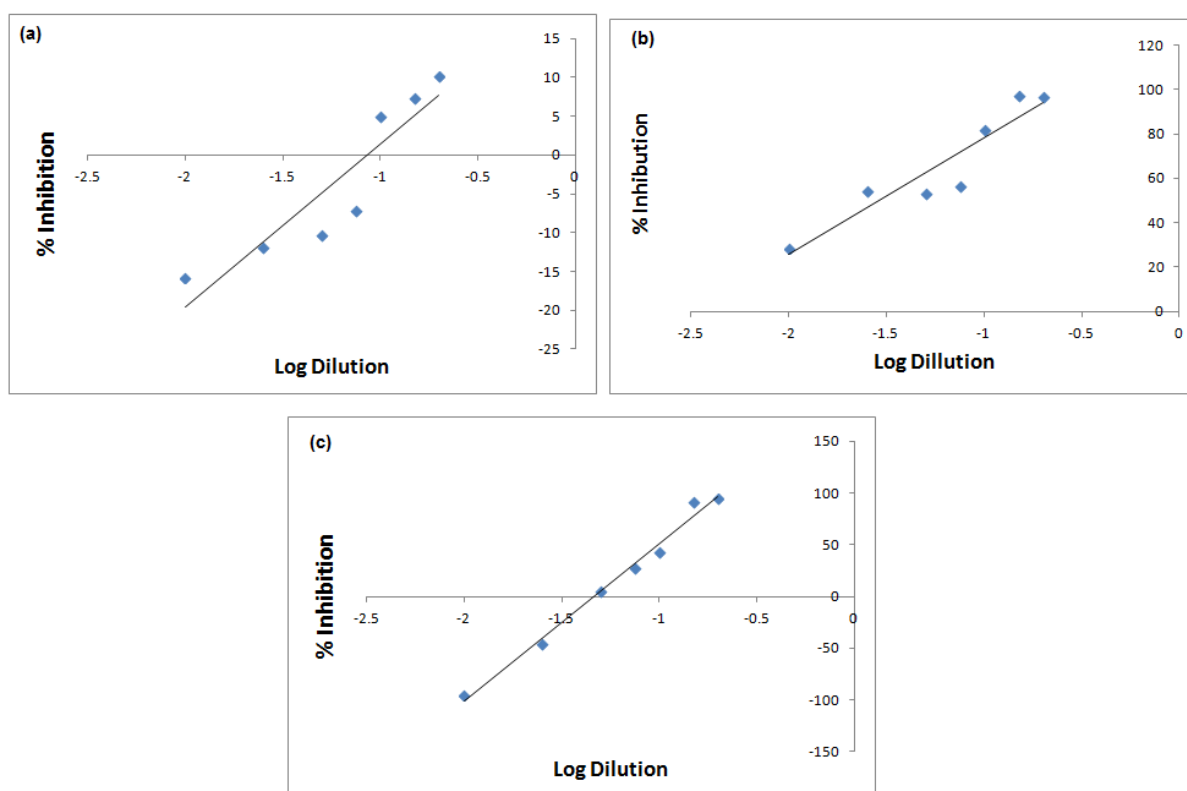
Pour tester la toxicité aiguë du liquide ionique [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I, des DWCNTs et des suspensions de DWCNTs avec le liquide ionique [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I, nous avons préparé des dilutions des solutions mères de concentration égale à 50mg/l, Cette concentrations est en effet considérée comme plus représentative d'une éventuelle contamination environnementale [109]. Les dilutions des solutions à analysés sont préparées en suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 4.7.2.1. Les solutions sont analysées par le luminomètre (appareil qui mesure l'intensité de la lumière émise par la bactérie), après 30 min d'incubation.

### 5.6.2. Résultats et discussions

Les résultats de mesure de la bioluminescence des solutions testées, a permis de tracer le pourcentage d'inhibition de la bioluminescence en fonction de Log de la dilution, en suite de déterminer la CE50 du liquide ionique [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I, DWCNTs et des suspensions de DWCNTs avec le liquide ionique (figure 5.21).

Les résultats de l'étude de toxicité aiguë par le test d'inhibition de la bioluminescence de bactérie *Vibrio fischeri* des DWCNTs ont révélé qu'aucune toxicité n'est apparue jusqu'à la concentration de 50mg/l, par contre la CE50 des suspensions de liquides ioniques avec les DWCNTs est égale à 10mg/l. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les DWCNTs seuls dans l'eau sédimentent rapidement (moins de 30min, temps nécessaire pour l'essai), ce qui pourrait influencer sur la biodisponibilité des DWCNTs pour les bactéries, ou tout au moins sur leur capacité d'interaction avec les systèmes biologiques à l'échelle nanométrique. Cependant, dans l'autre cas des DWCNTs dispersés dans l'eau du fait de l'effet de l'ajout du liquide ionique, les bactéries se retrouvent en suspension avec les DWCNTs, ce qui a engendré une toxicité avec une CE50 égale à 10mg/l. Pour éliminer la toxicité du liquide ionique, le blanc du test des suspensions de DWCNTs avec le LI, est préparé avec une solution de LI.

En effet, l'étude du comportement et le devenir des NTCs dans les milieux aquatiques et l'analyse de leurs effets potentiels sur les organismes clés (par exemple, les bactéries) est également crucial pour évaluer l'impact de ces nanomatériaux dans le fonctionnement des écosystèmes et prendre des décisions pour préserver leur intégrité écologique. La plupart des études qui ont été effectués sur les écosystèmes ont souligné un ensemble d'effets de dommages (réduction de la croissance, inhibition de l'activité et altération du comportement) sur plusieurs espèces de bactéries [9, 91-93, 191].



**Figure 5.21 :** Variation du pourcentage d'inhibition de la bioluminescence en fonction de Log de la dilution (a) de DWCNTs, (b) du liquide ionique et (c) de la suspension de DWCNTs avec le liquide ionique.

## CONCLUSION GENERALE

Dans la première partie de ces travaux, deux méthodes de synthèse des liquides ioniques ont été présentées. D'après la caractérisation des liquides ioniques synthétisés par les méthodes physico-chimiques (détermination de point de fusion, la CMC et mesures de viscosité) et par les méthodes spectroscopiques (FT-IR, GCMS, RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$ ), les liquides ioniques synthétisés par les deux méthodes sont similaires. L'avantage de la deuxième méthode par rapport à la première consiste dans le temps et la consommation des réactifs, puisque la deuxième a moins d'étapes (élimination de l'étape de synthèse du dérivé chloré d'acide gras).

