



HAL
open science

Nano-objets hybrides et polymères sous irradiation

Aurélie Féré Paquirissamy

► **To cite this version:**

Aurélie Féré Paquirissamy. Nano-objets hybrides et polymères sous irradiation. Chimie inorganique. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS390 . tel-01444882

HAL Id: tel-01444882

<https://theses.hal.science/tel-01444882>

Submitted on 30 Jan 2017

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

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

NNT : 2016SACLS390

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N°571
Sciences chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes
Spécialité de doctorat : Chimie

Par

Mme Aurélie Paquirissamy

Nano-objets hybrides et polymères sous irradiation

Thèse présentée et soutenue à Saclay, le 04 Novembre 2016 :
Composition du Jury :

M. Christophe COLBEAU-JUSTIN
M. Rémi BARILLON
Mme Géraldine CARROT
Mme Yvette NGONO-RAVACHE
M. Jean-Philippe RENAULT
Mme Stéphanie REYNAUD
M. Philippe ROGER

Professeur, Université Paris-Sud
Professeur, Université de Strasbourg
Chercheur CEA, CEA Saclay
Ingénieur de recherche, CEA Caen
Chercheur CEA, CEA Saclay
Chargée de recherche CNRS, Université de Pau
Professeur, Université Paris-Sud

Président
Rapporteur
Invitée
Examinatrice
Directeur de thèse
Rapporteur
Examineur

Titre : Nano-objets hybrides et polymères sous irradiation

Mots clés : micelles/nanoparticules polymères, nanoparticules d'or greffées de polymères, polymérisation radicalaire contrôlée, chimie click, irradiation, diffusion de neutron aux petits angles

Résumé : Les nano-objets hybrides ou polymères connaissent un intérêt grandissant depuis plusieurs années mais peu sont étudiés sous irradiation. Dans ce travail, différents nano-objets ont été synthétisés et étudiés pour comprendre leur stabilité face à des rayonnements ionisants. Nous avons étudié l'effet de l'irradiation sur des copolymères à blocs amphiphiles pouvant s'organiser en micelles dans l'eau. Les objets varient par la nature de leur polymère hydrophobe et leur sensibilité aux rayonnements ionisants. Dans un cas, des polyméthacrylates ont été copolymérisés par ATRP à partir d'un PEG macro-amorceur. Dans un autre cas, pour accentuer l'effet de l'irradiation, un polysulfone

aliphatique plus radiosensible, a été synthétisé *via* une polyaddition thiol-ène.

Après nanoprecipitation, les objets ont été caractérisés avant et après irradiation par des techniques de diffusion et de chromatographie. En parallèle, on s'est intéressés également à des nanoparticules métalliques connues pour augmenter l'effet de l'irradiation. Des nanoparticules d'or greffées de polymères ont été synthétisées par voie « grafting to » après synthèse de macro-ligands par polymérisation radicalaire contrôlée. Après une caractérisation fine des objets, l'effet de l'irradiation a été étudié sur la taille des objets et la masse molaire des polymères afin de déterminer la nature des phénomènes mis en jeu.

Title : Hybrid and polymer nano-objects under irradiation

Keywords : polymer micelles/nanoparticles, polymer-grafted gold nanoparticles, controlled radical polymerization, click-chemistry, irradiation, small-angle neutron scattering

Abstract : Hybrid and polymer nano-objects have known a growing interest these last years but few are studied under irradiation. In the present work, different nano-objects have been synthesized and studied to understand their stability towards ionizing rays. We have studied the effect of irradiation onto amphiphilic bloc copolymer that form micelles in water. Objects were varied by the nature of their hydrophobic bloc and their sensibility to ionizing rays. First, methacrylates were copolymerized by ATRP with a PEG macro-initiator. Secondly, to improve radiation effect, a more radiosensitive polymer, a polyolefinsulfone, was synthesized by a thiol-

ene polyaddition. After nanoprecipitation, objects were characterized before and after irradiation by scattering and chromatography techniques. In parallel, we also studied metallic nanoparticles well known for improving irradiation effect. Polymer-grafted gold nanoparticles were synthesized *via* a "grafting to" technique, after the synthesis of macro-ligands by controlled radical polymerization. After a precise characterization of these objects, irradiation effect has been studied *via* changes in size and polymer molecular weight. This will permit to determine the nature of induced phenomena.



Remerciements

J'ai effectué mes trois années de thèse entre le Laboratoire d'Innovation en Chimie des Surfaces et Nanosciences (LICSEN) et le Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire (LIONS). Je souhaite donc remercier tous les membres de ces laboratoires ainsi que leurs directeurs respectifs Vincent Derycke et Patrick Guenoun pour m'avoir accueillie aussi chaleureusement. Je tiens également à remercier Serge Palacin le chef du service Nanosciences et Innovation pour les Matériaux la Biomédecine et l'Energie (NIMBE).

Je voudrais ensuite adresser mes remerciements à Stéphanie Reynaud et Rémi Barillon pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci également à Christophe Colbeau-Justin d'avoir accepté d'être président de mon jury et ainsi avoir suivi tout mon parcours universitaire. Je tiens également à remercier Yvette Ngonon-Ravache et Philippe Roger d'avoir fait partie de ce jury.

J'adresse ensuite mes remerciements à mon directeur de thèse Jean-Philippe Renault et mon encadrante Géraldine Carrot. Je vous remercie de m'avoir acceptée au sein de ce projet très intéressant. Jean-Philippe, je vous remercie pour votre écoute et vos nombreux conseils. Géraldine, je te remercie pour ta disponibilité et ton implication. Durant ces trois années, j'ai toujours pu compter sur votre aide et votre soutien. Merci !

Je remercie ensuite mon encadrante Caroline Aymes-Chodur pour son accueil (à toutes heures !) au sein du laboratoire Matériaux et Santé à Châtenay-Malabry. Merci pour ta gentillesse, tes encouragements et ta bonne humeur qui m'ont toujours motivée à faire les nombreux allers-retours à Châtenay.

J'ai eu la chance pendant ces trois années de travailler en collaboration avec de nombreuses personnes auxquelles je voudrais adresser mes sincères remerciements : Sandrine Moreau pour son aide sur de nombreuses expériences, Fabienne Testard pour le SAXS, Jocelyne Leroy pour l'XPS, Giulia Fadda, Didier Lairez et Jacques Jestin pour les expériences de DNPA, Cynthia Gillet pour la microscopie, Emile Jubeli pour les tests de cytotoxicité et l'équipe de Thierry Pourchet pour les tests de radiosensibilisation.

Je tiens à remercier chaleureusement Brigitte Mouanda qui m'a accueillie et aidée dès mes premiers jours au laboratoire ainsi que les deux stagiaires qui ont travaillé sur ce projet : Dorra Gargouri et Mélanie Bodu-Lavigne. Je vous remercie pour l'efficacité de votre travail que vous avez effectué en toute autonomie mais également pour vos qualités personnelles.

Je voudrais ensuite remercier les nombreuses personnes qui se sont toujours arrêtées au laboratoire du 462 où on peut vite se sentir seule ! Merci à mes collègues de paillasse : Claire Soum, Rocio De Miguel, Joël Normand, Laurent et Martin Pham-Van. Je voudrais remercier particulièrement Yasmina pour son sourire et sa bonne humeur qui m'ont accompagnée pendant toute cette thèse.

Merci également aux membres du LICSEN pour leur gentillesse, leur bonne humeur et les nombreux pots : Vincent Derycke, Guy Deniau, Pascal Viel, Bruno Joussetme...

Je remercie ensuite toutes les personnes qui m'ont permis de passer cette thèse dans une bonne ambiance et qui sont devenus aujourd'hui des amis : Josiane, merci pour ton soutien sans limite, les milliards d'heures de discussions (en français, en anglais, en libanais et en tamoul !), les fous rires et surtout ton aide ; Daniel, merci pour les pauses cafés, tes conseils et ta cool-attitude ; Eleonora, merci pour toutes les discussions sur la cuisine, le tricot, les sorties... ; Karim, merci pour tous tes conseils et ta gentillesse ; Mickael alias MacGyver ! Merci pour toujours m'avoir tirée de mes nombreux problèmes ! Et surtout pour toutes nos discussions voyages ! Je voudrais ensuite remercier Raj et Mohammed pour leur soutien durant la rédaction. Merci ensuite à mes collègues de bureau pour les bons moments : Laurent, Maxime, Ibtihel, Fanny, Alexis, David, Sophie, Paul... Et un merci plus particulier à Serge qui a supporté les heures pénibles de la rédaction sans trop broncher !

Pour finir, je souhaite remercier des personnes extérieures à la thèse qui m'ont permis de garder une vie sociale équilibrée ! Merci à mes amis et à ma famille pour tout leur soutien. Mais surtout merci à mon mari Florian d'avoir vécu et accepté mon quotidien pendant trois ans. Last but not least, merci maman...pour tout !

Table des matières

Abréviations	11
Introduction générale.....	14
I Chapitre I : Contexte de l'étude.....	19
I.1 Effets de l'irradiation sur des systèmes moléculaires.....	20
I.1.1 L'irradiation : généralités	20
I.1.2 Radiolyse de l'eau	21
I.1.3 Radiolyse des polymères.....	23
I.2 Nano-objets sous irradiation.....	26
I.2.1 Nano-objets et lithographie	26
I.2.2 Nano-objets et radiostérilisation	28
I.2.3 Nano-objets et « drug delivery »	32
I.2.4 Nano-objets hybrides et radiosensibilisation	34
I.3 Positionnement du sujet et objectifs de la thèse	38
I.4 Références.....	40
II. Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles	47
II.1 Les copolymères à blocs amphiphiles	48
II.1.1 Définition/ Avantages	48
II.1.2 Méthodes de synthèses	49
II.2 Copolymères à blocs PEG- <i>b</i> -polyméthacrylate	56
II.2.1 Synthèse par polymérisation radicalaire contrôlée	56
II.2.2 Auto-assemblage par nanoprécipitation	61
II.3 Copolymères à blocs PEG- <i>b</i> -polysulfone.....	70
II.3.1 Synthèse par chimie « click »	70

II.3.2	Auto-assemblage par nanopréciipitation	77
II.4	Tests de cytotoxicité <i>in vitro</i>	80
II.5	Conclusion	83
II.6	Références.....	84
III	Chapitre 3 : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles	91
III.1	Irradiation des micelles PEG- <i>b</i> -poly(méthacrylate de <i>tert</i> -butyle)	92
III.1.1	Irradiation en milieu oxygéné	93
III.1.2	Irradiation en milieu désoxygéné	102
III.1.3	Perspectives : tests de chargement	105
III.1.4	Conclusion.....	107
III.2	Irradiation des nanoparticules PEG- <i>b</i> -polysulfone	108
III.2.1	Irradiation en milieu oxygéné	108
III.2.2	Irradiation en milieu désoxygéné	115
III.2.3	Conclusion.....	118
III.3	Tests de cytotoxicité <i>in vitro</i>	120
III.4	Comportement des micelles/nanoparticules sous irradiation.....	122
III.5	Références.....	123
IV.	Chapitre 4 : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymère	127
IV.1	Nanoparticules greffées de polymères	128
IV.1.1	Définition/ Avantage	128
IV.1.2	Méthodes de greffage.....	128
IV.2	Synthèse des nano-objets hybrides	133
IV.2.1	Synthèse des ligands polymères	133
IV.2.2	Synthèse des nanoparticules d'or greffées de polymères.....	143

IV.2.3	Tests de greffage d'un principe actif sur les nano-objets.....	145
IV.3	Caractérisation des nano-objets hybrides	149
IV.3.1	Caractérisation de la couronne de polymère	150
IV.3.2	Caractérisation du cœur métallique	155
IV.3.3	Caractérisation des nano-objets hybrides par diffusion de neutron aux petits angles (DNPA)	161
IV.4	Tests de cytotoxicité <i>in vitro</i>	166
IV.5	Conclusion	172
IV.6	Références.....	174
V	Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymère	181
V.1	Preuve de radiosensibilisation	182
V.2	Etude des nanoparticules d'or greffées de polymères irradiées	184
V.2.1	Les difficultés rencontrées lors de la séparation	185
V.2.2	Etude de la particule irradiée et du surnageant issu de la séparation	187
V.2.3	Mesure de la production de radicaux hydroxyles OH [•]	205
V.3	Etudes des solutions irradiées par diffusion de rayonnement	203
V.3.1	La diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS).....	208
V.3.2	La diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)	208
V.4	Tests de cytotoxicité <i>in vitro</i>	211
V.5	Conclusion	214
V.6	Références.....	215
	Conclusion générale	219
	ANNEXES	225

Abréviations

ATG	Analyse thermogravimétrique
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
CES	Chromatographie d'exclusion stérique
CuBr	Bromure de cuivre(I)
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNPA	Diffusion de neutrons aux petits angles
DOX	Doxorubicine
DP _n	Degré de polymérisation
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide
FTIR	Fourrier transform infrared
ICP-MS	Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif
I _p	Indice de polymolécularité
MeOH	Méthanol
M _n	Masse molaire en nombre
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
M _w	Masse molaire en poids
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMP	Nitroxide Mediated Polymerization

PBS	Phosphate buffer salin
PEG	Poly(éthylène glycol)
PHEMA	Poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle)
PMAA	Poly(acide méthacrylique)
PMA _t Bu	Poly(méthacrylate de <i>tert</i> -butyle)
PMDETA	Pentaméthyl-diéthylène triamine
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
PRC	Polymérisation radicalaire contrôlée
PSu	Polysulfone aliphatique
RAFT	Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAXS	Small Angle X-rays Scattering
TEM	Transmission Electron Microscopy
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofuranne
XPS	X-rays Photoelectron Spectroscopy

Introduction générale

Au cours de ces vingt dernières années, il y a eu un intérêt grandissant pour les systèmes de taille nanométrique. En effet, ces objets présentent des propriétés remarquables dans cette gamme de taille comparées à leurs propriétés à l'état massif. De nombreuses techniques de synthèse ont été développées afin d'obtenir des nano-objets de tailles et de formes contrôlées et avec des compositions variées. La diversité et la versatilité des objets obtenus leur permettent d'être utilisés dans des domaines d'applications variés comme le médical ou l'électronique.

Les rayonnements ionisants sont utilisés dans plusieurs domaines d'applications également. Le plus connu étant la radiothérapie utilisée pour détruire les cellules cancéreuses. L'irradiation est également utilisée pour stériliser des surfaces ou des objets, étudier leur comportement après vieillissement...

L'irradiation d'objets solides ou en solution de taille micrométrique a beaucoup été étudiée alors que peu d'études ont été faites lorsque ces objets sont de taille nanométrique. Pourtant, l'émergence des nanosystèmes dans des domaines où l'irradiation est présente, nécessite d'analyser et de comprendre les caractères spécifiques de l'irradiation de ces nano-objets.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons préparé des nano-objets modèles afin d'étudier leur comportement sous irradiation. Les principaux nanosystèmes soumis à des irradiations sont ceux présents en lithographie, en radiostérilisation, en « drug delivery » et en radiosensibilisation. Deux nanostructures sont développées : une première à base de copolymères à blocs amphiphiles capables de s'organiser sous forme de micelles et dont la structure est proche de celle trouvée en radiostérilisation/« drug delivery » et une seconde à base de nanoparticules d'or greffées de chaînes polymères, dont la structure hybride permet de répondre aux questions relatives au domaine de la radiosensibilisation/lithographie/« drug delivery ».

Afin d'étudier l'effet de l'irradiation sur ces systèmes, ces nano-objets doivent être caractérisés de manière précise, en suivant les processus de dégradation des polymères les constituant. Chaque type de nano-objet a été développé avec des compositions différentes pour évaluer leur influence sur l'irradiation.

Le manuscrit est développé autour de 5 parties. Le premier chapitre présente le contexte de l'étude avec la description des différents nanosystèmes irradiés ainsi que les raisons qui ont conduit à entreprendre l'étude de l'interaction entre ces nano-objets et les rayonnements ionisants.

Le deuxième chapitre présente la synthèse et la caractérisation des copolymères à blocs amphiphiles. Les caractéristiques ainsi que les méthodes de synthèse de ces copolymères sont d'abord présentées. Le chapitre aborde ensuite l'étude de deux différents copolymères. Chaque partie développe la synthèse du copolymère à bloc amphiphile ainsi que leur auto-assemblage sous forme de micelles ou nanoparticules dans l'eau, avec à chaque étape une caractérisation fine de la composition et de la structure respectivement. La toxicité induite par ces nano-objets sur des cellules est étudiée dans une dernière sous-partie.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude du comportement de ces micelles de copolymères sous irradiation. Le chapitre est divisé en deux parties étudiant de manière individuelle l'effet de l'irradiation sur chaque type de copolymère. Une première étude est conduite au niveau moléculaire (spectroscopie et chromatographie) puis une seconde au niveau de la taille et de la forme des objets est réalisée par des techniques de diffusion. Enfin, la cytotoxicité des micelles irradiées est étudiée.

Le quatrième chapitre présente le développement des systèmes à base de nanoparticules d'or greffées de polymères. Une première partie sur les différentes stratégies possibles pour élaborer de tels systèmes sont expliquées. Puis la synthèse en plusieurs étapes de ces nano-objets est décrite : la synthèse préalable de polymères ligands par polymérisation radicalaire contrôlée, suivie de la formation des nanoparticules. Ensuite, une caractérisation détaillée des nano-objets obtenus est conduite à travers l'étude de la couronne polymère puis celle du cœur métallique et enfin l'étude des nano-objets en solution. Pour finir, le caractère cytotoxique de ces nanoparticules est évalué.

Le cinquième chapitre est consacré à l'étude des nanoparticules d'or greffées de polymères sous irradiation. Une étape de séparation est nécessaire afin d'isoler les polymères libres issus de l'irradiation, de la nanoparticule irradiée. L'étude de l'effet de l'irradiation est conduite à deux niveaux. L'effet au niveau moléculaire est étudié à travers des techniques chromatographique et spectroscopique et l'effet sur la taille et la forme des objets est conduite *via* des techniques de diffusion. Enfin, l'influence de l'irradiation sur la cytotoxicité des systèmes est examinée.

CHAPITRE I

I Chapitre I : Contexte de l'étude

Contenu

I	Chapitre I : Contexte de l'étude	19
I.1	Effets de l'irradiation sur des systèmes moléculaires	20
I.1.1	L'irradiation : généralités	20
I.1.2	Radiolyse de l'eau.....	21
I.1.3	Radiolyse des polymères	23
I.2	Nano-objets sous irradiation	26
I.2.1	Nano-objets et lithographie	26
I.2.2	Nano-objets et radiostérilisation	28
I.2.3	Nano-objets et « drug delivery ».....	32
I.2.4	Nano-objets hybrides et radiosensibilisation	34
I.3	Positionnement du sujet et objectifs de la thèse.....	38
I.4	Références	40

Les propriétés intéressantes et modulables des nano-objets organiques ou hybrides contribuent à leur développement. Cependant, bien qu'ils soient de plus en plus étudiés et utilisés dans diverses applications, leur comportement sous irradiation n'est pas connu. De plus, du fait de leur taille et des répercussions de celle-ci sur leurs propriétés, les données actuelles disponibles pour des systèmes solides ou en solution, à des tailles micrométriques, ne peuvent être extrapolées à leur cas. La question de l'interaction rayonnement-nano-objets se pose particulièrement dans trois domaines principaux : la lithographie, la radiostérilisation et la radiosensibilisation.

Avant d'aborder plus en détails ces trois domaines, il est utile de rappeler les phénomènes impliqués lors de l'irradiation de systèmes moléculaires macroscopiques.

I.1 Effets de l'irradiation sur des systèmes moléculaires

I.1.1 L'irradiation : généralités

L'irradiation est une forme d'énergie émise par une source qui traverse un matériel *via* une particule ou des ondes. Il y a deux types de rayons ionisants : les rayons de type électromagnétique (X, UV et gamma) et les particules chargées de haute énergie (électrons, protons et neutrons).

Dans le cas des rayonnements gamma, les radionucléides les plus utilisés pour obtenir des photons sont le cobalt-60 (^{60}Co) et le césium-137 (^{137}Cs). Les deux sont des émetteurs gamma et sont utilisés comme sources de radiation avec des énergies de quanta gamma de 1,17 et 1,33 MeV pour le ^{60}Co et 0,66 MeV pour le ^{137}Cs . Ces radionucléides ont des temps de demi-vie de 5,26 ans (^{60}Co) et 30 ans (^{137}Cs). Le ^{60}Co est la source de radiation gamma industrielle la plus utilisée à cause de son énergie plus importante comparée à celle du ^{137}Cs .

Les particules chargées de haute énergie peuvent être générées industriellement et accélérées par des champs électromagnétiques (sauf pour les neutrons). L'énergie de ces particules peut ainsi atteindre plusieurs MeV.

Dans le cadre de notre étude ce sont les rayons de type gamma qui seront utilisés. En effet, ce rayonnement est commun aux différents domaines d'études (radiostérilisation et radiosensibilisation mais également en « drug delivery ») et il est plus simple de travailler avec un seul type de rayonnement.

Lorsqu'un matériau est bombardé par des particules, il se produit un dépôt d'énergie localement. Ce dépôt est quantifié lors de l'irradiation en termes de dose ou de débit de dose. La dose absorbée est la quantité d'énergie absorbée par unité de masse du produit irradié. Le système international d'unités (SI) pour les mesures d'irradiation utilise le Gray (Gy) mais le rad (la dose absorbée de radiation) est aussi utilisé. Un Gray correspond à une dose absorbée d'1 J/kg ou 100 rad. Le débit de dose est la dose absorbée par unité de temps (par exemple, Gy/s, kGy/h).

Les changements chimiques induits par l'absorption d'énergie sont quantifiés par le rendement radiolytique G. Il est défini comme le nombre de moles de molécules produites ou consommées divisé par la quantité d'énergie absorbée. Il s'exprime en mol.J⁻¹ dans les unités du SI. Auparavant, il était défini comme le nombre de molécules produites ou consommées pour une énergie absorbée de 100 eV. La conversion se fait par cette équation :

$$1 \text{ molécule } (100 \text{ eV})^{-1} = 1,036 \times 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1} \quad \text{(I-1)}$$

Lorsqu'une particule traverse un matériau, le transfert d'énergie linéaire (TEL) quantifie l'énergie dissipée par unité de longueur traversée. Cette grandeur dépend du nombre atomique et de la charge des atomes du matériau mais également de la nature des particules incidentes.