La deuxième partie consiste en la mise en suspension des DWCNTs par les liquides ioniques à base d'imidazolium : Iodure de 2-alkyl-1- (2-hydroxyéthyl)-1-méthylimidazolium ([M-E-C<sub>n</sub>-Im] I, n = 13, 15 et 17). Les liquides ioniques ont donné une mise en suspension efficace des nanotubes de carbone dans l'eau, même à très faible concentration (1mM), pour une durée plus d'un mois. La qualité de la suspension a été mise en évidence par mesure de la densité optique, le potentiel Zêta, de la viscosité et de la taille des particules, ainsi que, par des images au microscope électronique à transmission.

Les résultats de ces analyses ont montré que nous avons obtenu des suspensions stables, et que nous avons réussi partiellement à défaire les faisceaux des DWCNTs. En comparant le pouvoir de dispersion des trois liquides ioniques, nous avons trouvé que le pouvoir de dispersion augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée, ce qui est expliqué par l'augmentation des interactions hydrophobes entre la chaîne hydrocarbonée et DWCNTs, conduisant à une plus forte adsorption de l'agent tensio-actif, et donc une meilleure stabilité dans le temps.

En outre, les suspensions de DWCNTs avec les liquides ioniques ont une viscosité semblable à celui de l'eau, qui convient à une utilisation dans la préparation des milieux biologiques, en utilisant des produits synthétisés à partir des produits naturels, peu coûteux, et qui convient pour l'étude de l'écotoxicité des nanotubes de carbone à double parois.

L'étude de toxicité *in vivo* du liquide ionique [M-E-C<sub>17</sub>-Im] I a été réalisée par le test de toxicité orale aiguë, selon la ligne directrice de l'OCDE 423. Le liquide ionique à base d'imidazolium peut être considéré comme étant une molécule non toxique car il n'a pas causé ni de mortalité ou une incidence défavorable lors du test de toxicité oral aiguë à un niveau allant jusqu'à la dose de 2000 mg / kg par poids corporel.

L'étude d'écotoxicité a été menée pour évaluer les risques potentiels des DWCNTs seuls ou mises en suspension par les liquides ioniques, sur les bactéries marines luminescentes *Vibrio fischeri*.

Lorsque les DWCNTs sont seuls dans l'eau, aucune toxicité n'a été mise en évidence jusqu'à une concentration égale à 50mg/l. En revanche en présence de liquide ionique les DWCNTs ont révélé une CE50 égale à 10mg/l.

Ces travaux constituent donc une étude préliminaire des effets biologiques des DWCNTs sur la bactérie *Vibrio fischeri*. Reste à se rapprocher des conditions réelles dans le milieu aquatique, pour pouvoir conclure sur l'effet toxique des DWCNTs sur le système aquatique.

Au terme de ce travail nous pensons qu'une méthode originale a été développée pour la mise en suspension de DWCNTs par des liquides ioniques synthétisés à partir de matière naturelle à savoir les acides gras, mais il reste difficile d'individualiser complètement les NTCs. Néanmoins, notre but était d'arriver à mettre en contact les NTCs avec le système biologique, pour pouvoir étudier leur toxicité aiguë.

L'étude de l'écotoxicité des NTC est un sujet nouveau. De nombreuses pistes d'investigation sont encore à explorer. Afin de mieux prévoir le risque écotoxicologique des NTCs, leurs introduction dans les écosystèmes, le type de liaison que ceux-ci peuvent faire avec les composantes du milieu (tensioactif) et comment ces interactions affectent les propriétés physicochimiques devront être évalués. Que ce soit par observation directe ou par des méthodes de dosage des NTCs, un effort doit être fait dans le futur pour tenter de localiser avec certitude les NTCs dans le système aquatique et de les quantifier.

## APPENDICE A : LISTE DES ABREVIATIONS

CCVD	: Catalytic Chemical Vapor Deposition, dépôt chimique en phase vapeur.
CE50	: concentration qui provoque un effet (immobilisation, inhibition) sur 50% de la population.
C <sub>n</sub> -C4-C <sub>n</sub> Im	: liquide ionique type gémeaux imdazolium.
CMC	: concentration micellaire critique.
CTAB	: Cetyl Triméthyl Ammonium Bromide.
D	: distance.
DLVO	: Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek.
DETA	: diéthylène triamine.
DL50	: dose létale médiane.
DLS	: <i>Dynamic Light Scattering</i> diffusion dynamique de la lumière.
DMS	: diméthyle sulfate.
DWCNT	: <i>Double Walled Carbon Nanotube</i> ; nanotube de carbone biparois.
FT IR	: spectrophotométrie infra rouge à transformée de Fourier.
GCMS	: chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
IBM	: <i>International Business Machines</i> ; Enterprise International des Machines.
IR	: Infrarouge.
ISO	: International Organization for Standardization.
J	: jour.
H	: heure.
LC50	: concentration qui provoque 50% de mortalité.
LI	: liquide ionique.
[M-E-C <sub>n</sub> -Im]	: Iodure-1-méthyle-(-1-éthanol) 2-alkyl-imidazoline
MET	: microscope électronique à transmission.
MWCNT	: <i>Multi Walled Carbon Nanotube</i> ; nanotube de carbone multiparois.
NTC	: nanotubes de carbone.
NEC	: <i>Nippon Electric Company</i>
OCDE	: Organisation de Coopération et de Développement Économiques.
P.C	: poids corporel.
PF <sub>6</sub>	: hexafluorophosphate.
r	: rayon.
RMN <sup>13</sup> C	: Résonance Magnétique Nucléaire carbon.

RMN  $^1\text{H}$  : Résonance Magnétique Nucléaire proton.  
SDBS : Dodecylbenzène Sulfate de Sodium.  
SDS : Dodecyl Sulfate de Sodium.  
SWCNT : *Single Wall Carbon Nanotube* ; nanotube de carbone monoparoï  
UV/Vis : ultra violet / visible.

.