I.1.2 Radiolyse de l'eau

La radiolyse de l'eau est le domaine où l'interaction rayonnement systèmes moléculaires condensés est la mieux décrite. Un rappel sur cette radiolyse est donc utile ici. Les effets des rayonnements sur l'eau sont divisés en plusieurs étapes et sont bien connus aujourd'hui¹.

La décomposition ou la radiolyse de l'eau se fait en deux étapes : une étape cinétique non-homogène et une étape cinétique homogène.

L'étape cinétique non-homogène se divise en trois sous-étapes. La première sous-étape, dite physique, consiste en un transfert d'énergie des particules incidentes, ou ionisantes vers les molécules d'eau, produisant ainsi une ionisation (équation (I-2)) ou une excitation électronique (équation (I-3)) de ces molécules suivie de l'éjection d'un électron. Cet électron appelé électron sec ou présolvaté « e_{pre}⁻ » peut être une source secondaire d'irradiation. Toutes les espèces produites sont groupées dans des grappes ou spurs.



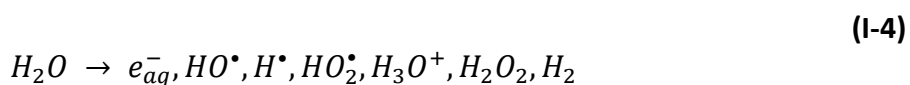
Une deuxième sous-étape physico-chimique suit la précédente au cours de laquelle plusieurs processus ont lieu :

- Réaction ion-molécule
- Relaxation dissociative
- Attachement dissociatif
- Thermalisation de l'électron

L'étape physico-chimique précède l'étape chimique qui est marquée par des réactions chimiques dans les grappes, juste après les processus de solvatation et de relaxation. Les espèces primaires (e^-_{hyd} , HO^\bullet , H^\bullet , H_3O^+) réagissent et commencent à diffuser dans le milieu réactionnel, impliquant la dilution des grappes jusqu'à obtenir une distribution homogène dans le milieu irradié. A ce stade, les concentrations des espèces primaires sont homogènes et vont diminuer selon trois processus simultanés :

- Des réactions de recombinaison qui sont plus importantes au début de l'étape chimique car les espèces sont plus concentrées localement
- La diffusion des espèces entraînant une homogénéisation complète du milieu irradié
- Des réactions avec le soluté « S » dans le milieu

L'étape cinétique homogène comprend également l'étape chimique car c'est celle-ci qui permet d'avoir une distribution homogène des espèces radicalaires et moléculaires dans le milieu. La réaction bilan de la radiolyse de l'eau est donnée par l'équation (I-4) :



La Figure I.1 représente le schéma général de la radiolyse de l'eau incluant les principales réactions aux différentes étapes.

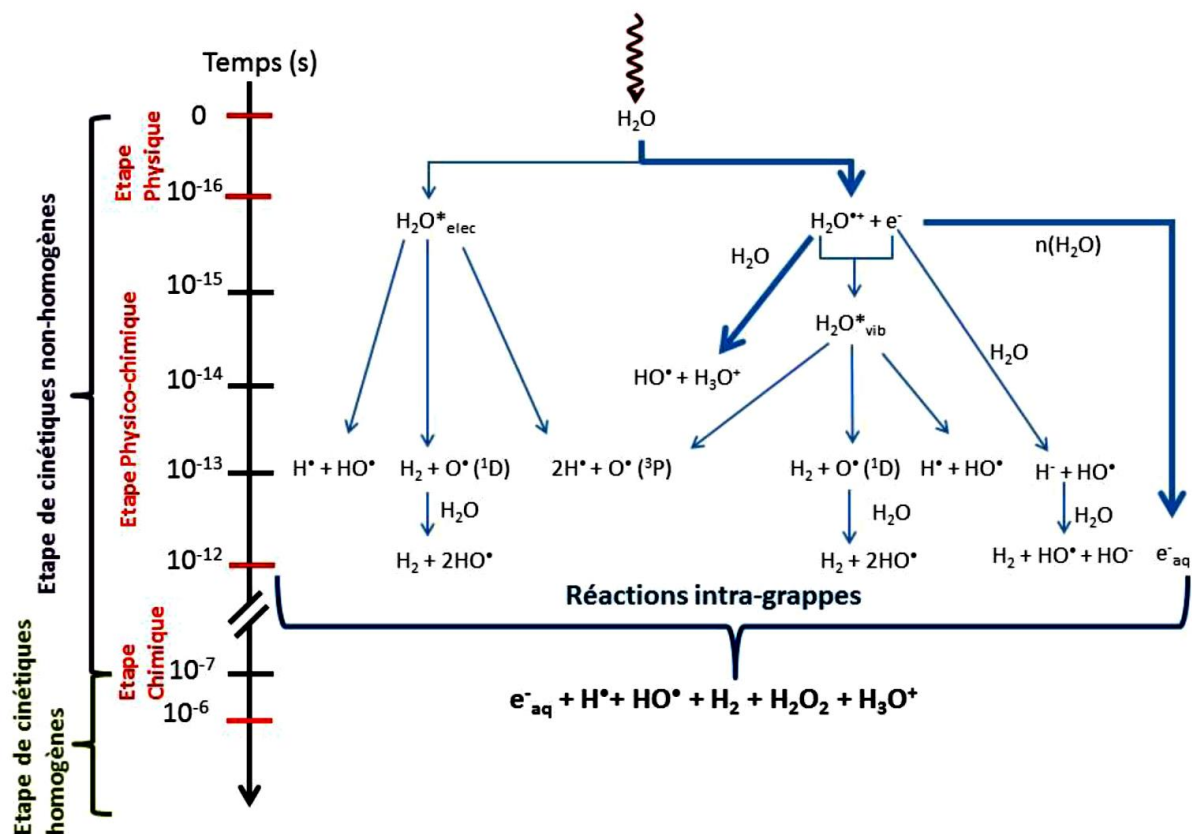


Figure I.1 : Réactions mises en jeu lors de la radiolyse de l'eau représentés^{1a}

I.1.3 Radiolyse des polymères

Les nano-objets utilisés sous irradiation sont principalement des systèmes polymères ou à base de polymères.

La radiolyse des polymères a été découverte dans les années 1940 avec la polymérisation induite par irradiation et l'irradiation du polyéthylène². De nos jours, cette radiolyse est utilisée à plusieurs fins : la polymérisation, le greffage sous irradiation ou après irradiation, la réticulation, la dégradation, la cyclisation et la préparation de matériaux composites.

Les différentes espèces créées par les rayons ionisants dans le polymère, cations, électrons, et molécules excitées peuvent évoluer rapidement vers des recombinaisons, des excitations, des transferts de charge ou la création de radicaux. Elles peuvent également être piégées selon la structure du polymère et les groupements de la chaîne, leur polarité, leur affinité électronique ou leur capacité à stabiliser des états excités.

Cependant dans la majorité des cas, les phénomènes d'excitation et d'ionisation engendrés par l'irradiation des polymères évoluent rapidement vers la création de radicaux (R^\bullet dans la Figure I.2).

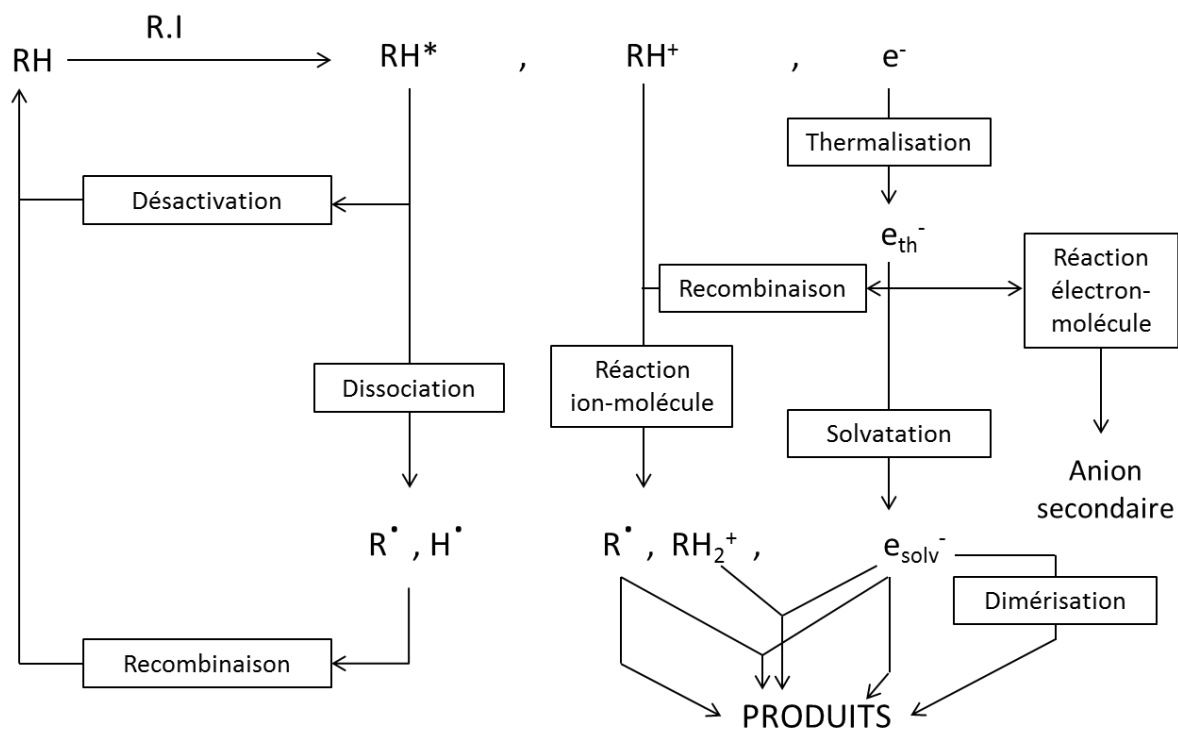


Figure I.2 : Effets sur un polymère RH soumis à des rayonnements ionisants (R.I.)

Les radicaux créés peuvent être des radicaux libres ou des radicaux macromoléculaires. Ainsi, le radical le plus important dans ces matériaux est souvent le radical alkyle, issu de la rupture de liaison CH ou d'attaque de radicaux libres sur des insaturations. Les radicaux peuvent migrer le long de la chaîne polymère. La migration est rapide et se situe dans une échelle de temps comprise entre une microseconde et une seconde. Le mécanisme précis de cette migration n'est pas connu mais il est accepté que l'échange d'atomes d'hydrogène soit impliqué. Les radicaux peuvent être très réactifs et se recombiner ou réagir avec le polymère pour obtenir des produits stables ou d'autres radicaux. Ils peuvent également être stables et ainsi leur réaction peut avoir lieu longtemps après l'irradiation.

Ces radicaux peuvent à leur tour amener la formation d'insaturations et de dégagements gazeux, mais également à des coupures et des réticulations de chaînes.

Les polymères sont classés selon leur aptitude à subir des scissions de chaînes ou des réticulations. La réticulation a lieu pour les polymères contenant des carbones primaires et

secondaires dans leur unité répétitive, alors que les scissions de chaînes ont lieu pour les polymères ayant des carbones quaternaires. Le cas des carbones tertiaires est plus complexe. Enfin les polymères contenant des liaisons doubles subissent le phénomène de réticulation par l'ouverture de la double liaison due à l'attaque radicalaire. La réticulation a également lieu dans les polymères amorphes.

Lorsque l'irradiation est conduite sous oxygène, des radicaux de type peroxy (ROO^\bullet) et alcoxy (RO^\bullet) sont formés conduisant à l'oxydation au sein du polymère. De plus, les radicaux réagissent rapidement avec les molécules oxygénées limitant la réticulation du polymère. Au contraire, les scissions sont plus fréquentes.

Sous atmosphère inerte, la formation d'insaturations est favorisée suite à la dismutation ou à la perte de substituants de la chaîne.

C'est une vision globale de la radiolyse de l'eau et de la radiolyse des polymères qui est donnée ci-dessus. Les phénomènes décrits pourraient être modifiés lorsque liquides et solides sont mélangés à l'échelle nanométrique.

Ces modifications pourraient avoir lieu soit :

- Au niveau des processus physiques, sous forme de transfert de charge et d'énergie. Ces effets apparaîtront comme des transferts de dose, *i.e.* une amplification ou une atténuation des effets directs des rayonnements.
- Au niveau des processus chimiques, sous formes de réactions d'espèces provenant de milieux différents. Ces phénomènes sont souvent appelés des effets indirects des rayonnements et peuvent amener à l'apparition de processus chimiques originaux.

I.2 Nano-objets sous irradiation

I.2.1 Nano-objets et lithographie

I.2.1.1 Définition/Avantage

La lithographie par rayonnements ionisants est probablement le premier domaine où l'on s'est intéressé aux phénomènes d'irradiation à l'échelle nanométrique.

La lithographie est un processus impliquant la réplication d'un modèle prédéterminé sur un substrat, en général une plaque de silicium. La réplication est réalisée en déposant premièrement un matériel de type polymère sensible aux radiations, appelé résine, sur un substrat. Puis ce substrat recouvert de résine est exposé à une source de radiation adaptée. Les irradiations modifient les propriétés physiques et chimiques des régions exposées de la résine. Ces changements modifient en général la solubilité de la résine de telle manière que les régions exposées et les régions non-exposées (délimitées par un masque) dans le film de résine sont différenciées dans une étape de développement, résultant en des images positives ou négatives. Les images positives sont obtenues par scission des résines et les images négatives sont obtenues par liaisons entre les chaînes polymères (réticulation).

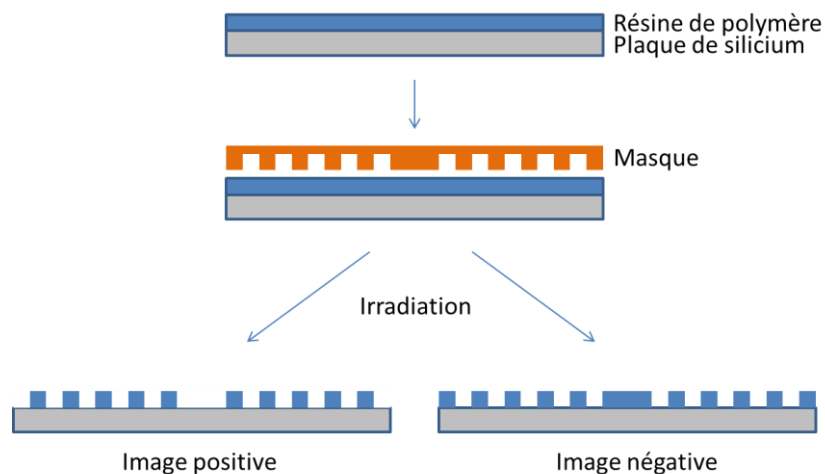


Figure I.3 : Processus de lithographie

Au cours de ces dernières décennies, plusieurs types de résines ont été étudiés³. Parmi eux, les résines se dégradant par scission de chaînes, développées pour la lithographie par faisceau d'électrons et les résines dites chimiquement amplifiées, développées pour la photo-lithographie⁴ et la lithographie par faisceau d'électrons.

Parmi les résines se dégradant par scission de chaînes, le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) est le plus utilisé. Des modèles avec des dimensions inférieures à 20 nm sont couramment obtenus avec ce polymère irradié par un faisceau d'électrons⁵. D'autres résines commerciales ont été développées comme le poly(α -chloro-acrylate-co- α -méthyl-styrène) (ZEP520, Nippon Zeon Co)⁶, le poly(2,2,2-trifluoroéthyl- α -chloro-acrylate) (EBR-9, Toray'Inc)⁷ ou encore le poly(butène-1-sulfone) (PBS, Bell Laboratories)⁸. En général, la gamme de dose d'irradiation utilisée est entre 30 et 100 kGy.

Les polysulfones aliphatiques sont connus pour être très sensibles aux rayonnements ionisants. La liaison carbone-soufre labile et la faible température de plafond permet une dégradation rapide de ces polymères sous irradiation. La sensibilité de ces résines peut être comparée grâce à la valeur du rendement radiolytique de scissions G(S). Alors que le PMMA a une valeur de G(S) égale à $1,71 \cdot 10^{-7}$ mol/J⁹, le poly(butène-1-sulfone) a lui une valeur de G(S) égale à $1,14 \cdot 10^{-6}$ mol/J¹⁰. Néanmoins, leur faible stabilité thermique liée à leur faible température de transition vitreuse ainsi que leur solubilité limitée dans les solvants limitent leurs applications.

Les résines chimiquement amplifiées fonctionnent différemment. La différenciation de solubilité entre les régions exposées et non-exposées se fait par une réaction de déprotection catalysée par un acide, qui change la polarité du polymère dans les régions exposées. Une formulation typique consiste en une matrice de copolymère avec un générateur de photo-acide. Les résines utilisées dans ce cas ont des groupements *tert*-butyles méthacrylates, des méthyles méthacrylates ou encore des acides acryliques¹¹.

La lithographie en extrême ultraviolet¹² (LEUV), dans laquelle des photons de hautes énergies avec une longueur d'onde de 13,4 nm (100 eV) sont utilisés pour façonner les résines, est l'un des candidats les plus prometteurs pour la nouvelle génération de lithographie. Bien qu'appelé EUV, cette longueur d'onde d'irradiation est plutôt dans la gamme des rayons X mous. Des produits avec des tailles inférieures à 50 nm sont attendus avec cette technique. Les événements qui ont lieu après l'absorption de ces photons de hautes énergies se font au niveau de la couche interne des atomes. De ce fait, l'absorption des EUV dépend de la composition atomique. A 13,4 nm, l'absorption des matériaux est un vrai problème. Ainsi, une résine utilisée en LEUV doit être hautement sensible, faiblement absorbante et capable de former des images à haute résolution. Des résines à base de polymère de type poly(hydroxystyrène) (PHS)¹³ ou encore PMMA¹⁴ ont été étudiées mais leur faible sensibilité aux EUV ne convient pas à cette technique.

Récemment une nouvelle approche consiste à utiliser des nanoparticules d'oxyde de métal¹⁵. En effet, l'incorporation d'éléments de masse plus importante augmente les propriétés optiques et augmente la capacité des résines à récupérer de l'énergie pour induire des changements de solubilité et ainsi augmenter la sensibilité. Des études ont montré que les nanoparticules d'oxydes de zirconium et d'hafnium de quelques nm entourées de ligands organiques peuvent être modelées avec une très haute résolution (parfois inférieure à 10 nm).

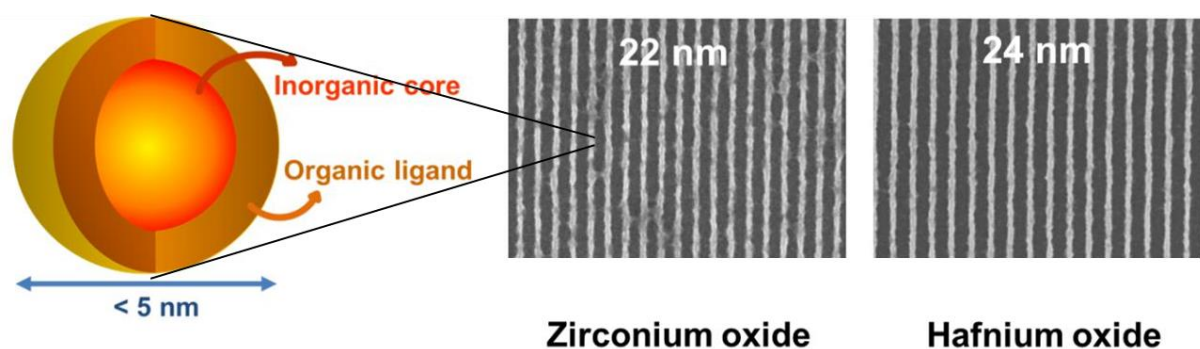


Figure I.4 : Incorporation de nanoparticules d'oxyde de métal dans les résines^{15a}

Une autre approche pour répondre aux attentes des industries est la nanofabrication avec des copolymères à blocs¹². Cette technique permet d'avoir des objets ou structures fonctionnels périodiques avec des tailles de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Les copolymères à blocs s'organisent de manière ordonnée sur une surface et l'irradiation peut provoquer la dégradation préférentielle d'un bloc.

Les mécanismes dans ces nano-objets radiosensibles n'ont pas été étudiés. De ce fait plusieurs questions se posent : Où a lieu le dépôt d'énergie ? L'effet est-il physique ou chimique ? Comment le polymère est-il dégradé ?

I.2.2 Nano-objets et radiostérilisation

I.2.2.1 Les nanovecteurs

De nos jours, le développement de systèmes nanométriques capables de transporter des médicaments est en pleine croissance¹⁶. Cette stratégie a pour but d'améliorer l'efficacité du médicament en le protégeant des dégradations engendrées par le système immunitaire du corps humain et en contrôlant sa libération dans l'organisme. Ces systèmes sont appelés nanovecteurs.

L'utilisation de ces nanovecteurs améliore l'efficacité du médicament mais réduit également la toxicité grâce au ciblage. Le principe actif est encapsulé ou lié de manière covalente au nanovecteur pour le protéger des dégradations et le véhiculer jusqu'aux cellules cibles.

La taille des nanovecteurs est cruciale pour pénétrer à l'intérieur des cellules : celle-ci doit être inférieure au micron pour éviter des problèmes thromboemboliques et être compris entre quelques dizaines et quelques centaines de nanomètres (soit la taille d'un virus) pour que le nanovecteur soit reconnu par l'organisme comme étant une particule infectieuse exogène.