## APPENDICE B : LISTE DES PRODUITS CHIMIQUES UTILISES

Les produits chimiques utilisés n'ont subi aucune purification, la liste des produits chimiques utilisés avec leurs fournisseurs sont mentionnés dans le tableau suivant :

Produits	Fournisseurs
Toluène	Merck
Ethanol	Merck
1-butanol	Merck
Ether de pétrole	Prolabo
Chlorure de sodium	Merck
Chlorure de potassium	Merck
Chlorure d'ammonium	Merck
di-Potassium hydrogénophosphate	Merck
Sulfate de Magnésium hepta hydraté	Merck
2-4(2-hydroxyéthyl) 1-piperazinyl éthansulfonique 1M, pH7	Merck
Tris (hydroxyméthyl) aminométhane chlorhydrate, 1M, pH 7,5	Merck
Extrait de levure	Institue Pasteur Algérie
Typotone	Institue Pasteur Algérie
Glycérol	Merck
Glucose	Merck

**APPENDICE C : ETUDE COMPARATIVE DES METHODES DE LA TOXICITE  
ORALE AIGUË**

<b>Méthode</b>	<b>Méthode classique</b>	<b>Dose prédéterminée</b>	<b>Classe de toxicité aiguë</b>	<b>L'ajustement des doses</b>
Classe OCDE	401	420	423	425
Procédure	Deux essais : essai d'orientation et essai principal	Deux essais : essai d'orientation et essai principal et chaque essai comporte plusieurs étapes	Un essai principal qui comporte plusieurs étapes	Un essai principal qui comporte plusieurs étapes
Doses utilisées	Les doses sont estimées dans l'essai d'orientation	Doses fixes 5, 50, 300 et 2000mg/kg	Doses fixes 5, 50, 300 et 2000mg/kg	Doses qui varient entre 1,75 et 5000mg/kg
Nombre d'animaux utilisés	Dizaine d'animaux pour chaque lot, 5 à 6 lots	1 pour l'essai d'orientation plus 5 pour l'essai principal	3 pour chaque étape	1 pour chaque étape
Observation	La mort	La mort et signes de toxicités	La mort et l'état moribond	La mort
Informations fournies par chaque méthode	Détermination de la DL50	Classement de la toxicité selon GHS	Classement de la toxicité selon GHS estimation de la DL50	Estimation de la valeur réelle de la DL50



## APPENDICE D : PROTOCOLE DE L'ETUDE DE TOXICITE IN VIVO



**Cage et l'alimentation utilisées pour l'étude de la toxicité aiguë orale.**



**Seringue remplie de la solution d'essai, munie d'une sonde gastrique.**



**Cages utilisées pour l'essai.**



**Etapes suivies pour l'administration de la substance d'essai.**

## REFERENCES

1. Iijima, S., *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature, 1991. **354**(6348): p. 56-58.
2. Basiuk, E.V., et al., *Solvent-free covalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes and nanodiamond with diamines: Looking for cross-linking effects*. Applied Surface Science, 2012. **259**(0): p. 465-476.
3. Kakade, B.A. and V.K. Pillai, *An efficient route towards the covalent functionalization of single walled carbon nanotubes*. Applied Surface Science, 2008. **254**(16): p. 4936-4943.
4. Xu, G., et al., *Covalent functionalization of multi-walled carbon nanotube surfaces by conjugated polyfluorenes*. Polymer, 2007. **48**(26): p. 7510-7515.
5. Hu, C., et al., *Noncovalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes with siloxane polyether copolymer*. Materials Letters, 2008. **62**(17-18): p. 2585-2588.
6. Zhang, A., et al., *Noncovalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes with amphiphilic polymers containing pyrene pendants*. Materials Letters, 2012. **67**(1): p. 283-285.
7. Vaisman, L., H.D. Wagner, and G. Marom, *The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes*. Advances in Colloid and Interface Science, 2006. **128-130**(0): p. 37-46.
8. Zhang, M., L. Su, and L. Mao, *Surfactant functionalization of carbon nanotubes (CNTs) for layer-by-layer assembling of CNT multi-layer films and fabrication of gold nanoparticle/CNT nanohybrid*. Carbon, 2006. **44**(2): p. 276-283.
9. Alpatova, A.L., et al., *Single-walled carbon nanotubes dispersed in aqueous media via non-covalent functionalization: Effect of dispersant on the stability, cytotoxicity, and epigenetic toxicity of nanotube suspensions*. Water Research, 2010. **44**(2): p. 505-520.
10. Tasis, D., et al., *Soluble carbon nanotubes*. Chemistry-a European Journal, 2003. **9**(17): p. 4001-4008.
11. Liu, L., et al., *Comparison of Covalently and Noncovalently Functionalized Carbon Nanotubes in Epoxy*. Macromolecular Rapid Communications, 2009. **30**(8): p. 627-632.
12. Wang, H., *Dispersing carbon nanotubes using surfactants*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2009. **14**(5): p. 364-371.
13. Bassiuk, M., et al., *Noncovalent functionalization of single-walled carbon nanotubes with porphyrins*. Applied Surface Science, 2013. **275**(0): p. 168-177.

14. Skender, A., A. Hadj-Ziane-Zafour, and E. Flahaut, *Chemical functionalization of Xanthan gum for the dispersion of double-walled carbon nanotubes in water*. Carbon, 2013. **62**(0): p. 149-156.
15. Sato, H. and M. Sano, *Characteristics of ultrasonic dispersion of carbon nanotubes aided by antifoam*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008. **322**(1–3): p. 103-107.
16. Schwyzer, I., et al., *Influence of the initial state of carbon nanotubes on their colloidal stability under natural conditions*. Environmental Pollution, 2011. **159**(6): p. 1641-1648.
17. Hu, C., C. Yang, and S. Hu, *Hydrophobic adsorption of surfactants on water-soluble carbon nanotubes: A simple approach to improve sensitivity and antifouling capacity of carbon nanotubes-based electrochemical sensors*. Electrochemistry Communications, 2007. **9**(1): p. 128-134.
18. Goh, P.S., et al., *Surfactant dispersed multi-walled carbon nanotube/polyetherimide nanocomposite membrane*. Solid State Sciences, 2010. **12**(12): p. 2155-2162.
19. Rastogi, R., et al., *Comparative study of carbon nanotube dispersion using surfactants*. Journal of Colloid and Interface Science, 2008. **328**(2): p. 421-428.
20. Ham, H.T., Y.S. Choi, and I.J. Chung, *An explanation of dispersion states of single-walled carbon nanotubes in solvents and aqueous surfactant solutions using solubility parameters*. Journal of Colloid and Interface Science, 2005. **286**(1): p. 216-223.
21. Madni, I., et al., *Mixed surfactant system for stable suspension of multiwalled carbon nanotubes*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2010. **358**(1–3): p. 101-107.
22. Liu, Y., et al., *Dispersion of multiwalled carbon nanotubes by ionic liquid-type Gemini imidazolium surfactants in aqueous solution*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2010. **359**(1–3): p. 66-70.
23. Di Crescenzo, A., et al., *Disaggregation of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) promoted by the ionic liquid-based surfactant 1-hexadecyl-3-vinylimidazolium bromide in aqueous solution*. Soft Matter, 2009. **5**(1): p. 62-66.
24. Jiao, J., et al., *Decorating multi-walled carbon nanotubes with Au nanoparticles by amphiphilic ionic liquid self-assembly*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2012. **408**(0): p. 1-7.
25. Lu, F., S. Zhang, and L. Zheng, *Dispersion of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) by ionic liquid-based phosphonium surfactants in aqueous solution*. Journal of Molecular Liquids, 2012. **173**(0): p. 42-46.

26. Oberlin, A., M. Endo, and T. Koyama, *FILAMENTOUS GROWTH OF CARBON THROUGH BENZENE DECOMPOSITION*. Journal of Crystal Growth, 1976. **32**(3): p. 335-349.
27. Iijima, S. and T. Ichihashi, *SINGLE-SHELL CARBON NANOTUBES OF 1-NM DIAMETER (VOL 363, PG 603, 1993)*. Nature, 1993. **364**(6439): p. 737-737.
28. Bethune, D.S., et al., *COBALT-CATALYZED GROWTH OF CARBON NANOTUBES WITH SINGLE-ATOMIC-LAYER WALLS*. Nature, 1993. **363**(6430): p. 605-607.
29. Dresselhaus, M., et al., *Carbon nanotubes*. Physics World, 1998. **11**(1): p. 33-38.
30. Laurent, C., E. Flahaut, and A. Peigney, *The weight and density of carbon nanotubes versus the number of walls and diameter*. Carbon, 2010. **48**(10): p. 2994-2996.
31. Flahaut, E., C. Laurent, and A. Peigney, *Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation*. Carbon, 2005. **43**(2): p. 375-383.
32. Robertson, D.H., D.W. Brenner, and J.W. Mintmire, *ENERGETICS OF NANOSCALE GRAPHITIC TUBULES*. Physical Review B, 1992. **45**(21): p. 12592-12595.
33. Yakobson, B.I., C.J. Brabec, and J. Bernholc, *Nanomechanics of carbon tubes: Instabilities beyond linear response*. Physical Review Letters, 1996. **76**(14): p. 2511-2514.
34. Overney, G., W. Zhong, and D. Tomanek, *STRUCTURAL RIGIDITY AND LOW-FREQUENCY VIBRATIONAL-MODES OF LONG CARBON TUBULES*. Zeitschrift Fur Physik D-Atoms Molecules and Clusters, 1993. **27**(1): p. 93-96.
35. Krishnan, A., et al., *Young's modulus of single-walled nanotubes*. Physical Review B, 1998. **58**(20): p. 14013-14019.
36. Yu, M.F., et al., *Tensile loading of ropes of single wall carbon nanotubes and their mechanical properties*. Physical Review Letters, 2000. **84**(24): p. 5552-5555.
37. Salvétat, J.P., et al., *Mechanical properties of carbon nanotubes*. Applied Physics a-Materials Science & Processing, 1999. **69**(3): p. 255-260.
38. Bernholc, J., et al., *Theory of growth and mechanical properties of nanotubes*. Applied Physics a-Materials Science & Processing, 1998. **67**(1): p. 39-46.
39. Iijima, S., et al., *Structural flexibility of carbon nanotubes*. Journal of Chemical Physics, 1996. **104**(5): p. 2089-2092.



40. Walters, D.A., et al., *Elastic strain of freely suspended single-wall carbon nanotube ropes*. Applied Physics Letters, 1999. **74**(25): p. 3803-3805.
41. Saito, R., G. Dresselhaus, and M.S. Dresselhaus, *Tunneling conductance of connected carbon nanotubes*. Physical Review B, 1996. **53**(4): p. 2044-2050.
42. Hamada, N., *ELECTRONIC BAND-STRUCTURE OF CARBON NANOTUBES - TOWARD THE 3-DIMENSIONAL SYSTEM*. Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology, 1993. **19**(1-2): p. 181-184.
43. Long, Y.Z., et al., *Electrical properties of multi-walled carbon nanotube/polypyrrole nanocables: percolation-dominated conductivity*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2004. **37**(14): p. 1965-1969.
44. Ebbesen, T., et al., *Electrical conductivity of individual carbon nanotubes*. 1996.
45. Charlier, J.C., *Defects in carbon nanotubes*. Accounts of Chemical Research, 2002. **35**(12): p. 1063-1069.
46. Berber, S., Y.K. Kwon, and D. Tomanek, *Unusually high thermal conductivity of carbon nanotubes*. Physical Review Letters, 2000. **84**(20): p. 4613-4616.
47. Osman, M.A. and D. Srivastava, *Temperature dependence of the thermal conductivity of single-wall carbon nanotubes*. Nanotechnology, 2001. **12**(1): p. 21-24.
48. Che, J.W., T. Cagin, and W.A. Goddard, *Thermal conductivity of carbon nanotubes*. Nanotechnology, 2000. **11**(2): p. 65-69.
49. Kim, P., et al., *Thermal transport measurements of individual multiwalled nanotubes*. Physical Review Letters, 2001. **87**(21).
50. Seidel, R., et al., *High-current nanotube transistors*. Nano Letters, 2004. **4**(5): p. 831-834.
51. Raffaele, R.P., et al., *Carbon nanotubes for power applications*. Materials Science and Engineering: B, 2005. **116**(3): p. 233-243.
52. Minoux, E., et al., *Achieving high-current carbon nanotube emitters*. Nano Letters, 2005. **5**(11): p. 2135-2138.
53. Kuzmych, O., B.L. Allen, and A. Star, *Carbon nanotube sensors for exhaled breath components*. Nanotechnology, 2007. **18**(37).
54. Hu, X.B., et al., *Transformation and reduction of androgenic activity of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in Fe 3O 4/MWCNTs-H 2O 2 system*. Applied Catalysis B: Environmental, 2012. **127**: p. 167-174.