Les principaux nanovecteurs à ce jour sont :

1. Les liposomes : ce sont des vésicules lipidiques délimitées par une ou plusieurs bicouches de phospholipides
2. Les nanoparticules polymères biodégradables
3. Les nanoparticules lipidiques solides
4. Les nanoparticules métalliques d'oxyde de fer
5. Les micelles de copolymères amphiphiles
6. Les polymères en étoiles
7. Les nanoémulsions
8. Les nanoparticules métalliques greffées de polymères

Les deux composantes principales d'un nanovecteur sont un cœur et une couronne qui sont fonctionnalisés selon le besoin. Le cœur permet en général d'encapsuler le principe actif ou des molécules fragiles comme l'ADN afin de les rendre invisibles aux mécanismes dégradateurs. Il permet également de contrôler la libération du principe actif. Il peut également répondre à un stimulus comme le pH ou la température. Le cœur est en général hydrophobe. La couronne, en général hydrophile, permet au système d'être furtif et de reconnaître les cibles biologiques.

Les différents nanovecteurs sont classifiés selon trois générations.

Lorsque ces nanovecteurs n'ont subi aucune modification chimique de leur surface, ils sont appelés de « première génération ».

Une fois administrés dans le corps, ces nanovecteurs sont opsonisés c'est-à-dire qu'ils sont recouverts par des protéines qui indiquent aux macrophages du foie et de la rate que ces systèmes sont étrangers à l'organisme. Il est possible par effet de répulsion stérique d'empêcher l'adsorption des opsonines sur les nanovecteurs. Pour cela, il faut les recouvrir

de polymères hydrophiles et flexibles comme le PEG. Ce sont les nanovecteurs dits de « deuxième génération » qui ont une durée de vie plus longue dans l'organisme car ils sont rendus invisibles vis-à-vis des macrophages.

Les nanovecteurs de « troisième génération » font référence aux nano-objets ayant été fonctionnalisés pour le ciblage de tissus ou de cellules. Cette fonctionnalisation se fait par le greffage de ligands à la surface du nano-objet, capable de reconnaître de manière sélective et avec une forte affinité, les cibles présentes à la surface des cellules malades. Ces ligands sont généralement des vitamines, des hormones, des peptides ou des anticorps greffés aux extrémités des PEG afin d'améliorer leur accessibilité.

L'utilisation d'un tel nanovecteur dans le corps humain nécessite au préalable une stérilisation du nano-objet.

1.2.2.2 Définition de la stérilisation et les différentes techniques

La stérilisation est définie comme un processus qui tue ou élimine de manière efficace tous les microorganismes comme les champignons, les bactéries, les virus et les formes de spores.

Le niveau d'assurance de stérilité (SAL) est le terme utilisé en microbiologie pour décrire la probabilité acceptable de microorganismes viables qui peuvent être présents dans une unité de produit individuel après stérilisation. Selon l'utilisation médicale du dispositif, il existe différentes valeurs de SAL (10^{-3} à 10^{-6}). Pour les dispositifs médicaux en contact avec le sang ou un implant ou encore une solution parentérale, un SAL de 10^{-6} égal ou inférieur est exigé.

Les principales méthodes de stérilisation sont la filtration, l'autoclavage, la stérilisation chimique (oxyde d'éthylène, formaldéhyde) et la stérilisation par irradiation aussi appelée radiostérilisation. La stérilisation par irradiation¹⁷ présente plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes : une grande capacité de pénétration, une faible augmentation de la température dans le produit durant le processus, une stérilisation homogène, précise, reproductible et facile à mettre en place. Néanmoins, cette méthode présente également des inconvénients comme le coût initial d'investissement, la peur liée à l'irradiation et les phénomènes de dégradation sous irradiation.

L'irradiation a été reconnue comme une méthode de stérilisation depuis la découverte des rayons X en 1896 et de leur capacité à inactiver les microorganismes. Cependant, l'utilisation commerciale des rayons gamma pour stériliser des produits de santé a commencé à la fin

des années 1950 et a été bien développée depuis. D'autant que la radiostérilisation a connu une grande croissance avec l'augmentation de l'utilisation de dispositifs médicaux. En effet, les nanovecteurs ne sont pas les seuls systèmes stérilisés par cette méthode. Les systèmes principalement étudiés en radiostérilisation sont sous forme solide (seringues et instruments chirurgicaux). Cependant, ni les préparations ophtalmologiques, ni l'eau pour les injections ne peuvent être stérilisées.

La dose de stérilisation généralement utilisée lorsqu'il n'y a pas d'informations sur la charge microbienne est de 25 kGy dans le cas de la radiostérilisation.

I.2.2.3 Les nano-objets radiostérilisés

Le développement des nanomédicaments et des nanovecteurs, qui doivent être manipulés en solution pour garder leur fonctionnalité, impose une radiostérilisation en solution. Dans ce paragraphe, quelques nano-objets stérilisés par irradiation sont présentés.

Les nanosphères de poly(e-caprolactone)¹⁸ sont des nanomédicaments utilisés en ophtalmologie. L'équipe de Masson¹⁸ a stérilisé ces nanosphères par autoclavage et par irradiation gamma. Alors que l'autoclavage n'a induit aucune modification sur le poids moléculaire ou le diamètre des nanosphères, l'irradiation gamma a montré une diminution du pH et une augmentation du poids moléculaire du polymère avec une réticulation des chaînes, bien que la taille des nanosphères soit restée inchangée. Bozdag et coll¹⁹. ont réalisé des nanoparticules de poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) chargées avec du ciprofloxacine HCl puis les ont stérilisées par des rayons gamma à une dose de 25 kGy. La taille moyenne de la particule n'a pas subi de changement significatif après irradiation bien que la remise en suspension soit plus difficile. De plus, le principe actif est toujours efficace après stérilisation. Des nanoparticules de poly(anhydride) mannosylés²⁰ ont été chargées avec des extraits antigéniques. Ces nano-objets ont ensuite été irradiés par des rayons gamma à 10 et 25 kGy. Ni la taille, ni la morphologie, ni le chargement en antigène n'a été modifié. Cependant à 25 kGy, l'antigène est relargué plus rapidement. L'équipe de Maksimenko²¹ a préparé des nanoparticules de poly(butyl cyanoacrylate) (PBCA) qui ont été chargées avec de la doxorubicine, un anti-cancéreux, puis stérilisées avec des rayons ionisants de type gamma ou électrons accélérés. De plus, ces nanoparticules ont été contaminées volontairement avec du *Bacillus pumilus*. Pour les deux types d'irradiation, une dose de 15 kGy est suffisante pour stériliser les nanoparticules. Aucun effet sur la taille ou la masse moléculaire n'a été observé sur les nanoparticules vides ou chargées en doxorubicine à des doses de 10, 15, 25 et 35 kGy pour les deux types d'irradiation. Seules les

nanoparticules chargées et stérilisées avec des rayons gamma à 35 kGy ont montré une augmentation de la masse molaire et de la polydispersité des polymères (PBCA). Memisoglu-Bilensoy et col.²² ont préparé des nanosphères et des nanocapsules amphiphiles « vides » à partir de β -cyclodextrin et avec du principe actif (Tamixifen) puis regardé leur comportement sous irradiation gamma dans le but de les stériliser. Les rayons gamma n'ont pas d'effet sur la taille des particules de β -cyclodextrin, ni sur le chargement ou le relargage du principe actif. Cependant, certains changements ont été mesurés sur le potentiel zêta des particules sans que cela ne change significativement les propriétés des nanoparticules.

Les études décrites ci-dessus montrent que l'irradiation est possible pour la stérilisation de nanoparticules chargées ou non en principes actifs. Cependant, il a également été montré que l'irradiation peut avoir des effets sur les nanoparticules à partir d'une certaine dose. De ce fait, il est nécessaire d'étudier chaque système de manière individuelle pour valider la méthode de stérilisation.

Plusieurs questions se posent sur l'irradiation de systèmes de taille nanométrique dans l'eau : y-a-t-il une perte de la nanostructure ? Les effets sont-ils directs ou indirects ? Les polymères en solution sont-ils plus ou moins sensibles par rapport à l'état solide ? La radiostérilisation produit-elle des résidus toxiques ?

En radiostérilisation, l'irradiation est utilisée dans le but de tuer les micro-organismes présents sur le nanovecteur tout en protégeant le médicament qu'il contient. En « drug delivery », l'effet inverse est recherché : l'irradiation doit détruire le nanovecteur afin de libérer le médicament.

I.2.3 Nano-objets et « drug delivery »

Les nanovecteurs dits intelligents sont capables de relarguer le principe actif suite à un stimulus. Un stimulus est un facteur physique capable à un temps donné de provoquer une réponse susceptible de dégrader le nanovecteur pour délivrer le médicament. Parmi les stimuli couramment utilisés, on compte la modification du pH, de la température, de la force ionique ou encore du champ magnétique. Par contre, l'irradiation a été très peu utilisée comme stimulus. Pourtant, cette stratégie propose plusieurs avantages.

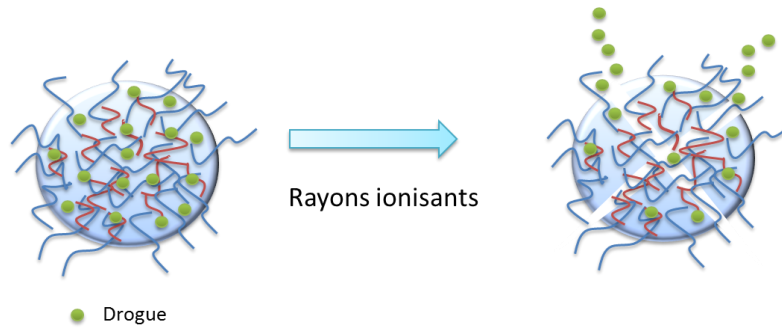


Figure I.5 : Relargage d'un nanovecteur sous irradiation

L'utilisation d'un nanovecteur capable de se dégrader sous irradiation permet de protéger le principe actif jusqu'aux cellules cancéreuses et d'augmenter l'effet de la radiothérapie en utilisant un principe actif capable d'agir au même moment. De plus, par le positionnement du faisceau, l'efficacité de ce processus est améliorée. Ce mode de relargage combine à la fois la chimiothérapie liée au principe actif et la radiothérapie liée aux rayonnements ionisants.

L'équipe de Zhang²³ a synthétisé des copolymères amphiphiles à base de PEG-PU-Se-Se-PEG (PU = polyuréthane) contenant une liaison diséléniure. Cette liaison est connue pour avoir une faible énergie de liaison ($172 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) permettant aux micelles formées dans l'eau par auto-assemblage d'être radiosensibles. La doxorubicine a été encapsulée dans ces micelles. Le relargage de 45 % de ce principe actif est observé dès une dose d'irradiation de 5 Gy (rayons gamma). Cette dose est proche de celle reçue par un patient en radiothérapie (2 Gy par jour).

La même équipe a aussi développé des liposomes sensibles aux rayons X par le co-assemblage de phospholipides et de composés contenant des diséléniures²⁴. La doxorubicine est également chargée dans ces liposomes qui la relarguent à 45 % avec une dose de 15 Gy. Des brins d'ADN dits amphiphiles ont été synthétisés avec des liaisons soufre. La dégradation de ces brins d'ADN après auto-assemblage ainsi que le relargage du principe actif encapsulé sous irradiation hypoxique (en absence d'oxygène) a été montré pour une dose de 360 Gy²⁵. L'irradiation en condition hypoxique est faite pour mimer les conditions dans les cellules cancéreuses connues pour être privées d'oxygène.

Ce sont principalement des nanoparticules polymères qui sont utilisées sous irradiation en lithographie, radiostérilisation et « drug delivery ». Alors que les nanoparticules métalliques sont plutôt utilisées dans le domaine de la radiosensibilisation.

I.2.4 Nano-objets hybrides et radiosensibilisation

I.2.4.1 Définition

Les nanoparticules métalliques ont montré à travers leurs propriétés physiques et chimiques un grand potentiel d'applications et de perspectives. Parmi celles-ci, on compte l'amélioration des traitements déjà existants pour le cancer comme la radiothérapie. Les rayonnements ionisants de hautes énergies comme les rayons gamma ou les rayons X sont souvent utilisés pour ioniser les composantes cellulaires ou l'eau et ainsi détruire les cellules²⁶. Depuis quelques années, il y a eu un intérêt considérable pour l'utilisation de formulations pour améliorer les effets radiothérapeutiques, notamment dans l'utilisation de nanoparticules d'or. L'idée d'utiliser des matériaux avec des numéros atomiques élevés pour améliorer l'effet de l'irradiation a vu le jour dans les années 1970 lorsque l'iode a été utilisé sur des patients pour faire une angiographie et qu'une toxicité au niveau des lymphocytes a été observée²⁷. Parmi les radiosensibilisateurs fréquemment étudiés dans la littérature, on retrouve les nanoparticules métalliques, les quantum dots²⁸, les oxydes (de fer²⁹, de gadolinium³⁰, de titane³¹ et d'hafnium³²) et les nanoparticules non métalliques (silice³³ ou fullerène³⁴). Les premières sont les plus étudiées, en particulier les nanoparticules d'or.

I.2.4.2 Les nanoparticules d'or

Parmi les nanoparticules métalliques, les nanoparticules d'or sont les candidates idéales pour la radiosensibilisation. En effet, ces nanoparticules présentent de nombreux avantages³⁵ :

- L'or est connu pour être inerte et biocompatible
- Les nanoparticules peuvent être éliminées lentement par le corps ce qui leur permet d'avoir suffisamment de temps pour être absorbées dans les tissus tumoraux
- Elles sont connues pour avoir une bonne circulation et une meilleure pénétration dans les tissus tumoraux. Associé à leur faible clairance, on obtient l'effet EPR (Enhance Permeation and Retention)
- En attachant des molécules cibles comme des anticorps, les nanoparticules peuvent être délivrées en plus grand nombre et de manière spécifique aux tissus tumoraux
- La taille et la forme des nanoparticules sont modulables selon les tissus ciblés
- Les nanoparticules étant faciles à imager et à quantifier, les études dans les tissus peuvent être optimisées

La première étude sur la radiosensibilisation par des nanoparticules d'or a été faite par Hainfield et coll³⁶. Il a été montré que la régression de la tumeur chez des souris, avec une augmentation significative de la survie d'un an, passait de 20 % avec des rayons X seuls, à 86 % lorsque ces rayons X sont combinés à des nanoparticules d'or. Cette étude *in vivo* a précédé de nombreuses autres études majoritairement *in vitro* afin de caractériser les effets radiosensibilisants de l'or. Il est difficile de tirer des conclusions de ces très nombreuses études qui ont suivies. Ces expériences ont été résumées dans plusieurs revues^{26b, 35, 37}.

Un tableau non exhaustif (présenté en Annexe 5) reprend les différentes études menées *in vitro* sur les nanoparticules d'or en tant que radiosensibilisateurs. Ce tableau tient compte de différentes caractéristiques comme l'année d'étude, la taille, la concentration et le revêtement des nanoparticules, la lignée cellulaire utilisée ainsi que le type d'irradiation et son énergie. Enfin, l'effet radiosensibilisateur est quantifié en général en terme de facteur d'augmentation de la dose d'irradiation (DEF) mais pas toujours.

La première observation faite à partir du tableau est la diversité des informations apportées mais surtout l'absence de paramètres communs entre les différentes études. En effet, la taille des nanoparticules étudiées varient de 1,9 nm à 74 nm, leur effet radiosensibilisant est étudié sur des lignées cellulaires (cellules normales ou cancéreuses, animales ou humaines) ou sur d'autres cibles biologiques comme l'ADN ou des protéines. De plus les critères de radiosensibilisation ne sont pas toujours évalués selon le DEF. Un autre paramètre beaucoup étudié est la concentration. Il existe cependant une ambiguïté dans la littérature concernant la concentration reportée. Dans certains cas, il s'agit de la concentration molaire en nanoparticules d'or et dans d'autres, c'est la concentration en or atomique. Or ces deux concentrations ont des ordres de grandeur très différents. Le second tableau en Annexe 5 donne la conversion entre ces deux concentrations pour une concentration molaire initiale en particules de 1 nM. Le plus simple nous semble de travailler avec des concentrations massiques en or qui rend compte du pourcentage massique en or impliqué dans l'effet radiosensibilisant.

La radiosensibilisation est plus ou moins importante selon la source d'irradiation utilisée et selon les études. La grande majorité des travaux présente des nanoparticules avec des molécules à la surface (citrate, thiol). Lorsque les nanoparticules sont recouvertes avec du polymère, il s'agit en général de polyéthylène glycol (PEG). La présence d'une macromolécule en surface des nanoparticules ne semble pas affecter leur effet radiosensibilisant. Enfin, Zhou et coll.³⁸ ont étudié la radiosensibilisation de nanoparticules

d'or couplées avec de la doxorubicine. Le DEF n'a pas été calculé dans ce cas, mais les auteurs ont constaté une augmentation de la mort cellulaire d'un facteur supérieur à 2,5.

Malgré les nombreuses études présentes dans la littérature, il n'est pas possible de prévoir l'effet de l'irradiation sur les nanoparticules. Le mécanisme à l'origine de cet effet radiosensibilisant n'est pas vraiment identifié. De nombreuses questions se posent encore : A quelle étape l'effet se produit-il ? Où a lieu le dépôt d'énergie ? Est-ce lié à la radiolyse de l'eau ? Y a-t-il une catalyse de surface ? De plus, l'effet est-il local ou à distance ? Physique ou chimique ?

Pour mieux comprendre les phénomènes à l'origine de l'effet radiosensibilisateur des nanomatériaux, l'interaction entre les rayonnements et la nanoparticule est étudiée. Dans les cellules, les nanomatériaux sont principalement entourés d'eau. Les produits issus de la radiolyse de l'eau sont également impliqués dans ce phénomène.

1.2.4.3 Mécanismes hypothétiques à l'origine de l'effet radiosensibilisateur

En théorie, en présence d'éléments hautement absorbants dans les tumeurs, la photoabsorption des rayons X ou gamma dans les tissus peut-être efficacement augmentée en réglant l'énergie des rayons à celle de l'absorption de la couche interne des éléments ciblés. Cette photoabsorption amène à l'émission d'électrons selon, trois interactions principales qui sont susceptibles d'amplifier physiquement les doses reçues.

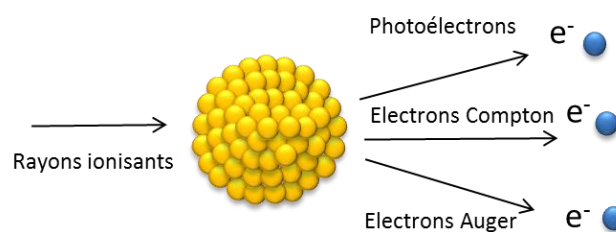


Figure 1.6 : Interaction entre des rayons ionisants et des nanomatériaux

Les photoélectrons et électrons Compton conduiraient à une augmentation de la dose à longue distance des particules, alors que les électrons Auger, de plus faible énergie, auraient un effet local.

De fait, expérimentalement, deux types d'amplifications physiques ont été identifiés : l'amplification physique de type 1 (APT1) et l'amplification physique de type 2 (APT2). L'APT1 est causée par des électrons énergétiques qui peuvent traverser plusieurs microns dans l'eau et se répandre de manière uniforme à travers tout le volume de l'échantillon. Cette

amplification est indépendante de la localisation du nanomatériau. L'APT2, qui serait causée par des électrons de faible énergie de type Auger, est confinée à la région en surface du nanomatériau (à une dizaine de nanomètre de la surface). De ce fait, cette amplification est appelée amplification physique locale.

Selon le matériau et l'énergie des rayonnements utilisée, on observe de manière majoritaire l'une des deux amplifications. Les électrons émis lors de ces phénomènes par les nanomatériaux étant des sources d'irradiation secondaires, ils vont agir en augmentant les concentrations des produits issus de la radiolyse de l'eau et en particulier, la production d'espèces activées de l'oxygène (ROS). Récemment, un nouveau mécanisme a été proposé par Guo et coll³⁹. qui met en jeu à la fois les ROS et la surface des nanomatériaux : l'amplification chimique (AC). En effet, les ions superoxydes (O_2^-) générés par la radiolyse de l'eau peuvent réagir avec la surface des nanoparticules pour constituer une source secondaire de radicaux hydroxyles.

La Figure I.7 résume les différents phénomènes pouvant avoir lieu lors de l'irradiation de nanomatériaux dans l'eau.

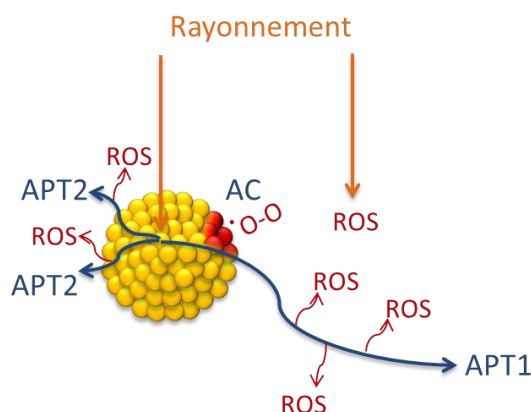


Figure I.7 : Phénomènes survenant lors de l'irradiation d'un nanomatériau

Dans cette partie, différents nano-objets utilisés sous irradiation ont été présentés. Bien qu'ils soient présents dans différents domaines (lithographie, radiostérilisation, « drug delivery » et radiosensibilisation), ils sont tous utilisés dans le but de produire un effet par rapport à l'irradiation. En lithographie, les nano-objets sont utilisés pour créer un modèle de taille nanométrique sous irradiation. En radiostérilisation, le nano-objet doit être capable de garder sa forme après irradiation et empêcher le principe actif d'être relargué. Alors qu'en

« drug delivery », les nano-objets doivent délivrer des principes actifs à l'endroit désiré après irradiation. Enfin, en radiosensibilisation, la nanoparticule d'or est évaluée sur sa capacité à augmenter l'effet de l'irradiation. Dans tous les cas cités ci-dessus, l'intérêt de l'étude est porté sur les effets engendrés par l'irradiation, dans des gammes de dose très variables. On s'intéresse dans le cadre de cette thèse à étudier le comportement de ces nano-objets sous irradiation conduisant à ces effets.