55. Liang, Y., et al., *Oxygen reduction electrocatalyst based on strongly coupled cobalt oxide nanocrystals and carbon nanotubes*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(38): p. 15849-15857.
56. Restivo, J., et al., *Catalytic ozonation of metolachlor under continuous operation using nanocarbon materials grown on a ceramic monolith*. Journal of Hazardous Materials, 2012. **239-240**: p. 249-256.
57. Digge, M.S., R.S. Moon, and S.G. Gattani, *Application of carbon nanotubes in drug delivery: A review*. International Journal of PharmTech Research, 2012. **4**(2): p. 839-847.
58. Raffa, V., et al., *Carbon nanotube-mediated wireless cell permeabilization: Drug and gene uptake*. Nanomedicine, 2011. **6**(10): p. 1709-1718.
59. Pantarotto, D., et al., *Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes*. Chemical Communications, 2004(1): p. 16-17.
60. Neves, V., et al., *Design of double-walled carbon nanotubes for biomedical applications*. Nanotechnology, 2012. **23**(36): p. 365102.
61. Béduer, A.I., et al., *Elucidation of the role of carbon nanotube patterns on the development of cultured neuronal cells*. Langmuir, 2012. **28**(50): p. 17363-17371.
62. Tlili, C., et al., *Single-walled carbon nanotube chemoresistive label-free immunosensor for salivary stress biomarkers*. Analyst, 2010. **135**(10): p. 2637-2642.
63. Chen, R.J., et al., *Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(9): p. 4984-4989.
64. Kam, N.W.S., et al., *Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(33): p. 11600-11605.
65. Fiorito, S., et al., *Redox active Double Wall Carbon Nanotubes show intrinsic anti-proliferative effects and modulate autophagy in cancer cells*. Carbon, 2014. **78**: p. 589-600.
66. Guo, T., et al., *CATALYTIC GROWTH OF SINGLE-WALLED NANOTUBES BY LASER VAPORIZATION*. Chemical Physics Letters, 1995. **243**(1-2): p. 49-54.
67. Maser, W.K., et al., *Production of high-density single-walled nanotube material by a simple laser-ablation method*. Chemical Physics Letters, 1998. **292**(4-6): p. 587-593.

68. Endo, M., et al., *PYROLYTIC CARBON NANOTUBES FROM VAPOR-GROWN CARBON-FIBERS*. Carbon, 1995. **33**(7): p. 873-881.
69. Cassell, A.M., et al., *Large scale CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes*. Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(31): p. 6484-6492.
70. Flahaut, E., et al., *Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes*. Chemical Communications, 2003. **9**(12): p. 1442-1443.
71. Seo, J.W., et al., *Catalytically grown carbon nanotubes: from synthesis to toxicity*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2007. **40**(6): p. R109-R120.
72. Warheit, D.B., et al., *Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats*. Toxicological Sciences, 2004. **77**(1): p. 117-125.
73. Monteiro-Riviere, N.A., et al., *Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes*. Toxicology Letters, 2005. **155**(3): p. 377-384.
74. Murray, A.R., et al., *Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes*. Toxicology, 2009. **257**(3): p. 161-171.
75. Ema, M., et al., *Evaluation of dermal and eye irritation and skin sensitization due to carbon nanotubes*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2011. **61**(3): p. 276-281.
76. Kishore, A.S., P. Surekha, and P.B. Murthy, *Assessment of the dermal and ocular irritation potential of multi-walled carbon nanotubes by using in vitro and in vivo methods*. Toxicology Letters, 2009. **191**(2-3): p. 268-274.
77. Wang, H.F., et al., *Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2004. **4**(8): p. 1019-1024.
78. Deng, X., et al., *Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo*. Carbon, 2007. **45**(7): p. 1419-1424.
79. de Gabory, L., et al., *Carbon nanotubes have a deleterious effect on the nose: the first in vitro data*. Rhinology, 2011. **49**(4): p. 445-452.
80. Salvador-Morales, C., et al., *Binding of pulmonary surfactant proteins to carbon nanotubes; potential for damage to lung immune defense mechanisms*. Carbon, 2007. **45**(3): p. 607-617.
81. Muller, J., et al., *Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005. **207**(3): p. 221-231.
82. Cruzier, D., et al., *Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung*. Toxicology, 2010. **272**(1): p. 39-45.



83. Czarny, B., et al., *Carbon nanotube translocation to distant organs after pulmonary exposure: insights from in Situ <sup>14</sup>C-Radiolabeling and tissue radioimaging*. ACS nano, 2014. **8**(6): p. 5715-5724.
84. Bai, Y., et al., *Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility*. Nature Nanotechnology, 2010. **5**(9): p. 683-689.
85. Flahaut, E., et al., *Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells*. Carbon, 2006. **44**(6): p. 1093-1099.
86. Sanz, V., et al., *Chloroquine-enhanced gene delivery mediated by carbon nanotubes*. Carbon, 2011. **49**(15): p. 5348-5358.
87. Neves, V., et al., *Uptake and release of double-walled carbon nanotubes by mammalian cells*. Advanced Functional Materials, 2010. **20**(19): p. 3272-3279.
88. Neves, V., et al., *Cellular localization, accumulation and trafficking of double-walled carbon nanotubes in human prostate cancer cells*. Nano Research, 2012. **5**(4): p. 223-234.
89. Salvador-Morales, C., et al., *Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes*. Molecular Immunology, 2006. **43**(3): p. 193-201.
90. Meunier, E., et al., *Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1 $\beta$  release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2012. **8**(6): p. 987-995.
91. Kang, S., M.S. Mauter, and M. Elimelech, *Microbial Cytotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials: Implications for River Water and Wastewater Effluent*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(7): p. 2648-2653.
92. Olivi, M., et al., *Inhibition of microbial growth by carbon nanotube networks*. Nanoscale, 2013. **5**(19): p. 9023-9029.
93. Young, Y.-F., et al., *Toxicity mechanism of carbon nanotubes on Escherichia coli*. Materials Chemistry and Physics, 2012. **134**(1): p. 279-286.
94. Verneuil, L., et al., *Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom Nitzschia palea: "A sticky story"*. Nanotoxicology, 2014(0): p. 1-11.
95. Zhu, X., et al., *Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to Daphnia magna*. Journal of Nanoparticle Research, 2009. **11**(1): p. 67-75.
96. Mouchet, F., et al., *Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian Xenopus laevis*. Aquatic Toxicology, 2008. **87**(2): p. 127-137.