I.3 Positionnement du sujet et objectifs de la thèse

Le point commun des différents nano-objets organiques étudiés ci-dessus est le fait qu'ils soient des systèmes de taille nanométrique contenant des polymères soumis à des rayonnements. Cependant, l'effet attendu de l'irradiation n'est pas le même. Dans certains cas, il doit être maximum (radiosensibilisation, lithographie, relargage) et dans d'autres, minimum (radiostérilisation). L'hétérogénéité de ces systèmes à l'échelle nanométrique amène à poser plusieurs questions.

Comment les processus de dépôt d'énergie sont-ils modifiés à ces échelles ? Y a-t-il des transferts d'énergie entre les différentes parties des nano-objets ? Cette question est particulièrement importante lorsqu'un effet radiosensibilisant est visé.

Les rendements et les mécanismes radiolytiques sont-ils modifiés par cette nano-hétérogénéité ? En particulier, dans le cas de polymères en suspension dans l'eau, quel est l'effet de la radiolyse du solvant sur le polymère ? Y a-t-il des sites privilégiés de production/consommation de radicaux ?

Les processus d'irradiation peuvent-ils altérer la nanostructure ? La forme des nano-objets, et donc leurs propriétés spécifiques, sont-elles modifiées ?

Il est important de bien maîtriser *via* la compréhension des effets mis en jeu, tous ces aspects des systèmes pour pouvoir envisager une application.

Nous proposons ici de synthétiser des nano-objets dits modèles pouvant répondre à ces questions. Deux structures organisées sont envisagées. D'une part, des structures de type micelles à partir de copolymères amphiphiles généralement retrouvées en radiostérilisation et « drug delivery ». D'autre part, une structure hybride nanoparticule métallique greffée

polymères permettant de répondre aux questions relatives au domaine de la radiosensibilisation, lithographie et « drug delivery ».

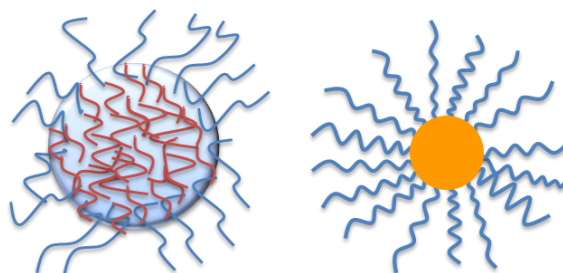


Figure I.8 : Structures des nano-objets modèles (micelle polymère et nanoparticule métallique greffée polymère)

Les copolymères à blocs amphiphiles s'organisent en micelles ou nanoparticules dans l'eau. Deux types de copolymères ont été synthétisés. La nature du bloc hydrophobe varie d'un copolymère à l'autre par sa sensibilité aux rayons ionisants. Un polyéthylène glycol (PEG) fonctionnalisé utilisé comme macro-amorceur va permettre de copolymériser par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP) un méthacrylate formant le premier copolymère à bloc PEG-*b*-poly(méthacrylate de *tert*-butyle) (PEG-*b*-PMA*t*Bu). En effet, les polyméthacrylates ont été choisis car ils sont connus pour se dégrader sous irradiation. Le second copolymère est à base de polysulfone aliphatique connu pour être particulièrement radiosensible. Sa synthèse est réalisée *via* une chimie plus complexe basée sur une polyaddition thiol-ène (chimie click), suivie d'un couplage avec un PEG fonctionnalisé formant un copolymère à bloc PEG-*b*-Polysulfone (PEG-*b*-PSu). Les nano-objets formés par auto-assemblage dans l'eau par une technique de nanopréciipitation, sont caractérisés avant et après irradiation par des techniques de diffusion (lumière et neutron), de spectroscopie (RMN, FTIR) et de chromatographie d'exclusion stérique (CES).

Les nano-objets hybrides, à travers l'étude de la couronne de polymère après irradiation, vont permettre de localiser les effets de l'irradiation en présence de la nanoparticule. La nanoparticule métallique (NP) est une NP d'or qui sera greffée de polymères hydrophiles (PMAA). Les polymères seront obtenus par ATRP suivie d'une hydrolyse et caractériser par CES. Les NPs d'or greffées de polymères seront obtenues *via* une méthode « grafting to ». Ensuite, les nano-objets seront caractérisés par des techniques de diffusion de rayons X (SAXS) et neutrons (DNPA) aux petits angles. Ces nano-objets pourront ensuite être irradiés et leur comportement étudié à la fois sur la taille par les techniques de diffusion mais aussi sur la masse molaire des polymères par CES.

I.4 Références

1. (a) El Omar, A. K. Études des réactions primaires en solutions par la radiolyse pulsée picoseconde. Thèse de doctorat, Université Paris Sud, **2013**; (b) Mozumder, A.; Hatano, Y., *Charged Particle and Photon Interactions with Matter: Chemical, Physicochemical, and Biological Consequences with Applications*. CRC Press: **2003**.
2. (a) Ivanov, V. S., *Radiation Chemistry of Polymers*. Taylor & Francis: **1992**; (b) Ferry, M.; Ngono-Ravache, Y.; Aymes-Chodur, C.; Clochard, M. C.; Coqueret, X.; Cortella, L.; Pellizzi, E.; Rouif, S.; Esnouf, S., Ionizing Radiation Effects in Polymers. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier: **2016**.
3. (a) Chen, Y., Nanofabrication by electron beam lithography and its applications: A review. *Microelectronic Engineering* **2015**, *135*, 57-72; (b) Acikgoz, C.; Hempenius, M. A.; Huskens, J.; Vancso, G. J., Polymers in conventional and alternative lithography for the fabrication of nanostructures. *European Polymer Journal* **2011**, *47* (11), 2033-2052; (c) Sugita, K.; Ueno, N., Resists for microlithography: Present status and recent research trends. *Progress in Polymer Science* **1992**, *17* (3), 319-360; (d) Gonsalves, K. E.; Merhari, L.; Wu, H.; Hu, Y., Organic-Inorganic Nanocomposites: Unique Resists for Nanolithography. *Advanced Materials* **2001**, *13* (10), 703-714.
4. Ito, H. In *Chemically amplified resists: past, present, and future*, Proc. SPIE 3678, Advances in Resist Technology and Processing XVI, **2,1999**; pp 2-12.
5. (a) Chen, W.; Ahmed, H., Fabrication of 5–7 nm wide etched lines in silicon using 100 keV electron-beam lithography and polymethylmethacrylate resist. *Applied Physics Letters* **1993**, *62* (13), 1499-1501; (b) Chen, W.; Ahmed, H., Fabrication of high aspect ratio silicon pillars of <10 nm diameter. *Applied Physics Letters* **1993**, *63* (8), 1116-1118; (c) Olkhovets, A.; Craighead, H. G., Low voltage electron beam lithography in PMMA. *Journal of Vacuum Science & Technology B* **1999**, *17* (4), 1366-1370.
6. Tanenbaum, D. M.; Lo, C. W.; Isaacson, M.; Craighead, H. G.; Rooks, M. J.; Lee, K. Y.; Huang, W. S.; Chang, T. H. P., High resolution electron beam lithography using ZEP-520 and KRS resists at low voltage. *Journal of Vacuum Science & Technology B* **1996**, *14* (6), 3829-3833.
7. Berreman, D. W.; Bjorkholm, J. E.; Becker, M.; Eichner, L.; Freeman, R. R.; Jewell, T. E.; Mansfield, W. M.; MacDowell, A. A.; O'Malley, M. L.; Raab, E. L.; Silfvast, W. T.; Szeto, L. H.; Tennant, D. M.; Waskiewicz, W. K.; White, D. L.; Windt, D. L.; Wood, O. R., Use of trilevel resists for high-resolution soft-x-ray projection lithography. *Applied Physics Letters* **1990**, *56* (22), 2180-2182.
8. Bowden, M. J.; Thompson, L. F., Electron irradiation of poly(olefin sulfones). Application to electron beam resists. *Journal of Applied Polymer Science* **1973**, *17* (10), 3211-3221.
9. Hill, D. J. T.; Whittaker, A. K., Radiation Chemistry of Polymers. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.: **2002**.
10. Brown, J. R.; O'Donnell, J. H., The Degradation of Poly(butene-1 sulfone) during γ Irradiation. *Macromolecules* **1970**, *3* (2), 265-267.
11. Reichmanis, E.; Nalamasu, O.; Houlihan, F. M., Organic Materials Challenges for 193 nm Imaging. *Accounts of Chemical Research* **1999**, *32* (8), 659-667.
12. Bratton, D.; Yang, D.; Dai, J.; Ober, C. K., Recent progress in high resolution lithography. *Polymers for Advanced Technologies* **2006**, *17* (2), 94-103.

13. Matsuzawa, N. N.; Oizumi, H.; Mori, S.; Irie, S.; Yano, E.; Okazaki, S.; Ishitani, A., Theoretical estimation of absorption coefficients of various polymers at 13 nm. *Microelectronic Engineering* **2000**, *53* (1), 671-674.
14. Wood, O. R., II; Bjorkholm, J. E.; Dreyer, K. F.; Fetter, L.; Himel, M. D.; Freeman, R. R.; Tennant, D. M.; Griffith, J. E.; Taylor, G. N.; et al. , Experiments and simulations of EUV lithographic resist patterning at wavelengths from 7 to 40 nm *OSA Proc. Extreme Ultraviolet Lithogr., Proc. Top. Meet.* **1995**.
15. (a) Chakrabarty, S.; Sarma, C.; Li, L.; Giannelis, E. P.; Ober, C. K. In *Increasing sensitivity of oxide nanoparticle photoresists*, **2014**; pp 90481C-90481C-5; (b) Li, L.; Chakrabarty, S.; Spyrou, K.; Ober, C. K.; Giannelis, E. P., Studying the Mechanism of Hybrid Nanoparticle Photoresists: Effect of Particle Size on Photopatterning. *Chemistry of Materials* **2015**, *27* (14), 5027-5031; (c) Li, L.; Chakrabarty, S.; Jiang, J.; Zhang, B.; Ober, C.; Giannelis, E. P., Solubility studies of inorganic-organic hybrid nanoparticle photoresists with different surface functional groups. *Nanoscale* **2016**, *8* (3), 1338-1343.
16. Couvreur, P., Les nanotechnologies pour la conception de nouveaux médicaments. *Biologie Aujourd'hui* **2012**, *206* (4), 237-248.
17. (a) Darwis, D.; Erizal; Abbas, B.; Nurlidar, F.; Putra, D. P., Radiation Processing of Polymers for Medical and Pharmaceutical Applications. *Macromolecular Symposia* **2015**, *353* (1), 15-23; (b) Silindir, M.; Özer, Y., The Effect of Radiation on a Variety of Pharmaceuticals and materials containing polymers. *PDA J Pharm Sci Technol.* **2012**, *66*(2), 184-99.
18. Masson, V.; Maurin, F.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P., Influence of sterilization processes on poly(ϵ -caprolactone) nanospheres. *Biomaterials* **1997**, *18* (4), 327-335.
19. Bozdog, S.; Dillen, K.; Vandervoort, J.; Ludwig, A., The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2005**, *57* (6), 699-707.
20. Da Costa Martins, R.; Gamazo, C.; Irache, J. M., Design and influence of γ -irradiation on the biopharmaceutical properties of nanoparticles containing an antigenic complex from *Brucella ovis*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *37* (5), 563-572.
21. Maksimenko, O.; Pavlov, E.; Tushov, E.; Molin, A.; Stukalov, Y.; Prudskova, T.; Feldman, V.; Kreuter, J.; Gelperina, S., Radiation sterilisation of doxorubicin bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *356* (1-2), 325-332.
22. Memisoglu-Bilensoy, E.; Hincal, A. A., Sterile, injectable cyclodextrin nanoparticles: Effects of gamma irradiation and autoclaving. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *311* (1-2), 203-208.
23. Ma, N.; Xu, H.; An, L.; Li, J.; Sun, Z.; Zhang, X., Radiation-Sensitive Diselenide Block Copolymer Micellar Aggregates: Toward the Combination of Radiotherapy and Chemotherapy. *Langmuir* **2011**, *27* (10), 5874-5878.
24. Meng F-x.; X. H.-p.; Qi Y-f.; Xu K.; Song X-l.; Niu S.; Li J., Preliminary Studies on X-Ray-sensitive Liposome. *Chemical research in chinese universities* **2012**, *28* (2), 319-322.
25. Tanabe, K.; Asada, T.; Ito, T.; Nishimoto, S.-i., Radiolytic Reduction Characteristics of Drug-Encapsulating DNA Aggregates Possessing Disulfide Bond. *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23* (9), 1909-1914.

26. (a) Paunesku, T.; Gutiontov, S.; Brown, K.; Woloschak, G. E., Radiosensitization and Nanoparticles. In *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer*, Mirkin, A. C.; Meade, J. T.; Petrosko, H. S.; Stegh, H. A., Eds. Springer International Publishing: Cham, **2015**; pp 151-171; (b) Kwatra, D.; Venugopal, A.; Anant, S., Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Translational cancer research* **2013**, *2* (4), 330-342.
27. Adams, F. H.; Norman, A.; Mello, R. S.; Bass, D., Effect of Radiation and Contrast Media on Chromosomes. *Radiology* **1977**, *124* (3), 823-826.
28. (a) Juzenas, P.; Chen, W.; Sun, Y.-P.; Coelho, M. A. N.; Generalov, R.; Generalova, N.; Christensen, I. L., Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (15), 1600-1614; (b) Bakalova, R.; Ohba, H.; Zhelev, Z.; Ishikawa, M.; Baba, Y., Quantum dots as photosensitizers? *Nat Biotech* **2004**, *22* (11), 1360-1361.
29. (a) Huang, G.; Chen, H.; Dong, Y.; Luo, X.; Yu, H.; Moore, Z.; Bey, E. A.; Boothman, D. A.; Gao, J., Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Amplifying ROS Stress to Improve Anticancer Drug Efficacy. *Theranostics* **2013**, *3* (2), 116-126; (b) Klein, S.; Sommer, A.; Distel, L. V. R.; Neuhuber, W.; Kryschi, C., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *425* (2), 393-397.
30. (a) Young, S. W.; Qing, F.; Harriman, A.; Sessler, J. L.; Dow, W. C.; Mody, T. D.; Hemmi, G. W.; Hao, Y.; Miller, R. A., Gadolinium(III) texaphyrin: a tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93* (13), 6610-6615; (b) Bernhard, E. J.; Mitchell, J. B.; Deen, D.; Cardell, M.; Rosenthal, D. I.; Brown, J. M., Re-Evaluating Gadolinium(III) Texaphyrin as a Radiosensitizing Agent. *Cancer Research* **2000**, *60* (1), 86-91; (c) Rima, W.; Sancey, L.; Aloy, M.-T.; Armandy, E.; Alcantara, G. B.; Epicier, T.; Malchère, A.; Joly-Pottuz, L.; Mowat, P.; Lux, F.; Tillement, O.; Burdin, B.; Rivoire, A.; Boulé, C.; Anselme-Bertrand, I.; Pourchez, J.; Cottier, M.; Roux, S.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Perriat, P., Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles. *Biomaterials* **2013**, *34* (1), 181-195.
31. (a) Townley, H. E.; Kim, J.; Dobson, P. J., In vivo demonstration of enhanced radiotherapy using rare earth doped titania nanoparticles. *Nanoscale* **2012**, *4* (16), 5043-5050; (b) Mirjolet, C.; Papa, A. L.; Créhange, G.; Raguin, O.; Seignez, C.; Paul, C.; Truc, G.; Maingon, P.; Millot, N., The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: A proof-of-concept. *Radiotherapy and Oncology* **2013**, *108* (1), 136-142; (c) Blatnik, J.; Luebke, L.; Simonet, S.; Nelson, M.; Price, R.; Leek, R.; Zeng, L.; Wu, A.; Brown, E., Dye Surface Coating Enables Visible Light Activation of TiO₂ Nanoparticles Leading to Degradation of Neighboring Biological Structures. *Microscopy and Microanalysis* **2012**, *18* (01), 134-142.
32. Maggiorella, L.; Barouch, G.; Devaux, C.; Pottier, A.; Deutsch, E.; Bourhis, J.; Borghi, E.; Levy, L., Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncology* **2012**, *8* (9), 1167-1181.
33. Klein, S.; Dell'Arciprete, M. L.; Wegmann, M.; Distel, L. V. R.; Neuhuber, W.; Gonzalez, M. C.; Kryschi, C., Oxidized silicon nanoparticles for radiosensitization of cancer and tissue cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2013**, *434* (2), 217-222.
34. Zhang, Q.; Yang, W.; Man, N.; Zheng, F.; Shen, Y.; Sun, K.; Li, Y.; Wen, L.-P., Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C₆₀ nanocrystal. *Autophagy* **2009**, *5* (8), 1107-1117.

35. (a) Jeremic, B.; Aguerri, A. R.; Filipovic, N., Radiosensitization by gold nanoparticles. *Clinical and Translational Oncology* **2013**, *15* (8), 593-601; (b) Hainfeld, J. F.; Dilmanian, F. A.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M., Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2008**, *60* (8), 977-985.
36. James, F. H.; Daniel, N. S.; Henry, M. S., The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine and Biology* **2004**, *49* (18), N309.
37. (a) Mesbahi, A., A review on gold nanoparticles radiosensitization effect in radiation therapy of cancer. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* **2010**, *15* (6), 176-180; (b) Jain, S.; Hirst, D. G.; O'Sullivan, J. M., Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *The British Journal of Radiology* **2012**, *85* (1010), 101-113; (c) Butterworth, K. T.; McMahon, S. J.; Currell, F. J.; Prise, K. M., Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale* **2012**, *4* (16), 4830-4838; (d) Dorsey, J. F.; Sun, L.; Joh, D. Y.; Witztum, A.; Kao, G. D.; Alonso-Basanta, M.; Avery, S.; Hahn, S. M.; Al Zaki, A.; Tsourkas, A., Gold nanoparticles in radiation research: potential applications for imaging and radiosensitization. *Translational cancer research* **2013**, *2* (4), 280-291; (e) Coulter, J. A.; Hyland, W. B.; Nicol, J.; Currell, F. J., Radiosensitising Nanoparticles as Novel Cancer Therapeutics — Pipe Dream or Realistic Prospect? *Clinical Oncology* **2013**, *25* (10), 593-603; (f) Retif P, P. S., Toussaint M, Frochot C, Chouikrat R, Bastogne T, Barberi-Heyob M., Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. *Theranostics* **2015**, *5* (9), 1030-1044; (g) Bergs, J. W. J.; Wacker, M. G.; Hehlhans, S.; Piiper, A.; Multhoff, G.; Rödel, C.; Rödel, F., The role of recent nanotechnology in enhancing the efficacy of radiation therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2015**, *1856* (1), 130-143; (h) Yamada, M.; Foote, M.; Prow, T. W., Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2015**, *7* (3), 428-445.
38. Zhou, H.; Zhang, Y.; Su, G.; Zhai, S.; Yan, B., Enhanced cancer cell killing by a targeting gold nanoconstruct with doxorubicin payload under X-ray irradiation. *RSC Advances* **2013**, *3* (44), 21596-21603.
39. Cheng, N. N.; Starkewolf, Z.; Davidson, R. A.; Sharmah, A.; Lee, C.; Lien, J.; Guo, T., Chemical Enhancement by Nanomaterials under X-ray Irradiation. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (4), 1950-1953.

CHAPITRE II

II. Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

Contenu

II. Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles	47
II.1 Les copolymères à blocs amphiphiles	48
II.1.1 Définition/ Avantages.....	48
II.1.2 Méthodes de synthèses	49
II.2 Copolymères à blocs PEG- <i>b</i> -polyméthacrylate	56
II.2.1 Synthèse par polymérisation radicalaire contrôlée	56
II.2.2 Auto-assemblage par nanoprécipitation.....	61
II.3 Copolymères à blocs PEG- <i>b</i> -polysulfone	70
II.3.1 Synthèse par chimie « click »	70
II.3.2 Auto-assemblage par nanoprécipitation.....	77
II.4 Tests de cytotoxicité <i>in vitro</i>	80
II.5 Conclusion	83
II.6 Références	84

Ce deuxième chapitre porte sur la synthèse de nano-objets à base de copolymères à blocs amphiphiles. Ces structures sont en effet largement utilisées dans les domaines de radiostérilisation et de « drug-delivery » (relargage) et aussi, dans une moindre mesure, dans le domaine de la lithographie. Après un rappel sur les différentes méthodes de synthèse de copolymères à blocs amphiphiles, les deux types de copolymères synthétisés dans ce travail seront décrits. La partie hydrophile est le poly(éthylène glycol) (PEG), tandis que la partie hydrophobe est le poly (méthacrylate de *tert*-butyle) (PMA*t*Bu) ou un polysulfone (PSu) aliphatique. Le PMA*t*Bu a été choisi car la dégradation du poly(méthacrylate de méthyle) a déjà été étudié sous irradiation au Laboratoire sous forme de films minces, et a prouvé son efficacité en terme de relargage. Ce polymère est connu pour se dégrader sous irradiation par coupures de chaînes¹. Le PMA*t*Bu possède aussi des groupements hydrolysables qui peuvent être utiles pour un éventuel greffage de principes actifs. Le polysulfone aliphatique est quant à lui connu pour être particulièrement sensible aux irradiations en se dégradant par coupures de chaînes avec le départ de SO₂.² Il est déjà utilisé dans le domaine de la lithographie³. Ces copolymères sont caractérisés par des méthodes classiques (RMN ¹H, FTIR, CES). Les micelles obtenues après auto-assemblage par une méthode de nanoprecipitation, sont étudiées par microscopie électronique à transmission (TEM) ainsi que par des techniques de diffusion : lumière (DLS) et neutrons (DNPA).

II.1 Les copolymères à blocs amphiphiles

II.1.1 Définition/ Avantages

Un copolymère est dit « à blocs » lorsqu'il est constitué d'une chaîne macromoléculaire possédant deux segments consécutifs de natures différentes. Le terme amphiphile est utilisé pour caractériser certains de ces copolymères lorsque les deux segments présentent des affinités chimiques opposées : l'un des deux segments ou blocs est soluble dans un solvant et l'autre ne l'est pas. Dans le cas où ce solvant est l'eau, un bloc est dit hydrophile et l'autre hydrophobe.

L'auto-assemblage de copolymères à blocs conduit à de nombreuses structures complexes⁴, grâce à leurs propriétés modulables par la variation du type de monomère ou la taille et la proportion des blocs constituants. De plus, lorsque ces blocs sont amphiphiles, les objets obtenus en solution forment des structures plus ou moins définies qui trouvent un intérêt

dans de nombreux domaines d'applications comme la vectorisation ou l'encapsulation de médicaments⁵, ou encore la lithographie⁶.

Il existe deux grandes méthodes pour obtenir des copolymères à blocs. La première consiste à polymériser un monomère B à partir d'un macro-amorceur A préformé. Le macro-amorceur A étant un homopolymère dont le bout de chaîne est capable d'amorcer la polymérisation du monomère B. La seconde est une réaction de couplage entre les extrémités de chaînes de deux homopolymères A et B conduisant à la formation d'une liaison covalente. Cette réaction doit être sélective, rapide et totale grâce à la faible concentration des bouts de chaînes réactifs opposés et à l'encombrement stérique des polymères.

II.1.2 Méthodes de synthèses

La première méthode nécessite que la polymérisation soit contrôlée afin d'obtenir un bloc de longueur choisie. Dans ce domaine, l'apport de la polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) a été notable. Avant de présenter les différents travaux qui ont été faits par cette méthode, il est important de rappeler ce qu'est une PRC.

II.1.2.1 La polymérisation radicalaire contrôlée

II.1.2.1.1 Principe de la PRC

La polymérisation radicalaire « classique » est une technique très largement utilisée car elle est facile à mettre en place et applicable à une large gamme de monomères. Néanmoins, elle présente de nombreux inconvénients liés à la grande réactivité des radicaux alkyles qui entraîne des réactions de terminaison irréversibles. De ce fait, ces polymérisations sont difficiles à contrôler et engendrent des chaînes polymères avec de large polymolécularité. A l'inverse, une polymérisation dite « vivante » comme la polymérisation anionique où les réactions de terminaisons sont inexistantes, permet la synthèse de polymères avec des structures parfaitement définies mais les conditions sont très strictes rendant sa mise en œuvre difficile.

Une polymérisation vivante se caractérise par une propagation continue sans réaction de transfert ou de terminaison, tout au long de la polymérisation, grâce à la réactivité du groupement terminal qui est maintenue. En PRC, cette propagation continue peut être obtenue par le piégeage réversible de macroradicaux en croissance, permettant de travailler à une concentration suffisamment faible en radicaux pour que les terminaisons irréversibles

soit négligeables. Les réactions de transfert et de terminaison sont toujours partiellement présentes en PRC même si elles sont majoritairement réduites. Cette polymérisation est ainsi qualifiée de « contrôlée » et non de « vivante ».

Une polymérisation radicalaire contrôlée permet la synthèse de chaînes polymères présentant une polymolécularité faible. Cela se traduit par une homogénéité en taille mesurable par l'indice de polymolécularité I_p qui est le rapport de la masse molaire moyenne en masse (M_w) sur la masse molaire moyenne en nombre (M_n). Matyjaszewski et coll.⁷ ont défini une polymérisation radicalaire contrôlée lorsqu'elle valide les points suivants :

- La durée de l'amorçage doit être courte devant le temps de polymérisation, et la vitesse d'échange entre chaînes dormantes et chaînes en croissance doit être au moins aussi rapide que la vitesse de propagation
- L'évolution de $\ln ([M]_0/[M])$ en fonction du temps doit être linéaire, avec $[M]$ la concentration en monomère au temps t et $[M]_0$ la concentration initiale
- La masse molaire du polymère doit varier linéairement avec la conversion et cette évolution doit suivre une courbe théorique $M_n = DP_n * M_{\text{mono}} = ([M]_0 - [M])/[A]_0$, avec DP_n le degré de polymérisation, M_{mono} est la masse molaire du monomère et $[A]_0$ la concentration initiale en amorceur
- L'indice de polymolécularité doit diminuer avec la conversion pour tendre vers celui d'une distribution de Poisson ($I_p = 1 + 1/DP_n$).

En PRC, il existe trois techniques principales : la RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer), la NMP (Nitroxide Mediated Polymerization) et l'ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization). Dans la partie suivante, la principale technique utilisée dans nos travaux, l'ATRP, est présentée.

II.1.2.1.2 Polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP)

L'ATRP est la technique la plus ancienne et la plus utilisée des PRC. Le principe de cette technique repose sur une réaction réversible d'oxydo-réduction entre une espèce dormante notée P_n-X et un complexe de métal de transition noté M_t^n-X/Ligand . Ce dernier est un catalyseur qui va s'oxyder *via* le transfert d'un atome d'halogène X provenant de l'espèce dormante pour donner une espèce activée P_n^\bullet et le complexe $M_t^{n+1}-X_2/\text{Ligand}$. Le mécanisme de cette réaction est présenté sur la Figure II.1. L'équilibre de cette réaction est fortement déplacé vers la formation de l'espèce dormante dont la cinétique est régie par l'effet du radical persistant.

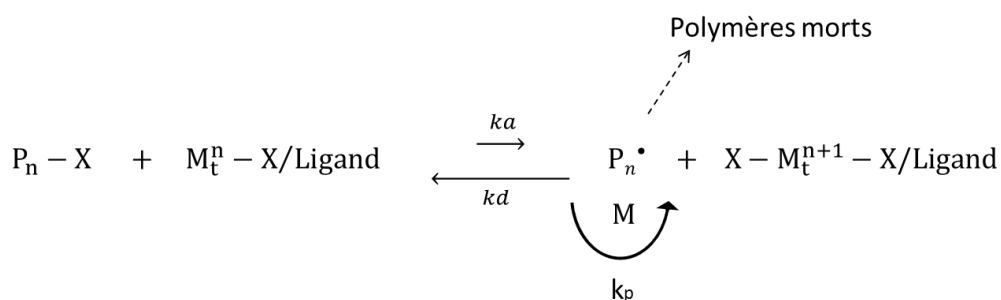


Figure II.1 : Mécanisme réactionnel de l'ATRP

Cette technique a été développée par les équipes de Matyjaszewski⁸ et Sawamoto⁹. La première équipe a étudié la polymérisation du styrène en présence d'un complexe à base de cuivre et celle de Sawamoto, la polymérisation du méthacrylate de méthyle avec un complexe à base de ruthénium. Le choix du système de polymérisation (sel métallique, ligand, solvant) est primordial pour assurer un bon déroulement de la polymérisation. Une revue complète sur le rôle de chaque facteur impliqué dans une ATRP a été publiée par Matyjaszewski en 2001¹⁰. Il est important de maîtriser les rapports de concentration d'amorceur, de monomère, de métal et de ligands du point de vue du contrôle de la réaction, de sa vitesse et de la conversion. Bien que la littérature propose un grand nombre de métaux pour l'ATRP, le cuivre(I) reste le métal le plus utilisé à ce jour comme métal de transition. Il est de faible coût et permet la polymérisation d'un grand nombre de monomères dans un large choix de solvants. Le ligand doit solubiliser le sel métallique en solvant organique mais également ajuster le potentiel redox du métal pour obtenir la réactivité appropriée à la réaction de polymérisation. Ce sont les ligands azotés qui sont les plus efficaces pour complexer le cuivre. Généralement, la PMDETA (pentadiméthyl-diéthylène-triamine) ou la Bipy (bipyridine) sont utilisées.

L'ATRP est une technique très avantageuse permettant d'utiliser un grand nombre de monomères. Les ligands, amorceurs et sels métalliques sont disponibles commercialement. De plus, l'extrémité halogénée des chaînes permet de réamorcer la polymérisation et d'obtenir des copolymères à blocs mais également de fonctionnaliser les extrémités par des réactions de couplage. Son inconvénient majeur provient de la difficulté à éliminer le couple métal/ligand. Plusieurs méthodes de purification ont été développées basées sur la filtration ou la précipitation. Récemment, Matyjaszewski¹¹ et son équipe ont développé une technique qui permet de polymériser par activateurs régénérés par transfert d'électron (ARGET). Un agent réducteur qui ne forme pas de radical est utilisé pour régénérer le Cu(I),

celui-ci ne doit réagir avec aucun radical ou autre réactif du milieu réactionnel, seulement avec le Cu(II). Cette technique a la particularité d'utiliser très peu de cuivre (seulement quelques ppm) et ainsi faciliter l'étape de purification.

II.1.2.1.3 Polymérisation radicalaire contrôlée à partir d'un macro-amorceur

Après avoir vu les avantages présentés par l'utilisation d'une PRC, nous nous sommes intéressés à l'appliquer pour la synthèse des copolymères à blocs amphiphiles.

Nous avons choisi de travailler avec un copolymère à blocs non ioniques pour limiter les effets d'interactions. Le bloc hydrophile principalement décrit dans la littérature est le PEG qui présente une hydrosolubilité et une bonne biocompatibilité. La préparation de ce type de copolymère amphiphile a beaucoup été étudiée en ATRP et en RAFT. Des PEGs α -méthoxy ou ω -amino sont disponibles commercialement et sont généralement utilisés pour former les macro-amorceurs. Le groupement méthoxy permet d'avoir un seul bout de chaîne réactif (le groupe hydroxyle) qui sera fonctionnalisé avec une fonction bromée par réaction d'estérification avec le bromure de 2-bromo-isobutyryle¹² ou encore l'acide 2-bromo-isobutyrique¹³ dans le cas d'une ATRP (cf. Figure II.2). Lorsqu'une polymérisation RAFT est utilisée, le PEG est fonctionnalisé avec un macro-agent de transfert obtenu par estérification du groupement carboxylique d'un acide trithiocarbonate¹⁴ ou dithiocarbonate¹⁵.

Les monomères généralement copolymérisés en RAFT sont des styrènes ou des acrylamides.

Ici, nous avons choisi la méthode ATRP plus utilisée pour synthétiser des copolymères amphiphiles à base de méthacrylates¹⁶.

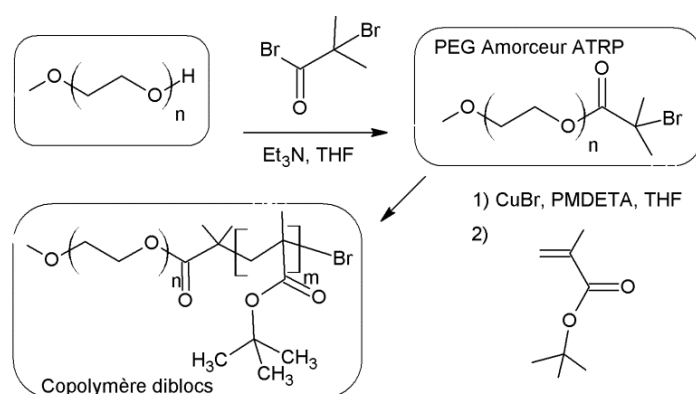


Figure II.2 : Synthèse des copolymères à blocs à partir d'un PEG-Br par Ranger et coll.^{16a}

La synthèse du second copolymère à base de polysulfone aliphatique n'a pu être réalisée dans les mêmes conditions car la polyaddition (voie de synthèse des polysulfones) est

difficilement applicable à la méthode du macro-amorceur. C'est donc le couplage des bouts de chaînes qui a été utilisée.

II.1.2.2 Réaction de couplage entre deux homopolymères

Dans cette méthode, les deux blocs sont préalablement synthétisés et possèdent une fonction en bout de chaîne pouvant réagir l'une avec l'autre pour former une liaison covalente. Un bon couplage nécessite des rendements quantitatifs entre les homopolymères dont la fonctionnalisation en bout de chaînes doit être préalablement élevée.

Il existe de nombreux exemples de couplage dans la littérature pour la préparation de copolymères à blocs comme les liaisons peptidiques ou les réactions d'estérification¹⁷ entre les bouts de chaînes des deux blocs. Une autre technique de couplage basée sur la chimie « click » permet de lier de manière covalente deux blocs grâce à leurs fonctions réactives¹⁸. Introduite récemment par Sharpless¹⁹ en 2001, la chimie « click » est efficace, modulable, sélective et sa mise en place est simple. Il existe quatre principaux types de chimie « click » :

- Les réactions de cycloaddition, comme la cycloaddition dipolaire 1,3-Huisgen (plus connu sous le nom de cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le Cu(I))²⁰ ou la réaction de Diels-Alder.
- Les réactions d'ouverture de cycle nucléophiles d'hétérocycles électrophiles contraints.
- Les réactions sur les carbonyles non aldoliques (urée, oxime, hydrazone).
- Les réactions d'addition sur les liaisons multiples (C-C) (époxydation, déhydroxylation, addition de Michael...).

Parmi les réactions d'addition sur les liaisons multiples (C-C), la réaction thiol-ène²¹ et la réaction thiol-yne²² ont largement été étudiées et récemment dans le cadre de la synthèse des polythioethers (thiol-ène)²³ (précurseurs de polysulfone) et des copolymères à blocs (thiol-yne)²⁴. Un rappel sur ces deux réactions est présenté.

II.1.2.2.1 Rappel sur la réaction thiol-ène

La réaction thiol-ène²¹, connue depuis plus de 100 ans, est l'hydrothiolation d'une liaison (C=C) *via* une voie radicalaire ou nucléophile. La thiol-ène est souvent associée à la voie radicalaire découverte en 1905 par Posner²⁵. La première application de l'addition radicalaire d'un thiol sur des polymères insaturés date de 1948²⁶. Jusqu'à récemment, la thiol-ène était limitée à une utilisation lors de synthèses organiques²⁷, à la modification de

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules polydiènes et à la génération de films et de réseaux de polymères²⁸. Au début des années 2000, le potentiel de cette réaction a été reconnu comme une chimie « click », pour la modification de biomacromolécules²⁹, de particules/colloïdes et de surfaces³⁰ mais aussi pour la synthèse de polymères²³ et de dendrimères^{28b, 31}.

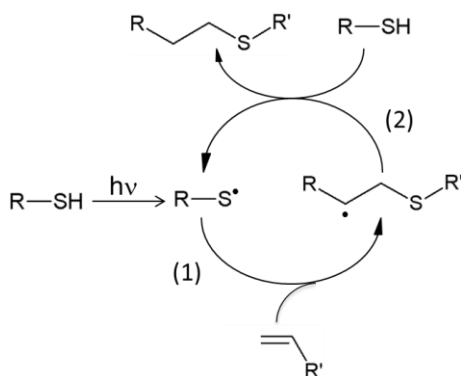


Figure II.3 : Mécanisme de la réaction « thiol-ène »

En général, un système thiol-ène réagit *via* un mécanisme de chaînes impliquant deux étapes : 1) un radical amorceur activé par la chaleur ou la lumière transforme un groupement thiol en un radical thiyl (initiation) puis l'addition de ce radical sur un alcène génère un radical centré sp^3 (propagation) et 2) ce radical capte un hydrogène d'un autre thiol pour former un thioéther avec une orientation anti-Markovnikov et régénérer un radical thiyl qui va se propager dans un nouveau cycle (transfert de chaînes).

La terminaison se fait par couplage de radicaux. La réactivité de la thiol-ène est très dépendante de la structure du thiol et de l'alcène. La réactivité des alcènes diminue avec la diminution de la densité électronique des doubles liaisons. De plus, le degré de substitution a également un effet sur la réactivité. Les alcènes terminaux sont plus réactifs que les alcènes internes^{28a}. La réaction thiol-ène est également connue pour convertir des liaisons (C=C) *cis* en *trans*³².

La fonctionnalisation par bouts de chaînes de deux polymères *via* la thiol-ène peut être menée lorsque l'un des polymères possède une fonction terminale alcène et l'autre polymère une fonction terminale thiol. Bien qu'il existe de nombreux couplages de polymères par cette réaction, il y a des limites à l'utilisation d'une réaction thiol-ène pour le couplage de deux polymères³³ comme la nécessité d'utiliser un excès de thiol par rapport à l'alcène ou les nombreuses réactions de terminaison. Ici, on s'intéressera particulièrement à

cette réaction non pas pour le couplage de copolymères mais comme réaction de polyaddition pour la formation de précurseurs de polysulfone (voir II.3.1.1).

Pour le couplage entre chaînes polymères, il faut une réaction avec une plus grande réactivité comme la thiol-yne.

II.1.2.2.2 Rappel sur la réaction thiol-yne

La réaction thiol-yne³⁴, réaction entre une triple liaison et un thiol, a également connu une popularité grandissante pour les méthodes de synthèse de polymère comme les dendrimères³⁵, les polymères hyperbranchés³⁶, les gels³⁷ ou encore la post-fonctionnalisation de polymères déjà formés³⁸. L'addition d'un thiol sur des insaturations peut se produire de manière radicalaire mais aussi par des mécanismes nucléophiles.

Le mécanisme de la réaction thiol-ène est compris dans celui de la thiol-yne avec un cycle de propagation additionnel (cf. Figure II.4). A partir du premier cycle, un sulfure de vinyle (1) est produit qui subit une seconde addition d'un thiol (2) pour donner le produit final. Ainsi, une réaction thiol-yne totale consiste à l'addition consécutive de 2 équivalents de thiols pour un alcyne.

Des études cinétiques de cette réaction montrent que la deuxième addition est trois fois plus rapide que la première addition³⁹. La réactivité dépend principalement de l'alcyne et non celle du thiol. Un alcyne simple et terminal est beaucoup plus réactif qu'un alcyne en présence d'un groupe propargyle ou d'un alcyne interne⁴⁰.

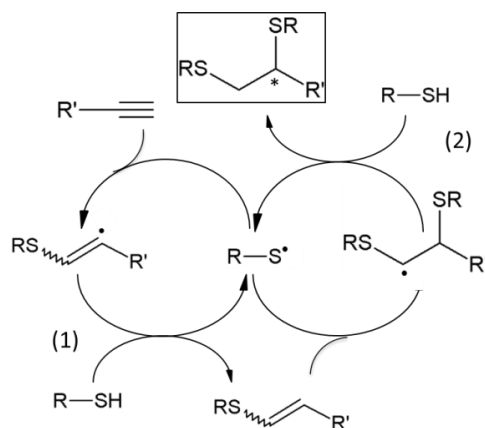


Figure II.4 : Mécanisme de la réaction "thiol-yne"

Pour la synthèse du copolymère à blocs, une seule addition est souhaitée. De ce fait, un seul équivalent de thiol sera utilisé pour un équivalent d'alcyne. De plus, afin d'être sélectif par rapport à la monoaddition, il est possible de travailler avec un alcyne dont le radical est stabilisé après l'addition du thiol. Sprakfe et coll.²⁴ ont fonctionnalisé le bout de chaîne d'un polystyrène avec un phénylacétylène et l'ont greffé à un PEG avec un thiol en bout de chaînes dans des quantités stœchiométriques. L'alcène étant terminal, l'addition du thiol se fait rapidement. Néanmoins le radical benzylique étant stabilisé et en conditions stœchiométriques, une seule addition a lieu et un copolymère à blocs est obtenu.

La réaction thiol-yne est choisie pour la réaction de couplage afin d'obtenir un copolymère à bloc. Le polymère hydrophobe final doit posséder une fonction terminale thiol disponible pour réagir *via* la réaction thiol-yne avec un alcyne présent sur le PEG et ainsi créer une liaison covalente entre ces deux polymères.

II.2 Copolymères à blocs PEG-*b*-polyméthacrylate

II.2.1 Synthèse par polymérisation radicalaire contrôlée

Comme décrit précédemment, deux différents copolymères vont être synthétisés. Ces copolymères diffèrent par leur groupement hydrophobe : dans un cas c'est un poly (méthacrylate de *tert*-butyle) (PMA*t*Bu) et dans l'autre cas c'est un polysulfone (PSu) aliphatique.

En plus de ses propriétés intéressantes sous irradiation, le PMA*t*Bu est potentiellement hydrolysable pour un greffage ultérieur de molécules de type principe actif. De plus, sa

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules
 copolymérisation par ATRP a déjà été étudiée^{16a}. Ainsi, il est possible de contrôler sa longueur pour avoir des objets organisés.

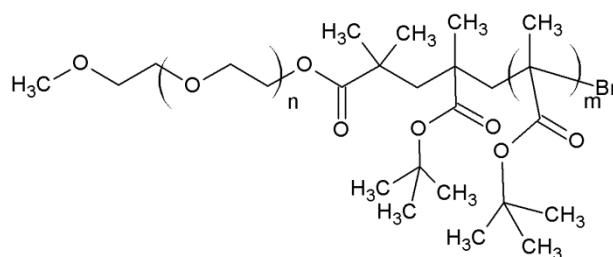


Figure II.5 : Structure du copolymère PEG-*b*-PMAtBu

L'ATRP d'un monomère n'est possible qu'après avoir déterminé le système métal de transition/ligand/amorceur qui lui convient. Chaque monomère ayant ses propres constantes d'activation et de propagation, il faut contrôler la concentration en espèces radicalaires ainsi que la vitesse de désactivation. L'équipe de Matyjaszewski¹⁰ a recensé dans une publication les réactifs à utiliser ainsi que les proportions correspondantes selon la nature du monomère. Les conditions optimales de polymérisation de monomères de type méthacrylate ont été repris ici.

Le PEG va être fonctionnalisé avec une fonction ester bromée car la polymérisation de méthacrylate est plus efficace avec ce type d'amorceur. Pour le métal de transition, c'est le cuivre qui est utilisé sous forme de bromure de cuivre(I) (CuBr). Le ligand est la pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA). C'est un ligand amine multidentate connu pour son efficacité avec les méthacrylates⁴¹.