97. Mouchet, F., et al., *Carbon nanotube ecotoxicity in amphibians: assessment of multiwalled carbon nanotubes and comparison with double-walled carbon nanotubes*. *Nanomedicine*, 2010. **5**(6): p. 963-974.
98. Saria, R., et al., *Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2014. **107**: p. 22-29.
99. Templeton, R.C., et al., *Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod*. *Environmental Science & Technology*, 2006. **40**(23): p. 7387-7393.
100. Cheng, J., E. Flahaut, and S.H. Cheng, *Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007. **26**(4): p. 708-716.
101. Kwok, K.W., et al., *Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: influence of different dispersion methods*. *Nanomedicine*, 2010. **5**(6): p. 951-961.
102. Derjaguin, B. and L. Landau, *The theory of stability of highly charged lyophobic sols and coalescence of highly charged particles in electrolyte solutions*. *Acta Physicochim. URSS*, 1941. **14**: p. 633-52.
103. Verwey, E.J.W., J.T.G. Overbeek, and K. Van Nes, *Theory of the stability of lyophobic colloids: the interaction of sol particles having an electric double layer*. 1948: Elsevier New York.
104. Israelachvili, J.N., R.K. Tandon, and L.R. White, *Measurement of forces between two mica surfaces in aqueous polyethylene oxide solution*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1980. **78**(2): p. 430-443.
105. Kelly, B.T., 2. *Graphite—the most fascinating nuclear material (Charles E. Pettinos award lecture)*. *Carbon*, 1982. **20**(2): p. 125.
106. Larson, R.G., *The structure and rheology of complex fluids*. Vol. 4. 1999: Oxford university press New York.
107. Horn, R.G., J.N. Israelachvili, and F. Pribac, *Measurement of the deformation and adhesion of solids in contact*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1987. **115**(2): p. 480-492.
108. Chen, S.J., et al., *Predicting the influence of ultrasonication energy on the reinforcing efficiency of carbon nanotubes*. *Carbon*, 2014. **77**(0): p. 1-10.
109. Bourdiol, F., et al., *Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae*. *Carbon*, 2013. **54**(0): p. 175-191.

110. Zheng, M., et al., *DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes*. *Nat Mater*, 2003. **2**(5): p. 338-342.
111. Sanz, V., et al., *Optimising DNA binding to carbon nanotubes by non-covalent methods*. *Carbon*, 2011. **49**(5): p. 1775-1781.
112. Badaire, S., et al., *Correlation of properties with preferred orientation in coagulated and stretch-aligned single-wall carbon nanotubes*. *Journal of Applied Physics*, 2004. **96**(12): p. 7509-7513.
113. Lynam, C., S.E. Moulton, and G.G. Wallace, *Carbon-Nanotube Biofibers*. *Advanced Materials*, 2007. **19**(9): p. 1244-1248.
114. Bai, Y., et al., *Aqueous dispersion of surfactant-modified multiwalled carbon nanotubes and their application as an antibacterial agent*. *Carbon*, 2011. **49**(11): p. 3663-3671.
115. Blesic, M., et al., *Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution*. *Green Chemistry*, 2007. **9**(5): p. 481-490.
116. Richard, C., et al., *Supramolecular self-assembly of lipid derivatives on carbon nanotubes*. *Science*, 2003. **300**(5620): p. 775-778.
117. Uddin, N.M., F.M. Capaldi, and B. Farouk, *Molecular dynamics simulations of carbon nanotube dispersions in water: Effects of nanotube length, diameter, chirality and surfactant structures*. *Computational Materials Science*, 2012. **53**(1): p. 133-144.
118. Utsumi, S., et al., *RBM band shift-evidenced dispersion mechanism of single-wall carbon nanotube bundles with NaDDBS*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007. **308**(1): p. 276-284.
119. Bai, Y., et al., *Adsorption of Triton X-series surfactants and its role in stabilizing multi-walled carbon nanotube suspensions*. *Chemosphere*, 2010. **79**(4): p. 362-367.
120. Bystrzejewski, M., et al., *Dispersion and diameter separation of multi-wall carbon nanotubes in aqueous solutions*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. **345**(2): p. 138-142.
121. Rausch, J., R.-C. Zhuang, and E. Mäder, *Surfactant assisted dispersion of functionalized multi-walled carbon nanotubes in aqueous media*. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 2010. **41**(9): p. 1038-1046.
122. Xu, H., et al., *Efficient dispersing and shortening of super-growth carbon nanotubes by ultrasonic treatment with ceramic balls and surfactants*. *Advanced Powder Technology*, 2010. **21**(5): p. 551-555.