II.2.1.1 Synthèse d'un macro-amorceur PEGylé

Un α -méthoxy- ω -hydroxyl-polyéthylèneglycol¹² commercial de masse molaire 5000 g/mol et d'indice de polydispersité 1,03 est d'abord lyophilisé puis une réaction d'estérification est effectuée entre le bout de chaîne hydroxyle et le bromure de 2-bromo-isobutyryle. La réaction est conduite dans le THF en présence de triéthylamine sous atmosphère contrôlée :

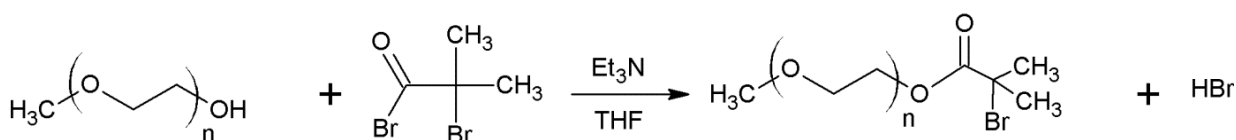


Figure II.6 : Synthèse du PEG fonctionnalisé par une fonction bromée

Après 48 h de réaction, le polymère est précipité deux fois dans l'éther diéthylique froid et lavé avec une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium saturée.

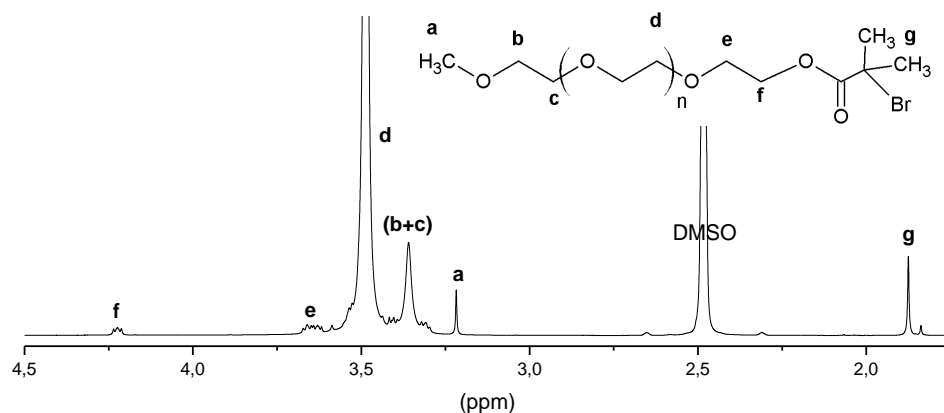


Figure II.7 : Spectre RMN ^1H du PEG-Br dans le $\text{DMSO-}d_6$

Par RMN ^1H , on vérifie que l'estérification a bien fonctionné. D'autre part, l'absence d'impuretés atteste de la bonne purification du produit. En effet, les intégrations des pics de la chaîne principale (**d**) et du nouveau bout de chaînes (**g**) donnent un degré de polymérisation (DP_n) de 113 qui correspond au DP_n du polymère de départ.

II.2.1.2 Copolymérisation par Polymérisation Radicalaire par Transfert d'Atomes (ATRP)

Le PEG fonctionnalisé d'une fonction bromée (macro-amorceur ATRP) va servir d'amorceur pour la copolymérisation du MATbu.

Ici, le rapport $\text{CuBr}/\text{ligand}/\text{amorceur}$ optimisé est de 1/1,5/1. Après arrêt de la réaction, le cuivre est extrait du milieu réactionnel par passage dans une colonne d'alumine puis le polymère purifié est séché sous air.

Un suivi cinétique de la copolymérisation a été fait en réalisant des prélèvements à différents temps. Le taux de conversion calculé par gravimétrie est de 37 % pour le prélèvement final. La masse molaire en nombre théorique visée est de 22000 g/mol.

Sur la Figure II.8.a, le taux de conversion en fonction du temps est représenté. On peut voir que la vitesse de copolymérisation du MATbu est rapide durant les deux premières heures où le plateau de conversion est presque atteint. L'évolution linéaire de $\ln([M]_0/[M])$ en fonction de $t^{2/3}$ présentée sur la Figure II.8.b atteste d'une polymérisation radicalaire contrôlée dans le cas des méthacrylates⁴².

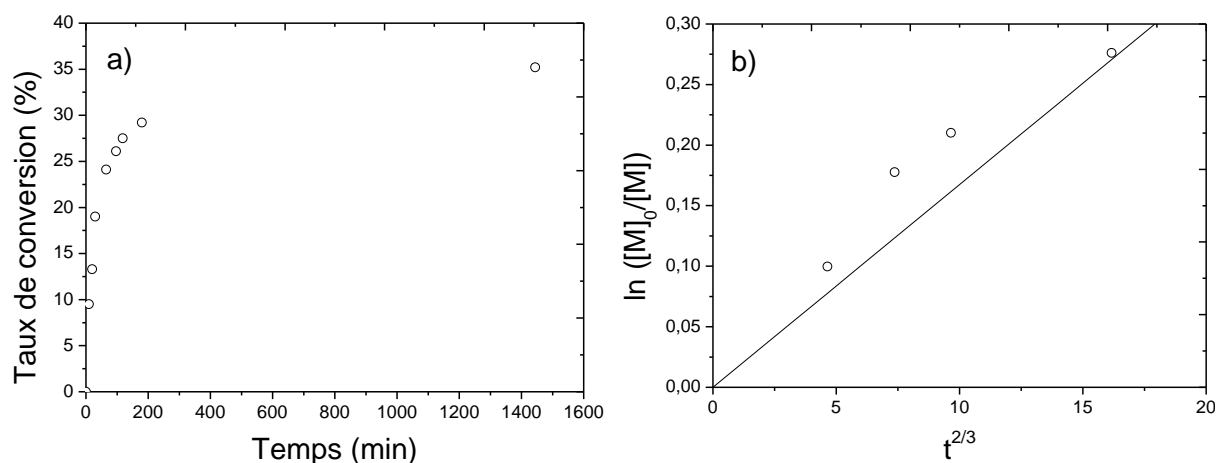


Figure II.8 : Cinétiques de polymérisation : a) Taux de conversion en fonction du temps - b) $\ln([M]_0/[M])$ en fonction de $t^{2/3}$

La masse molaire ainsi que la polymolécularité de ces différents prélèvements ont également été analysées en chromatographie d'exclusion stérique (CES). La masse molaire en nombre du polymère final est de 17 350 g/mol avec un I_p de 1,1. L'évolution des masses molaires en fonction du taux de conversion par rapport à la courbe théorique ainsi que l'évolution de l'indice de polymolécularité en fonction de la conversion sont également présentées dans la Figure II.9.

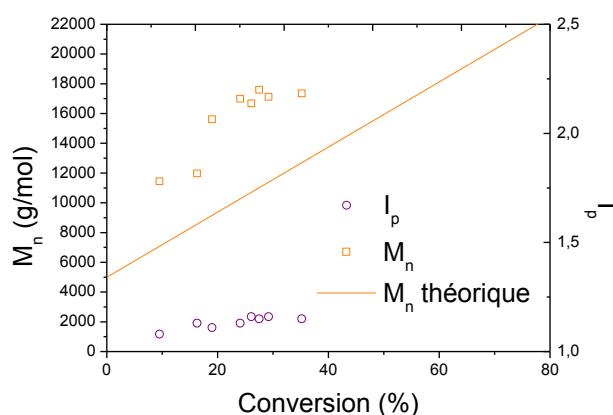


Figure II.9 : Masses molaires (M_n) et indices de polymolécularité (I_p) en fonction de la conversion

L'indice de polymolécularité, I_p , reste constant en fonction de la conversion (inférieur à 1,2). L'évolution des masses molaires est éloignée de la courbe théorique indiquant un défaut d'amorçage. L'efficacité d'amorçage de la copolymérisation calculée à partir de la masse molaire en nombre comparée à celle attendue théoriquement est de 57 %. Ce qui signifie qu'il reste une quantité non négligeable de PEG libre. Afin de l'éliminer, le copolymère est lavé dans l'eau plusieurs fois.

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

Le Tableau II.1 énumère les principales polymérisations faites à partir du macro-amorceur PEG de masse molaire 5000 g/mol.

Echantillon	Monomère	Conversion (%)	Temps (h)	$M_{n,théorique}$ (g/mol)	M_n (g/mol)	I_p
1	MABu	56	20	18000+5000	13700	1,2
2	MA t Bu	18	3	10000+5000	10600	1,0
3	MA t Bu	37	24	22000+5000	17350	1,1

Tableau II.1 : Résumé des différentes polymérisations

Les copolymères PEG-*b*-PMABu et PEG-*b*-PMA t Bu ont ensuite été caractérisés par RMN 1H et FTIR pour attester de la présence des deux blocs dans leur proportion respective.

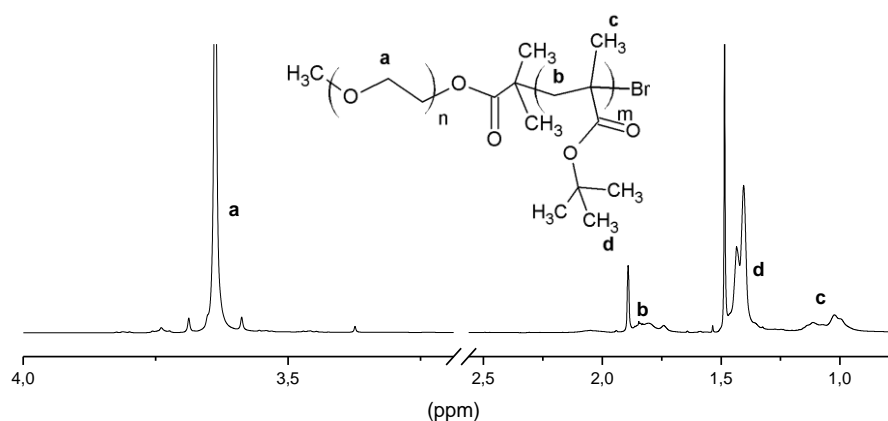


Figure II.10 : Spectre RMN 1H du copolymère PEG $_{113}$ -*b*-PMA t Bu $_{87-3}$ dans le CDCl $_3$

Les protons du PEG (a) sont présents à 30 % contre 70 % pour les protons du bloc PMA t Bu (b, c et d), ce qui est le rapport aussi des masses molaires déterminées (17350 g/mol au total avec un PEG de masse molaire 5000 g/mol).

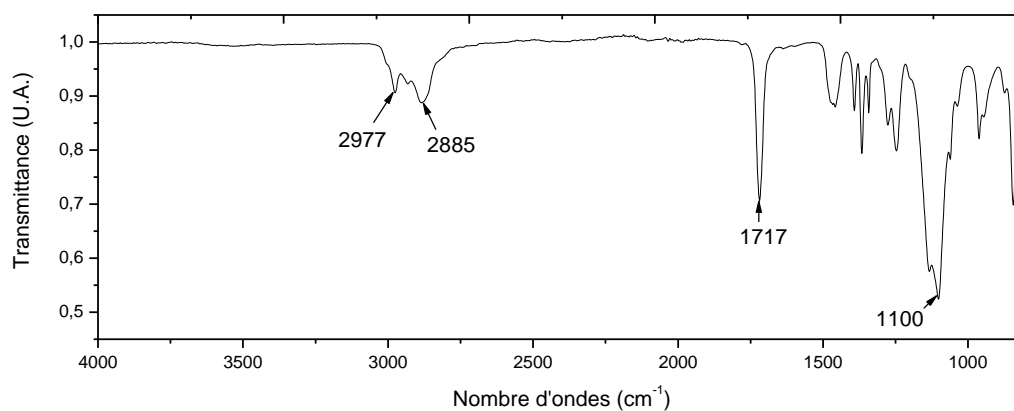


Figure II.11 : Spectre FTIR du copolymère PEG-*b*-PMA t Bu

La Figure II.11 représente le spectre FTIR du copolymère PEG-*b*-PMA*t*Bu. Des bandes caractéristiques de chaque bloc sont présents : à 1717 cm⁻¹ le pic est attribué à la vibration d'élongation de la liaison C=O de la fonction ester du bloc PMA*t*Bu et la bande à 1100 cm⁻¹ correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-O de la fonction éther du bloc PEG.

II.2.2 Auto-assemblage par nanopréciipitation

II.2.2.1 Auto-assemblage des copolymères à blocs amphiphiles

Les molécules amphiphiles dans l'eau s'auto-assemblent spontanément pour former des micelles avec une partie hydrophile soluble qui s'étend, tandis que la partie hydrophobe collapse et forme le cœur de la micelle. Le terme micelle regroupe une variété de structures allant de la sphère à des morphologies plus complexes. Pour une température donnée, la micellisation survient lorsque la concentration en copolymère dépasse une concentration appelée « concentration micellaire critique » (CMC). Dans le domaine des fortes concentrations, les micelles s'organisent en réseaux, jusqu'à former des gels.

Les micelles obtenues ici sont des micelles directes. Dans un solvant polaire comme l'eau, ce type de micelles possède un cœur hydrophobe et une couronne hydrophile. Lorsque les micelles sont formées dans un solvant apolaire, les blocs hydrophiles constituent le cœur et la couronne est formée par les blocs hydrophobes, inversant la localisation des blocs ; on parle de « micelles inverses ».

En fonction de la longueur relative des deux blocs, les micelles directes et inverses sont subdivisées en deux sous-catégories : les micelles dites « star » et celles dites « crew-cut » (cf. Figure II.12). Les micelles de type « star » ont des tailles de couronne plus importantes que celles du cœur du fait que les copolymères ont un bloc soluble plus long que le bloc insoluble. Les micelles de type « crew-cut » ont un cœur de taille beaucoup plus important et une épaisseur de couronne plus fine.

Ces deux types de micelles se différencient également par leur méthode de préparation. En général, les micelles de type « star » sont préparées en dissolvant directement le copolymère asymétrique dans un solvant sélectif pour le bloc le plus long. Alors que pour préparer des micelles de type « crew-cut », le copolymère à blocs est solubilisé dans un bon solvant organique commun aux deux blocs. Ensuite la solution est ajoutée à un solvant précipitant pour les blocs longs et bon solvant pour les blocs courts.

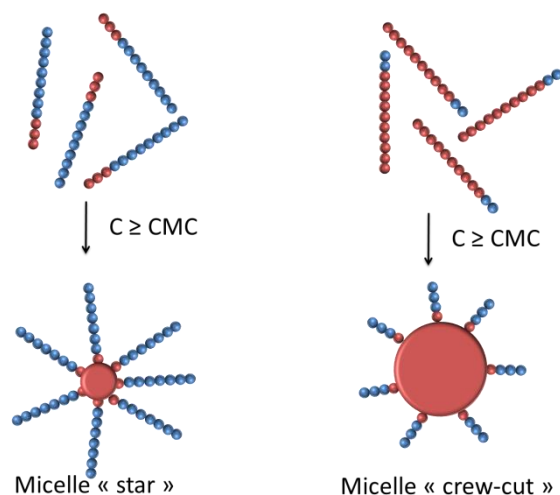


Figure II.12 : Représentation des micelles « star » et « crew-cut »

Plus récemment, une méthode dérivée, dite de nanoprecipitation⁴³ basée sur l'effet « Ouzo » a été développée. Ce processus d'émulsion spontanée a été nommé l'effet Ouzo par Vitale et Katz⁴⁴ en référence à la boisson grecque à base d'anis (Pastis en France). Elle permet de former des nanoparticules polymères à partir de molécules hydrophobes (pas spécifique aux copolymères). Cette méthode est également utilisée pour charger ces nanoparticules en petites molécules organiques. En pratique, cela consiste à faire précipiter la solution de soluté hydrophobe dans une grande quantité de solvant précipitant pour le soluté (ici, l'eau) miscible avec le solvant organique. La solution binaire devient un non solvant pour le copolymère et le système évolue vers une séparation de phases, conduisant à la formation de nanoparticules. Enfin le solvant est éliminé par évaporation ou dialyse. Cette méthode est facile à mettre en place mais il est difficile de trouver les bonnes proportions (voir Figure II.13) entre les trois composants du système (soluté hydrophobe/solvant/eau). La limite principale étant le risque de floculation des particules et la formation de gros agrégats. Sous les bonnes conditions, ce processus génère une dispersion de petites gouttelettes ou nanoparticules avec une distribution en taille étroite et unimodale.

Nous avons utilisé des conditions proches de celles décrites pour l'effet « Ouzo » et l'obtention de nanoparticules, la longueur des blocs étant dans notre cas favorablement asymétrique. Cependant, au vu des diverses caractérisations (TEM, diffusion de la lumière ou neutrons), on est dans ce cas plus proche d'une auto-organisation de type « crew-cut » que de nanoparticules.

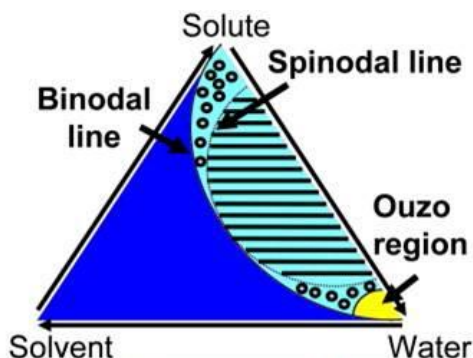


Figure II.13 : Diagramme de phase du système ternaire soluté hydrophobe/solvant/eau décrit par Couvreur⁴³

II.2.2.2 Nanoprécipitation

La méthode choisie pour promouvoir l'auto-assemblage est donc la nanoprécipitation. Le copolymère dibloc est dissout dans un solvant organique, miscible à l'eau et bon solvant des deux blocs. Ensuite, cette solution est précipitée goutte à goutte dans l'eau pour obtenir des nanoparticules de copolymères amphiphiles. Il faut ensuite éliminer le solvant organique.

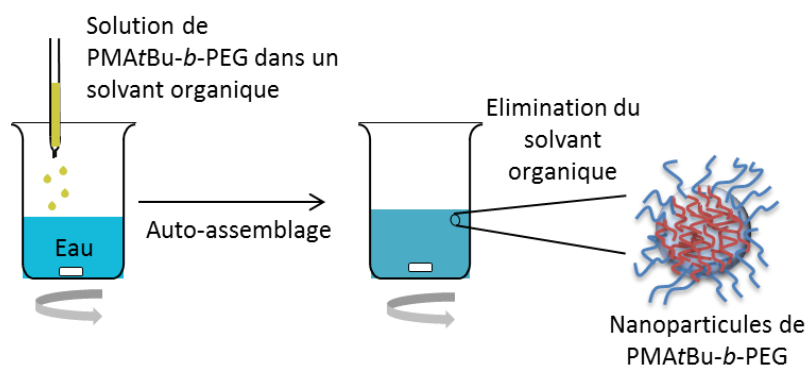


Figure II.14 : Nanoprécipitation du copolymère PEG-*b*-PMAAtBu

D'après l'équipe de Vauthier⁴⁵, pour avoir des nanoparticules de plus petites tailles et dans des quantités plus importantes, le polymère doit être solubilisé dans un solvant théta, soit un solvant dans lequel les chaînes polymères ont une conformation idéale, sans subir de contraintes. De plus, la concentration de la solution en polymère doit être en régime dilué plutôt que semi-dilué pour avoir un bon rendement de formation de nanoparticules.

Dans notre cas, plusieurs essais ont été faits pour connaître les bonnes conditions pour la formation de nanoparticules de PEG-*b*-PMAAtBu en modifiant différents paramètres.

Les solvants organiques utilisés sont le DMF et le THF. Les concentrations en copolymère dans la solution initiale vont de 1 à 5 mg/mL. Les ratios phase organique/phase aqueuse

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

utilisés vont de 1:2 à 1:5. Et enfin, pour éliminer le solvant, l'évaporation ainsi que la dialyse ont été testées.

Suivie en DLS, la nanoprécipitation avec le DMF conduit à des nanoparticules de tailles plus grandes qu'avec le THF, qui est un meilleur solvant du copolymère.

La concentration initiale en copolymère est cruciale sur la production de nanoparticules. En effet, les copolymères qui ne s'auto-assemblent pas sous forme de nanoparticules, précipitent. Lorsque la concentration en copolymère initiale est trop importante (supérieure à 5 mg/mL), une précipitation est observée dans l'heure qui suit l'élimination du solvant.

Il en est de même pour le ratio phase organique/phase aqueuse. Lorsqu'il est trop faible, celui-ci entraîne la précipitation des nanoparticules. Dans notre cas, lorsque le ratio 1:5 est utilisé, le phénomène de précipitation est toujours observé.

Pour la nanoprécipitation avec le DMF, on utilise la dialyse comme méthode d'élimination du solvant. Avec le THF, la technique d'évaporation n'est pas toujours efficace à cause des variations de température.

Ainsi les meilleures conditions pour nanoprécipiter le copolymère, sont de travailler avec une concentration de 1 mg/mL dans le THF puis de nanoprécipiter dans l'eau avec un ratio 1:2 et enfin d'éliminer le solvant par dialyse. Dans ces conditions, les nanoparticules obtenues sont de petites tailles et plus stables qu'avec les essais précédents (la solution reste transparente). Une limite de cette technique de nanoprécipitation est sa dépendance avec la température à laquelle elle est réalisée. Pour se prémunir de tout problème pouvant être lié à des phénomènes de précipitation parasites, une filtration avec une membrane de 0,45 μm est effectuée avant toute autre mesure. La concentration finale est de 0,25 mg/mL.

II.2.2.3 Caractérisation des nano-objets dans l'eau

La taille des nanoparticules a été déterminée de trois manières différentes : par microscopie électronique à transmission (TEM), diffusion dynamique de la lumière (DLS) et diffusion de neutron aux petits angles (DNPA).

Les nanoparticules de PEG-*b*-PMA_tBu ne peuvent être observées dans des conditions classiques de TEM. En effet, les polymères sont généralement dégradés sous le faisceau d'électrons. La technique utilisée ici est celle de la coloration négative. Cette technique permet, *via* l'utilisation d'un agent contrastant, de faire apparaître de manière plus claire la matière organique du reste qui l'entoure. L'échantillon est d'abord adsorbé sur une grille

corrélation comme une seule exponentielle permettant d'obtenir une taille moyenne (diamètre moyen) et une estimation de la largeur de la distribution de taille (polydispersité).

La Figure II.16 représente le corrélogramme d'une solution de nanoparticules de PEG-*b*-PMA*t*Bu filtrée.

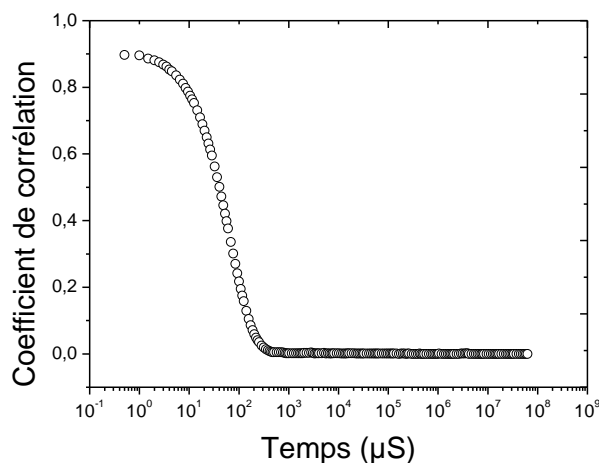


Figure II.16 : Fonction de corrélation des nanoparticules PEG-*b*-PMA*t*Bu

La méthode des cumulants donne une taille moyenne de nanoparticules de 45 nm avec une polydispersité de 0,14. La taille déterminée ici est pratiquement trois fois plus importante que celle obtenue par TEM. La DLS donne un diamètre hydrodynamique moyen en solution, donc forcément plus important que celui donné par le TEM pour lequel les nanoparticules sont préalablement séchées sur la grille de microscopie.

Une autre technique de diffusion a été utilisée pour caractériser de manière plus précise ces nanoparticules en termes de taille et de forme.

La diffusion de neutrons aux petits angles est une technique qui permet de déterminer la forme et l'organisation d'objets dispersés dans un milieu homogène. Lors d'une expérience de DNPA, un faisceau de neutrons collimaté et monochromatique de longueur d'onde λ est envoyé sur un échantillon (voir Annexe 2 pour les détails).

La variation de l'intensité $I(q)$ est mesurée en fonction du vecteur de diffusion q . Au Laboratoire Léon Brillouin (LLB), sur le spectromètre PA20, la gamme de longueur d'onde des neutrons utilisables est comprise entre 4 et 25 Å et les distances entre l'échantillon et le détecteur sont comprises entre 1 et 20 m, on peut ainsi couvrir une gamme de q qui va de 10^{-3} à $0,5 \text{ \AA}^{-1}$. Les objets observables doivent avoir une taille comprise entre 2 et 1000 Å. Pour obtenir la courbe de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion, $I(q) = f(q)$,

il faut traiter le signal et soustraire la contribution du solvant et de la cellule vide (cuve). L'expression de $I(q)$ est égale à :

(II-1)

$$I(q) = \Phi V_{objet} (\Delta\rho)^2 P(q) S(q)$$

Nous avons travaillé à des concentrations faibles donc le facteur de structure $S(q)$ est considéré égal à 1.

En DNPA, ce sont les interactions entre les neutrons et les noyaux de chaque atome de l'objet étudié qui vont permettre la diffusion, ainsi le contraste dépend de la différence de longueur de diffusion cohérente entre les atomes. La densité de longueur de diffusion lorsque l'on considère les neutrons se calcule à partir de cette équation :

(II-2)

$$\rho_{DNPA} = \frac{d \times N_A}{M} \sum_i a_i b_i$$

où d est la densité du composé en g.cm^{-3} , N_A le nombre d'Avogadro, M la masse molaire du composé en g.mol^{-1} et a_i le nombre d'atomes de longueur de diffusion b_i dans l'objet.

Le copolymère étant hydrogéné, pour avoir le maximum de contraste on utilise le D_2O comme solvant.

Composé	$\rho_{DNPA} (10^{10} \text{ cm}^{-2})$
D_2O	6,39
H_2O	-0,56
PEG hydrogéné	0,68
PMA t Bu hydrogéné	0,54

Tableau II.2 : Densités de longueur de diffusion ρ des composés utilisés

La nanopréciipitation du copolymère est faite directement dans le D_2O puis les solutions de nanoparticules sont analysées en DNPA. Le signal de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion est représenté sur la Figure II.17.

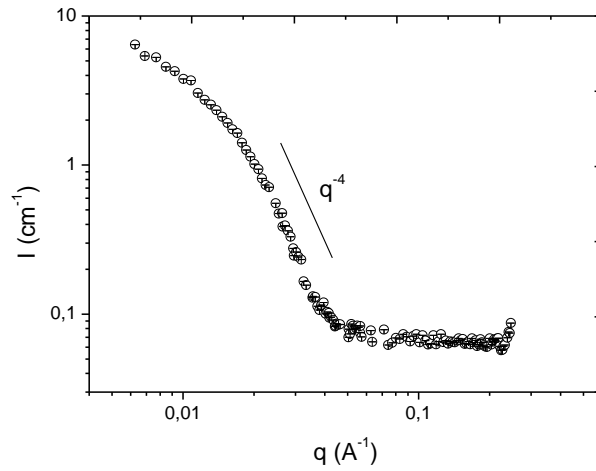


Figure II.17 : Spectre DNPA des nanoparticules PEG-*b*-PMA*t*Bu à 0,25 mg/mL dans 100 % de D₂O

Le signal obtenu présente dans le domaine des q intermédiaires une décroissance en q^{-4} , l'objet a donc une interface nette comme dans le cas d'une sphère dure. Néanmoins, on ne peut utiliser un facteur de forme de sphère pour ajuster l'intensité car le contraste n'est pas le même dans toute la nanoparticule (chaînes de natures différentes et présence de solvant). De fait, un modèle spécifique a été développé par Pedersen⁴⁶ pour des micelles de copolymères à blocs. La couronne est modélisée par des chaînes gaussiennes idéales avec un rayon de giration R_g qui n'interagissent pas entre elles et qui sont présentes sur un cœur dur. Le signal obtenu en Figure II.17 est ajusté par ce modèle de Pedersen lorsque le cœur est une sphère dure de rayon $R_{\text{cœur}}$. Il est appelé modèle « hairy-sphere » dont le facteur de forme s'écrit :

$$\begin{aligned}
 P_{\text{hairy-sphere}}(q, R_{\text{cœur}}, R_g) = & V_{\text{cœur}}^2 \Delta\rho_{\text{cœur}}^2 P_{\text{sphère}}(q, R_g) \\
 & + N \Delta\rho_{\text{chaîne}}^2 V_{\text{chaîne}}^2 P_{\text{chaîne}}(q, R_g) \\
 & + 2N V_{\text{cœur}} V_{\text{chaîne}} \Delta\rho_{\text{cœur}} \Delta\rho_{\text{chaîne}} S_{\text{cœur-chaîne}}(q, R_{\text{cœur}}, R_g) \\
 & + N(N-1) \Delta\rho_{\text{chaîne}}^2 V_{\text{chaîne}}^2 S_{\text{chaîne-chaîne}}(q, R_{\text{cœur}}, R_g)
 \end{aligned}
 \tag{II-3}$$

où $V_{\text{cœur}}$ et $V_{\text{chaîne}}$ sont les volumes du cœur hydrophobe et des chaînes hydrophiles. $P_{\text{sphère}}$ et $P_{\text{chaîne}}$ les facteurs de forme d'une sphère dure et d'une chaîne. $\Delta\rho_{\text{cœur}}^2$ et $\Delta\rho_{\text{chaîne}}^2$ sont les contrastes respectifs entre le cœur et le solvant et entre la chaîne et le solvant. $S_{\text{cœur-chaîne}}$ et $S_{\text{chaîne-chaîne}}$ sont les termes croisés cœur-chaîne et chaîne-chaîne (interactions inter-chaînes), et N est le nombre de chaînes par micelle. Les expressions des facteurs de forme d'une sphère dure et d'une chaîne ainsi que des termes croisés sont :

(II-4)

$$P_{\text{sphère}}(q, R) = \left[3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right]^2$$

(II-5)

$$P_{\text{chaîne}}(q, Rg) = \frac{2 (e^{-q^2 Rg^2} - 1 + q^2 Rg^2)}{(q^2 Rg^2)^2}$$

(II-6)

$$\begin{aligned} S_{\text{cœur-chaîne}}(q, R_{\text{cœur}}, Rg) &= 3 \frac{\sin(qR_{\text{cœur}}) - qR_{\text{cœur}} \cos(qR_{\text{cœur}})}{(qR_{\text{cœur}})^3} \times \frac{(1 - e^{-q^2 Rg^2})}{q^2 Rg^2} \\ &\times \frac{\sin(q(Rg + R_{\text{cœur}}))}{q(Rg + R_{\text{cœur}})} \end{aligned}$$

(II-7)

$$S_{\text{chaîne-chaîne}}(q, R_{\text{cœur}}, Rg) = \left[\frac{(1 - e^{-q^2 Rg^2})}{q^2 Rg^2} \times \frac{\sin(q(Rg + R_{\text{cœur}}))}{q(Rg + R_{\text{cœur}})} \right]^2$$

Le signal obtenu puis ajusté est représenté sur la Figure II.18. A partir de ce modèle, on peut déterminer la valeur du rayon du cœur hydrophobe $R_{\text{cœur}}$ ainsi que le rayon de giration des chaînes polymères Rg et le nombre de chaînes par micelle N .

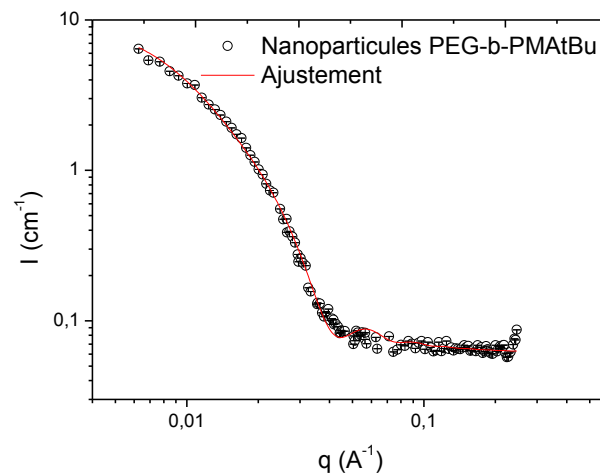


Figure II.18 : Spectre DNPA des nanoparticules PEG-*b*-PMAAtBu à 0,25 mg/mL dans 100 % de D₂O et la courbe ajustée

Les nanoparticules PEG-*b*-PMAAtBu ont un spectre DNPA ajustable avec celui d'une micelle de copolymère dont le cœur hydrophobe a un rayon de $10,0 \pm 0,1$ nm et la couronne hydrophile

de $2,0 \pm 0,1$ nm. Le nombre de chaînes par micelle estimé par le modèle est de 155 ± 25 . La micelle a donc bien une structure « crew-cut » prévisible par la composition du copolymère. Le rayon de giration de la micelle calculée est de $12,0 \pm 0,2$ nm. Si on le compare au rayon hydrodynamique obtenu en DLS, le rapport de ces deux rayons (R_g/R_H) est égal à 0,53. D'après la littérature, pour une sphère dure, ce rapport est de 0,77 alors que pour une sphère creuse de type vésicule, ce rapport est de 1. Pour des micelles, le rapport est inférieur à celui d'une sphère dure⁴⁷, ce qui est notre cas ici. Ceci confirme la conformation de type micelle de ces copolymères à blocs lors de la nanoprécipitation dans l'eau.

II.3 Copolymères à blocs PEG-*b*-polysulfone

II.3.1 Synthèse par chimie « click »

II.3.1.1 Synthèse du polythioether *via* la réaction « thiol-ène »

Le second copolymère à base de polysulfone aliphatique (PSu) est choisi pour sa grande sensibilité aux irradiations.

La synthèse de polysulfone est présentée classiquement *via* la réaction de SO_2 et d'un monomère vinylique (voir réaction ci-dessous). Néanmoins, cette réaction est difficile à mettre en œuvre du fait de l'utilisation de réactifs sous forme gazeuse.

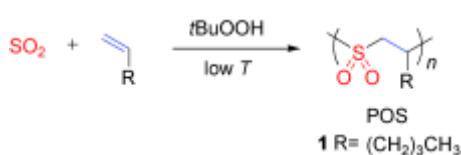


Figure II.19 : Polymérisation d'un Polysulfone aliphatique par Lobez et coll.²

Nous avons préféré nous tourner vers une synthèse *a priori* plus simple : la polyaddition thiol-ène. Cette voie conduit à la formation d'un polysulfone.

La polyaddition thiol-ène permet la synthèse d'un polythioether (PTE). Deubel²³ a présenté la polymérisation d'un monomère avec une fonction thiol et une fonction alcène induite par irradiation UV. Les PTE peuvent également être obtenus par polymérisation de deux monomères difonctionnels⁴⁸.

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

Par conséquent, dans ce travail, on procédera à la synthèse du polythioether par thiol-ène selon deux voies principales, comme le montre la Figure II.20 :

- Voie 1 : à partir d'un monomère contenant une double liaison et un thiol
- Voie 2 : à partir de deux monomères difonctionnels

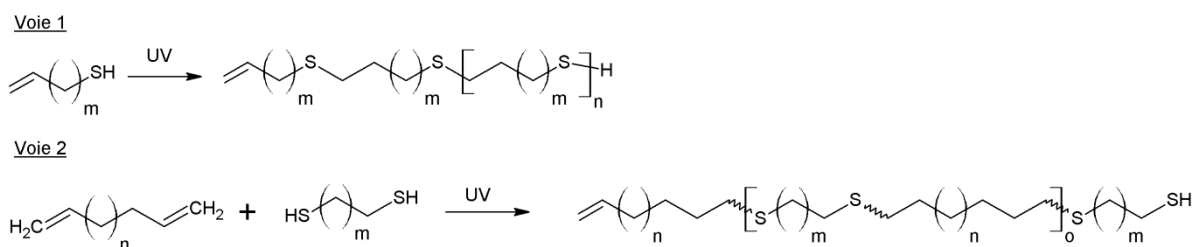


Figure II.20 : Voies de synthèse par thiol-ène

Un protocole classique de polyaddition thiol-ène consiste à introduire le ou les monomères dans un ballon avec du THF. Puis en présence d'un photo-amorceur, la réaction est amorcée par une lampe UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$; 15W). La réaction est arrêtée puis le milieu réactionnel est précipité dans du méthanol.

Les premiers essais avec la voie 1 ont été réalisés sur un monomère commercial, le 2-propénethiol. A cause du faible nombre de carbones sur sa chaîne alkyle, sa polymérisation conduit à des masses molaires très faibles.

Des monomères avec des chaînes alkyles plus importantes ont été synthétisés par réaction d'un alcène bromé et de thiourée : un pentène-thiol et un heptène-thiol.

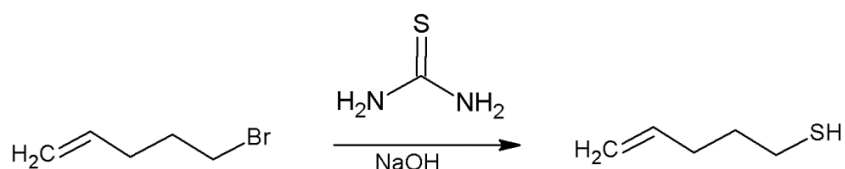


Figure II.21 : Synthèse d'un pentène-thiol

Dans les deux cas, les rendements sont de l'ordre de 35 %. La polymérisation de ces monomères conduit à des masses molaires plus élevées ($> 1400 \text{ g/mol}$). Cependant, les faibles rendements obtenus ainsi que le nombre d'étapes rendu plus important par la synthèse préalable du monomère, nous ont conduits à choisir la seconde voie.

La seconde voie est basée sur une réaction thiol-ène entre deux monomères difonctionnels⁴⁸⁻⁴⁹. Nous avons repris le protocole de Jasinski décrit pour des systèmes hétérogènes (émulsion) pour l'appliquer à nos systèmes.

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

Les différents résultats obtenus avec cette voie sont montrés dans le Tableau II.3. Pour les premières synthèses, le dithiol utilisé est un butanedithiol ou un hexanedithiol et le diène est un hexadiène. Ces premières synthèses prennent en masse au bout d'une heure et demie et les polythioethers obtenus ont des polymolécularités importantes (autour de 3) et une masse molaire (M_n) déterminée par CES ne dépassant pas 2000 g/mol.

Pour avoir une masse plus importante, on joue sur la solubilité des PTE afin d'empêcher la prise en masse rapide. L'introduction d'atomes d'oxygène dans la chaîne alkyle du dithiol permet d'augmenter la solubilité dans le THF et d'obtenir un M_n plus important (14 750 g/mol), tout en ayant un indice de polymolécularité plus faible (1,3). Cependant, au bout de trois heures, le PTE obtenu est très visqueux mais n'a pas pris en masse.

Un suivi cinétique a montré qu'au bout de 15 minutes de réaction, le plateau de conversion est déjà atteint.

PTE	Monomères		% THF	Temps (état)	$M_{n, CES}$ (g/mol)	I_p	$M_{n, RMN}$ (g/mol)
	dithiol	diène					
1			0	1h (solide)	1300	3,0	3200
2			30	1h45 (solide)	1450	4,9	3500
3			50	1h30 (solide)	1200	3,7	7600
4			50	2h50 (visqueux)	14750	1,3	-
5			50	40 min	4000	1,6	5200

Tableau II.3 : Résumé des conditions de polymérisations pour les différentes synthèses

Une analyse par RMN 1H est faite pour vérifier la structure du PTE4 (cf. Figure II.22). Les pics **c** et **d** correspondent aux protons du dithiol et les protons **e**, **f** et **g** à ceux du diène. L'intégration de tous ces pics est réalisée, normalement à partir des signaux des protons de l'alcène (**a** et **b**) présents en bout de chaînes du polythioether, or en raison d'une longueur de chaînes très importante dans le cas du PTE4, les intensités des pics correspondant aux alcènes en fin de chaîne sont très faibles. Pour un PTE de masse plus faible (PTE5), il est possible de faire ces intégrations et celles-ci sont en accord avec la structure du polythioether.

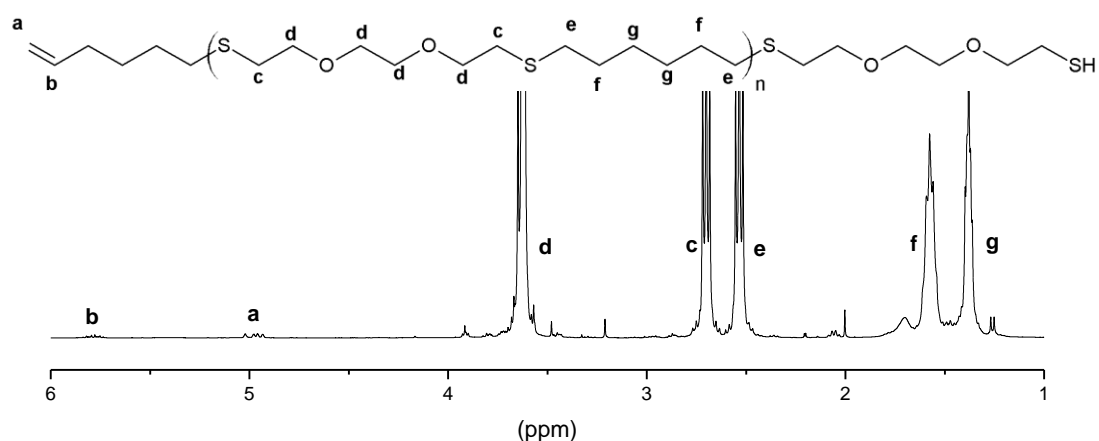


Figure II.22 : Spectre RMN ^1H du polythioether-5 dans le CDCl_3

II.3.1.2 Synthèse du copolymère par couplage thiol-yne

Une fois le polythioether synthétisé, on le fait réagir avec un PEG fonctionnalisé *via* une réaction thiol-yne (voir partie introduction de ce chapitre). Après le greffage du PEG, le copolymère à blocs sera oxydé pour transformer le polythioether en polysulfone (cf. Figure II.23). On ne peut pas opérer dans un ordre différent car l'oxydation du PTE en polysulfone entraîne une perte de solubilité de ce dernier dans les solvants organiques. Donc le couplage avec le PEG ne pourrait pas se faire.

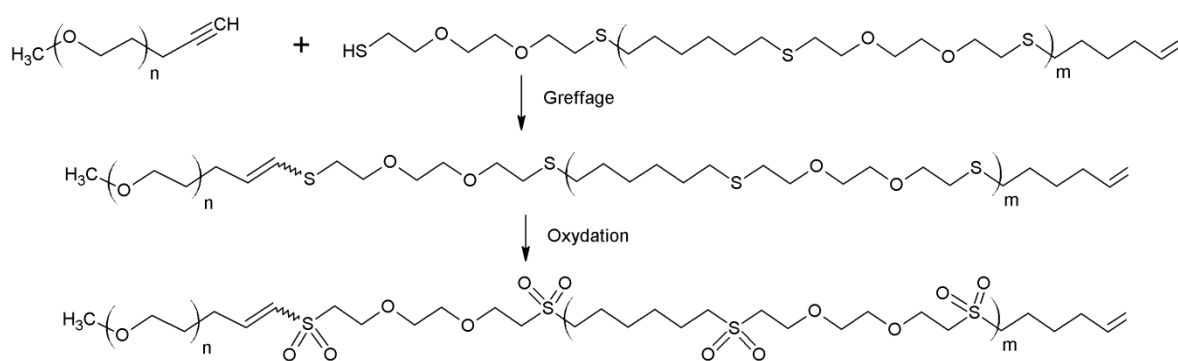


Figure II.23 : Stratégie envisagée pour la synthèse du copolymère PEG-*b*-Polysulfone

Lors d'une réaction thiol-yne, le radical formé après addition du thiol doit être stabilisé pour empêcher la seconde addition d'un thiol. Ainsi, un α -méthoxy- ω -hydroxyl-PEG commercial est fonctionnalisé avec une fonction alcyne par réaction d'estérification avec l'acide 4-pentynoïque⁵⁰(Figure II.24).