123. Blanch, A.J., C.E. Lenehan, and J.S. Quinton, *Parametric analysis of sonication and centrifugation variables for dispersion of single walled carbon nanotubes in aqueous solutions of sodium dodecylbenzene sulfonate*. Carbon, 2011. **49**(15): p. 5213-5228.
124. Clark, M.D., S. Subramanian, and R. Krishnamoorti, *Understanding surfactant aided aqueous dispersion of multi-walled carbon nanotubes*. Journal of Colloid and Interface Science, 2011. **354**(1): p. 144-151.
125. Oleszczuk, P. and B. Xing, *Influence of anionic, cationic and nonionic surfactants on adsorption and desorption of oxytetracycline by ultrasonically treated and non-treated multiwalled carbon nanotubes*. Chemosphere, 2011. **85**(8): p. 1312-1317.
126. Ndiaye, A.L., et al., *Elaboration of SWNTs-based gas sensors using dispersion techniques: Evaluating the role of the surfactant and its influence on the sensor response*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012. **162**(1): p. 95-101.
127. Islam, M.F., et al., *High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water*. Nano Letters, 2003. **3**(2): p. 269-273.
128. Walden, P., *Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts*. Bull. Acad. Imper. Sci.(St. Petersburg), 1914. **8**: p. 405-422.
129. Hurley, F.H. and T.P. Wler, *The electrodeposition of aluminum from nonaqueous solutions at room temperature*. Journal of the Electrochemical Society, 1951. **98**(5): p. 207-212.
130. Wilkes, J.S. and M.J. Zaworotko, *Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1992(13): p. 965-967.
131. van Rantwijk, F. and R.A. Sheldon, *Biocatalysis in ionic liquids*. Chemical reviews, 2007. **107**(6): p. 2757-2785.
132. 搖Bonhote, P., Dias AP, Papageorgiou N., Kalyanasundaram K., Gratzel M. *Inorganic Chemistry*, 1996. **35**: p. 1168-1178.
133. Bonhote, P., et al., *Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts*. Inorganic chemistry, 1996. **35**(5): p. 1168-1178.
135. Huddleston, J.G., et al., *Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation*. Green Chemistry, 2001. **3**(4): p. 156-164.
136. Greaves, T.L. and C.J. Drummond, *Protic ionic liquids: properties and applications*. Chemical reviews, 2008. **108**(1): p. 206-237.

137. Xu, W., et al., *Ionic liquids of chelated orthoborates as model ionic glassformers*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(42): p. 11749-11756.
138. Kyrides, L., et al., *Substituted imidazoles and 2-imidazolines*. The Journal of organic chemistry, 1947. **12**(4): p. 577-586.
139. Levesque, G., J.-C. Gressier, and M. Proust, *4, 5-Dihydroimidazoles from dithiocarboxylic esters, thiocarboxamides, or nitriles*. Synthesis, 1981. **1981**(12): p. 963-965.
140. Korshin, E., et al., *Aminoamidines*. Russian chemical bulletin, 1994. **43**(3): p. 431-438.
141. Ferm, R. and J. Riebsomer, *The Chemistry of the 2-Imidazolines and Imidazolidines*. Chemical Reviews, 1954. **54**(4): p. 593-613.
142. Sonn, A. *German Patent 616,227, 1935*. in *Chem. Abstr.* 1978.
143. Mirkhani, V., et al., *Rapid and efficient synthesis of 2-imidazolines and bis-imidazolines under ultrasonic irradiation*. Tetrahedron Letters, 2006. **47**(13): p. 2129-2132.
144. Gogoi, P. and D. Konwar, *An efficient and one-pot synthesis of imidazolines and benzimidazoles via anaerobic oxidation of carbon–nitrogen bonds in water*. Tetrahedron Letters, 2006. **47**(1): p. 79-82.
145. Ishihara, M. and H. Togo, *Direct oxidative conversion of aldehydes and alcohols to 2-imidazolines and 2-oxazolines using molecular iodine*. Tetrahedron, 2007. **63**(6): p. 1474-1480.
146. Riebsomer, J., *The synthesis of imidazolines from 1, 2-diamines and carboxylic acids*. Journal of the American Chemical Society, 1948. **70**(4): p. 1629-1632.
147. Vorbrüggen, H. and K. Krolikiewicz, *A simple synthesis of  $\Delta^2$ -oxazolines,  $\Delta^2$ -oxazines,  $\Delta^2$ -thiazolines and  $\Delta^2$ -imidazolines*. Tetrahedron Letters, 1981. **22**(45): p. 4471-4474.
148. Baumgartner, H. and A.C. O'Sullivan, *The synthesis of imidazoline analogs of the kainoid family*. Tetrahedron, 1997. **53**(8): p. 2775-2784.
149. Sharma, S., S. Gangal, and A. Rauf, *Convenient one-pot synthesis of novel 2-substituted benzimidazoles, tetrahydrobenzimidazoles and imidazoles and evaluation of their in vitro antibacterial and antifungal activities*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **44**(4): p. 1751-1757.
150. Tyagi, R., V.K. Tyagi, and S.K. Pandey, *Imidazoline and its derivatives: an overview*. Journal of oleo science, 2007. **56**(5): p. 211-22.

151. Egan, R., *Cationic surface active agents as fabric softeners*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1978. **55**(1): p. 118-121.
152. Bajpai, D. and V. Tyagi, *Fatty imidazolines: chemistry, synthesis, properties and their industrial applications*. Journal of oleo science, 2006. **55**(7): p. 319-329.
153. Wang, S.F., T. Furuno, and Z. Cheng, *Synthesis of 1-hydroxyethyl-2-alkyl-2-imidazoline and its derivative sulfonate amphoteric surfactant from tall oil fatty acid*. Journal of Wood Science, 2003. **49**(4): p. 371-376.
154. Mannheimer, H.S., *Metal salts of substituted quaternary hydroxy cycloimidinic acid metal alcoholates and process for preparation of same*. 1950, Google Patents.
155. Yoo, S.-H., et al., *Synthesis and corrosion inhibition behavior of imidazoline derivatives based on vegetable oil*. Corrosion Science, 2012. **59**(0): p. 42-54.
156. Nguyen Van Buu, O., A. Aupoix, and G. Vo-Thanh, *Synthesis of novel chiral imidazolium-based ionic liquids derived from isosorbide and their applications in asymmetric aza Diels–Alder reaction*. Tetrahedron, 2009. **65**(11): p. 2260-2265.
157. Baudequin, C., et al., *Ionic liquids and chirality: opportunities and challenges*. Tetrahedron: Asymmetry, 2003. **14**(20): p. 3081-3093.
158. Stracke, M.P., et al., *Imidazolium ionic liquids as electrolytes for manganese dioxide free Leclanché batteries*. Applied Energy, 2009. **86**(9): p. 1512-1516.
159. Whitehead, J.A., et al., *Application of 1-alkyl-3-methyl-imidazolium ionic liquids in the oxidative leaching of sulphidic copper, gold and silver ores*. Hydrometallurgy, 2007. **88**(1–4): p. 109-120.
160. Wang, Y., et al., *Liquid–liquid equilibrium phase behavior of iminazolium-based ionic liquid aqueous two-phase systems composed of 1-alkyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate and different electrolytes ZnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> and Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 298.15 K: Experimental and correlation*. Thermochimica Acta, 2013. **557**(0): p. 68-76.
161. Ubeda-Torres, M.T., et al., *Gaining insight in the behaviour of imidazolium-based ionic liquids as additives in reversed-phase liquid chromatography for the analysis of basic compounds*. Journal of Chromatography A, 2015. **1380**(0): p. 96-103.
162. Stephens, G. and P. Licence, *Ionic liquids Toxic or not?* Chimica Oggi-Chemistry Today, 2011. **29**(3): p. 72-75.
163. Madria, N., et al., *Ionic liquid electrolytes for lithium batteries: Synthesis, electrochemical, and cytotoxicity studies*. Journal of Power Sources, 2013. **234**(0): p. 277-284.

164. Biczak, R., et al., *The role of the anion in the toxicity of imidazolium ionic liquids*. Journal of Hazardous Materials, 2014. **274**(0): p. 181-190.
165. Gouveia, W., et al., *Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials*. Chemosphere, 2014. **104**(0): p. 51-56.
166. Riduan, S.N. and Y. Zhang, *Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(23): p. 9055-9070.
167. Kim, H.B., et al., *Preparation and nanoscopic internal structure of single-walled carbon nanotube-ionic liquid gel*. Synthetic Metals, 2005. **154**(1-3): p. 189-192.
168. Aida, T. and T. Fukushima, *Soft materials with graphitic nanostructures*. Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences, 2007. **365**(1855): p. 1539-1552.
169. Hong, S.H., et al., *Preparation of single-walled carbon nanotube (SWNT) gel composites using poly(ionic liquids)*. Colloid and Polymer Science, 2010. **288**(9): p. 1013-1018.
170. Li, C., et al., *Carbon Nanotube Wiring of Electrodes for High-Rate Lithium Batteries Using an Imidazolium-Based Ionic Liquid Precursor as Dispersant and Binder: A Case Study on Iron Fluoride Nanoparticles*. Acs Nano, 2011. **5**(4): p. 2930-2938.
171. Lu, L., et al., *Amperometric Immunosensor for Myeloperoxidase in Human Serum Based on a Multi-wall Carbon Nanotubes-Ionic Liquid-Cerium Dioxide Film-modified Electrode*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2010. **31**(11): p. 3259-3264.
172. Pei, X., et al., *A magnetically responsive material of single-walled carbon nanotubes functionalized with magnetic ionic liquid*. Carbon, 2010. **48**(9): p. 2501-2505.
173. Yang, J., et al., *Quantitative analysis of the (n,m) abundance of single-walled carbon nanotubes dispersed in ionic liquids by optical absorption spectra*. Materials Chemistry and Physics, 2013. **139**(1): p. 233-240.
174. Dong, B., et al., *Dispersion of carbon nanotubes by carbazole-tailed amphiphilic imidazolium ionic liquids in aqueous solutions*. Journal of Colloid and Interface Science, 2011. **356**(1): p. 190-195.
175. Liu, D., et al., *Acute and subacute toxicity and genotoxicity of schizonepetin, a naturally occurring monoterpene with antiviral activity*. Food and Chemical Toxicology, 2012. **50**(7): p. 2256-2262.
176. *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de Produits chimiques Toxicité orale aiguë - Méthode de la dose prédéterminée*. OCDE 420, 2001.

177. *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de Produits chimiques Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë*. OCDE 423, 2001.
178. Lovšin Barle, E., et al., *The value of acute toxicity testing of pharmaceuticals for estimation of human response*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2012. **62**(3): p. 412-418.
179. Trevan, J.W., *The error of determination of toxicity*. *Proc. R. Soc*, 1927. **101B**: p. 483-514.
180. *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de Produits chimiques Toxicité orale aiguë - Méthode de l'ajustement des doses*. OCDE 425, 2008.
181. 11348, I.C., *Revised version Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test)*. 1994.
182. Nohava, M., W.R. Vogel, and H. Gaugitsch, *Evaluation of the luminescent bacteria bioassay for the estimation of the toxicological potential of effluent water samples—Comparison with data from chemical analyses*. *Environment International*, 1995. **21**(1): p. 33-37.
183. Petushkov, V.N., B.G. Gibson, and J. Lee, *Direct Measurement of Excitation Transfer in the Protein Complex of Bacterial Luciferase Hydroxyflavin and the Associated Yellow Fluorescence Proteins from Vibrio fischeri Y1*. *Biochemistry*, 1996. **35**(25): p. 8413-8418.
184. Ma, X.Y., et al., *Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications*. *Science of The Total Environment*, 2014. **468–469**(0): p. 1-11.
185. Parvez, S., C. Venkataraman, and S. Mukherji, *A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (Vibrio fischeri) for acute toxicity prediction of chemicals*. *Environment International*, 2006. **32**(2): p. 265-268.
186. Zenno, S., et al., *Identification of the gene encoding the major NAD (P) H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium Vibrio fischeri ATCC 7744*. *Journal of bacteriology*, 1994. **176**(12): p. 3536-3543.
187. Azoubel, S. and S. Magdassi, *The formation of carbon nanotube dispersions by high pressure homogenization and their rapid characterization by analytical centrifuge*. *Carbon*, 2010. **48**(12): p. 3346-3352.
188. Yu, B., et al., *The electrolyte switchable solubility of multi-walled carbon nanotube/ionic liquid (MWCNT/IL) hybrids*. *Chemical Communications*, 2006(22): p. 2356-2358.
189. Osazuwa, O., et al., *Characterization of non-covalently, non-specifically functionalized multi-wall carbon nanotubes and their melt compounded composites with an ethylene–octene copolymer*. *Composites Science and Technology*, 2012. **73**(0): p. 27-33.



190. Li, F.-C., et al., *Experimental study on the characteristics of thermal conductivity and shear viscosity of viscoelastic-fluid-based nanofluids containing multiwalled carbon nanotubes*. *Thermochimica Acta*, 2013. **556**(0): p. 47-53.
191. Guo, J., et al., *The different bio-effects of functionalized multi-walled carbon nanotubes on Tetrahymena pyriformis*. *Current Nanoscience*, 2008. **4**(3): p. 240-245.