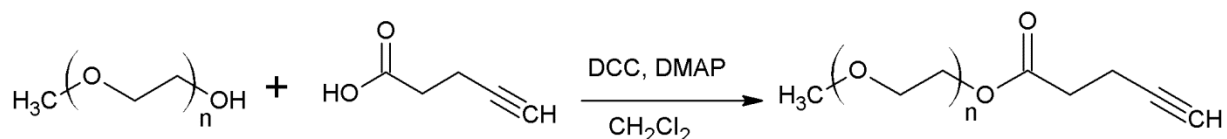


Figure II.24 : Synthèse du PEG fonctionnalisé par une fonction alcyne

Après 24 h de réaction, le polymère est précipité dans l'éther diéthylique froid. Une poudre blanche est obtenue après filtration.

Le spectre RMN ^1H du PEG-alcyne est représenté sur la Figure II.25. On retrouve bien les pics caractéristiques du PEG (**a**, **b**, **c**, **d**, **e** et **f**) ainsi que ceux de l'acide (**g**, **h** et **i**). L'intégration du proton de l'alcyne montre que l'estérification a été totale.

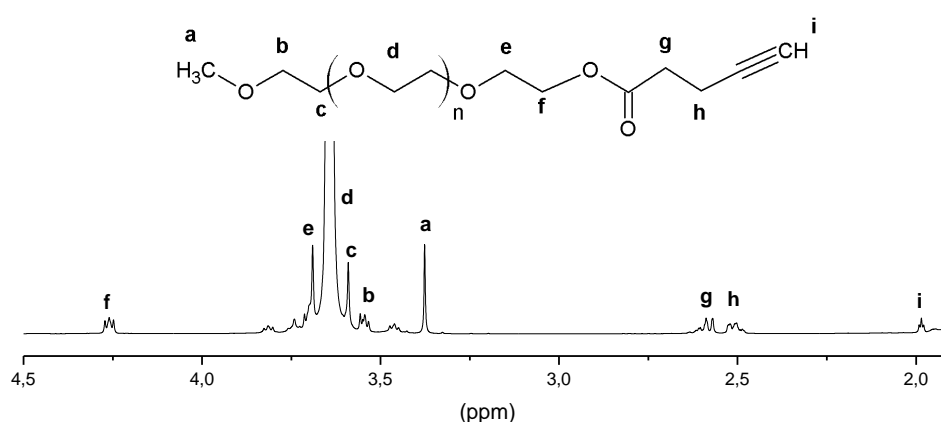


Figure II.25 : Spectre RMN ^1H du PEG-Br dans le CDCl_3

La réaction de couplage à partir de ce PEG-alcyne a ensuite été conduite.

La réaction est faite dans le THF en présence de DMPA (2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone) sous irradiation UV. Le copolymère obtenu est précipité dans l'éther diéthylique froid puis filtré. La poudre blanche obtenue est analysée par CES. La réaction de couplage se faisant sur les bouts de chaînes des deux homopolymères, la masse molaire de ces derniers va fortement influencer la réactivité. Par exemple, le couplage avec le PTE4 de masse 14750 g/mol n'a pas fonctionné. Le couplage sur un PTE de masse plus faible mais dont l' I_p est proche de 1 a été conduit.

Dans la précédente partie, nous avons vu que la vitesse de polymérisation du PTE est très rapide conduisant dès les premières minutes de la polymérisation à des PTE de masses supérieures à 2000 g/mol. Afin d'obtenir des M_n plus petites, nous avons joué sur la puissance de la lampe. Dans certaines conditions, nous avons observé que la puissance de la lampe de la sorbonne est suffisante pour amorcer la polymérisation. Au bout de 40 min, un

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

polymère avec une masse molaire de 4000 g/mol et un indice de polymolécularité de 1,6 est obtenu (PTE 5 dans le Tableau II.3).

Avec ce nouveau PTE de masse plus faible, le greffage du PEG a été lancé sous irradiation UV. Comme précédemment, une précipitation dans l'éther diéthylique est effectuée suivie d'une filtration. Puis le copolymère est lavé avec de l'eau pour éliminer le PEG non greffé.

La Figure II.26 représente les chromatogrammes du PEG, du PTE et du copolymère PEG-*b*-PTE issu de ce greffage. Le décalage vers les masses plus importantes du copolymère par rapport au PTE indique que le greffage a fonctionné. La masse molaire trouvée est de 7600 g/mol avec un indice de polymolécularité de 1,5.

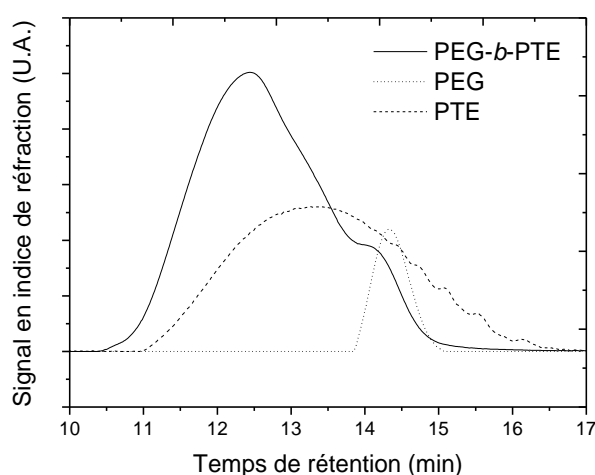


Figure II.26 : Chromatogrammes du copolymère PEG-*b*-PTE, du PEG et du PTE initial

Le spectre RMN ^1H du copolymère est représenté sur la Figure II.27. Les pics caractéristiques de chaque bloc sont présents sur ce spectre. Les protons du PTE sont attribués aux pics **e**, **f**, **g**, **h** et **i** et ceux du PEG aux pics **a**, **b**, **c** et **d**.

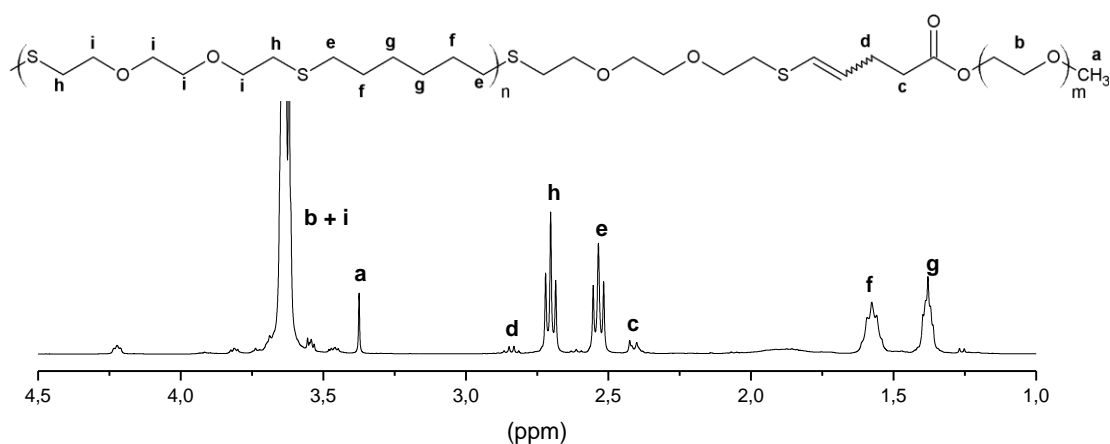


Figure II.27 : Spectre RMN ^1H du copolymère PEG-*b*-PTE dans le CDCl₃

II.3.1.3 Sulfonation du copolymère

Après le greffage du PEG, on procède à la sulfonation du PTE selon des conditions décrites par Van den Berg⁵¹ en présence de H₂O₂ et d'acide acétique. Au bout d'une nuit, le copolymère est précipité dans de l'éther diéthylique puis filtré et enfin lavé abondamment avec de l'éther.

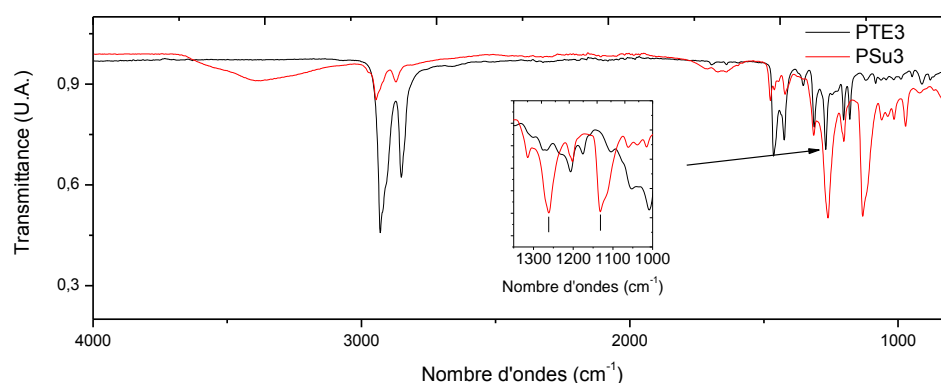


Figure II.28 : Spectre FTIR du PTE3 et du PSu3 (sans oxygène dans le squelette)

Les spectres FTIR du polythioether et du polysulfone sont très proches. On ne constate ni disparition ni apparition de pics. Cette absence de différence provient de la structure du polythioether qui présente des atomes d'oxygène et donc des pics dans la zone où des changements sont visibles. En théorie, les vibrations d'élongations du groupement SO₂ apparaissent sous forme de deux pics entre 1250 cm⁻¹ et 1150 cm⁻¹. Lorsque la sulfonation est conduite sur un polythioether sans atome d'oxygène, ces pics sont clairement visibles (cf. Figure II.28).

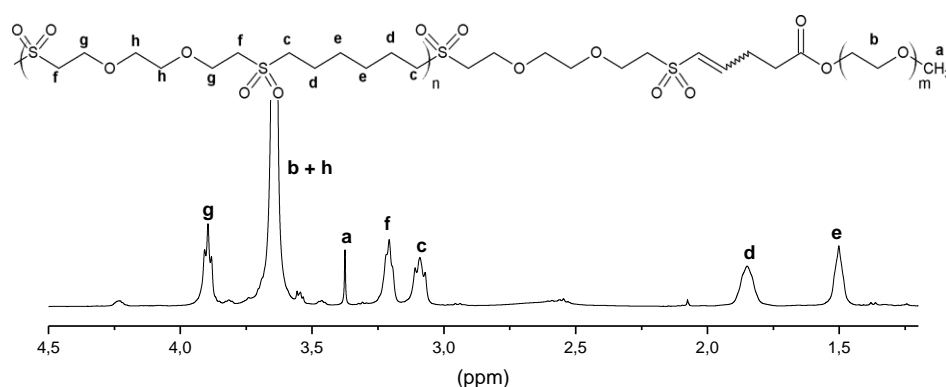


Figure II.29 : Spectre RMN ¹H du PEG-*b*-PSu dans le CDCl₃

En revanche, l'oxydation des sulfures du bloc PTE (avec oxygène dans le squelette) change le spectre RMN ^1H du copolymère (cf. Figure II.29). Après sulfonation, tous les protons du bloc PTE sont plus déblindés excepté les protons **h** qui sont entre deux oxygènes.

Le PEG-*b*-PSu, bien qu'il soit plus soluble que le polysulfone seul en se dissolvant dans le chloroforme, par exemple, n'est pas soluble dans le THF. L'analyse en chromatographie d'exclusion stérique est donc effectuée dans un mélange DMSO/THF.

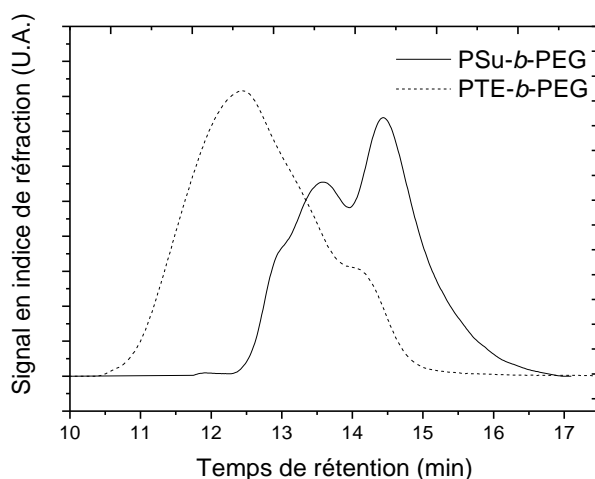


Figure II.30 : Chromatogrammes des copolymères PEG-*b*-PSu dans DMSO/THF et du PEG-*b*-PTE dans THF

Le chromatogramme du PEG-*b*-PSu dans le DMSO/THF est représenté sur la Figure II.30. Par rapport au copolymère non sulfoné, son temps de rétention est décalé vers les plus petites masses du fait du changement de solvant. La masse molaire apparente correspondante est de 3000 g/mol avec un indice de polymolécularité de 1,3. La masse est bien plus faible que celle avant sulfonation (7600 g/mol) et l'indice de polymolécularité diminue. De plus, on voit que la forme du chromatogramme est différente avec un épaulement important à gauche du pic principal contrairement au PEG-*b*-PTE qui a un épaulement vers la droite. La valeur de M_n déterminée est aberrante. Il semble que le DMSO ne soit pas un bon solvant pour le copolymère. L'utilisation de cette valeur induit une incertitude dans la suite de l'étude. Il est plus raisonnable d'utiliser la masse du PTE de départ (avec l'ajout de la masse des oxygènes après oxydation).

II.3.2 Auto-assemblage par nanopréciipitation

L'auto-assemblage du copolymère PEG-*b*-PSu dans l'eau a été réalisé également par nanopréciipitation. Les conditions de nanopréciipitation sont les suivantes : 5 mg de copolymère sont dissous dans 2 mL de DMSO. Ensuite cette solution est nanopréciipitée

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

goutte à goutte dans 4 mL d'eau et le solvant est éliminé par dialyse. Une filtration avec une membrane de 0,45 μm est effectuée et la concentration finale est de 0,45 mg/mL.

La taille de ces nanoparticules est étudiée par des techniques de diffusion et par TEM. En DNPA, on travaille avec du D_2O pour avoir le maximum de contraste. De ce fait, la nanoprécipitation est faite directement dans ce solvant deutéré et la dialyse est effectuée contre de l'eau lourde.

Composé	P_{DNPA} (10^{10} cm^{-2})
D_2O	6,39
H_2O	-0,56
PEG hydrogéné	0,68
PSu hydrogéné	0,03

Tableau II.4 : Densités de longueur de diffusion ρ des composés utilisés

Le signal de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion est représenté sur la Figure II.31.

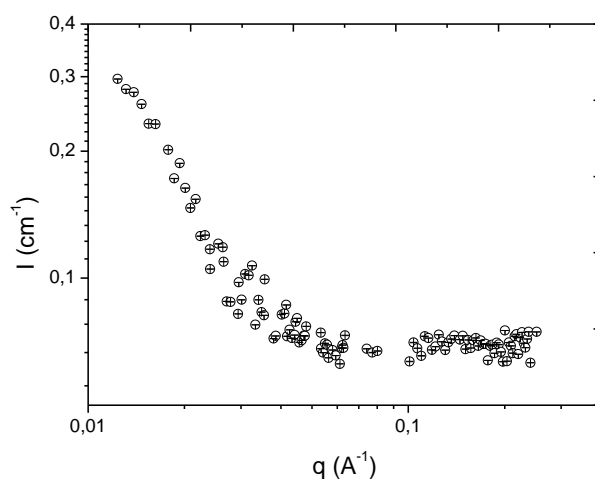


Figure II.31 : Spectre DNPA des nanoparticules PSu-*b*-PEG à 0,45 mg/mL

L'absence de plateau visible aux petites valeurs de q indique que les objets sont d'une taille supérieure à 100 nm et qu'il n'est pas possible de faire des ajustements et de tirer des données quantitatives. Bien que la masse du copolymère PEG-*b*-PSu soit plus faible que celle du copolymère PEG-*b*-PMA*t*Bu, les objets après nanoprécipitation sont plus gros. De ce fait, la gamme de q n'est pas adaptée pour ces objets. L'effet de l'irradiation pourra, néanmoins, être évalué à partir de l'allure des spectres des échantillons après irradiation (voir chapitre suivant).

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

En DLS, le diamètre hydrodynamique moyen estimé par la méthode des cumulants est de 112 nm avec une polydispersité de 0,42. Les objets sont donc bien plus gros que les micelles PEG-*b*-PMA_tBu.

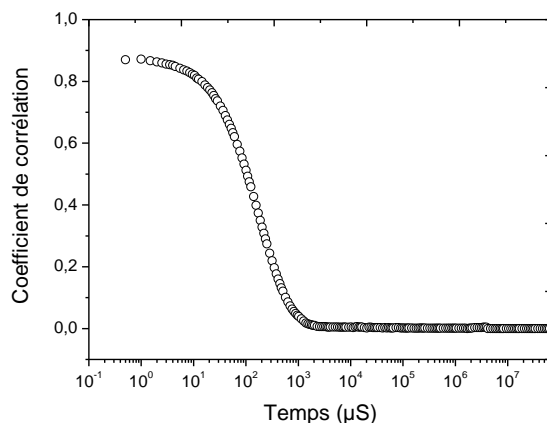


Figure II.32 : Fonction de corrélation des nanoparticules PEG-*b*-PSu

En TEM, elles sont observées après coloration négative des grilles de microscopie. Ici, l'agent contrastant utilisé est de l'acétate d'uranyle.

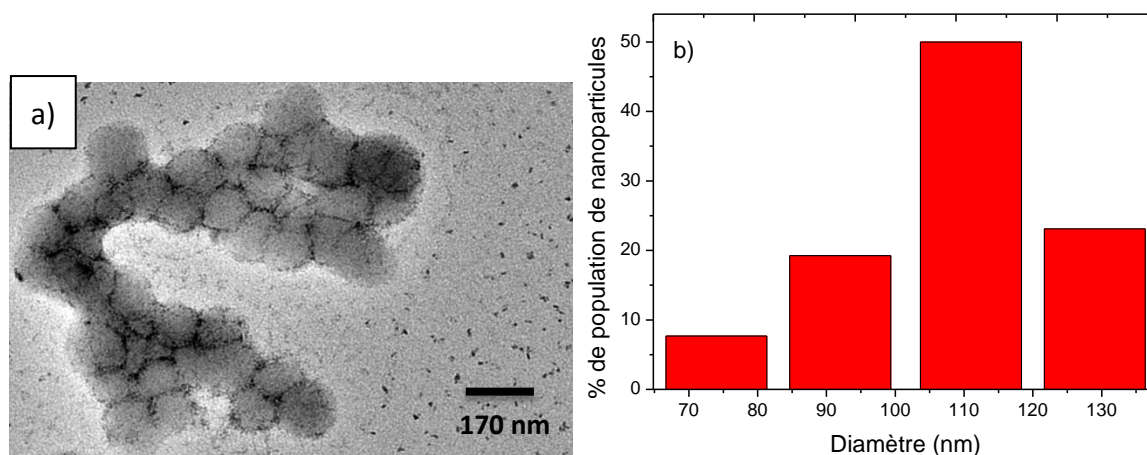


Figure II.33: a) Image TEM après coloration négative et b) distribution de taille des nanoparticules PEG-*b*-PSu

La Figure II.33 présente un cliché TEM des nanoparticules PEG-*b*-PSu et la distribution en taille correspondante après traitement sur ImageJ de plusieurs clichés. Les nanoparticules sont de forme sphérique et ont une taille moyenne d'environ 110 nm. On voit bien la délimitation de chaque nanoparticule individualisée grâce à la coloration négative. Ici, le TEM et la DLS sont en accord.

Après nanopréciptation, le copolymère PEG-*b*-PSu s'auto-assemble sous forme de nanoparticules de 110 nm dont la structure reste à caractériser.

II.4 Tests de cytotoxicité *in vitro*

La cytotoxicité des nanoparticules/micelles de copolymères amphiphiles a été évaluée par des tests MTT. En effet, une application dans le domaine des nanomédicaments ou encore en radiosensibilisation, exige de connaître les effets cytotoxiques de ces nano-objets.

La cytotoxicité des nano-objets a été déterminée en évaluant la viabilité de cellules en utilisant un test MTT (bromure de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphénylTétrazolium). Ces essais ont été réalisés sur une lignée cellulaire d'une souris mâle de type fibroblastes (lignée L929). L'utilisation de ces cellules est recommandée lors de tests MTT par la réglementation (norme NF EN ISO 10993-5). Le principe du test MTT est de mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale dépendante des cellules vivantes. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme la MTT de couleur jaune, en cristaux de formazan de couleur pourpre. Après dissolution de ces cristaux dans le DMSO, une simple lecture spectrophotométrique est réalisée à 570 nm pour connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement.

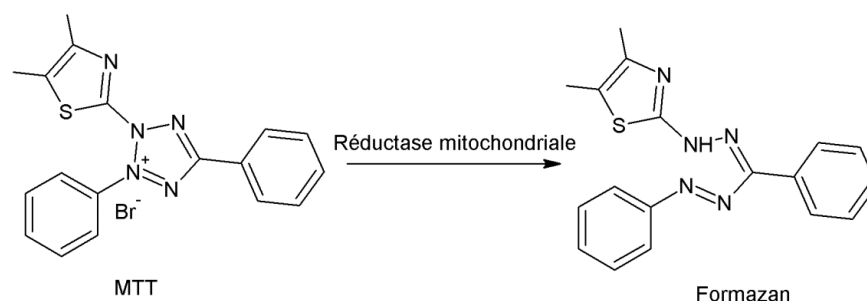


Figure II.34 : Principe de la réduction de la MTT

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture cellulaire puis sont déposées dans des plaques de 96 puits avec une densité de 2500 cellules/puits. Les solutions de micelles ou nanoparticules sont ajoutées aux cellules. Le test MTT dont le protocole est développé en Annexe 1 a ensuite été réalisé.

La limite du seuil de cytotoxicité est fixée à 70 % de viabilité cellulaire par la norme NF EN ISO 10993-5, c'est-à-dire que pour des pourcentages de viabilité inférieurs à 70 %, les cellules sont endommagées.

La Figure II.35 représente la viabilité des cellules en fonction de différentes concentrations massiques en micelles de PEG-*b*-PMA_tBu (0 à 100 µg/mL).

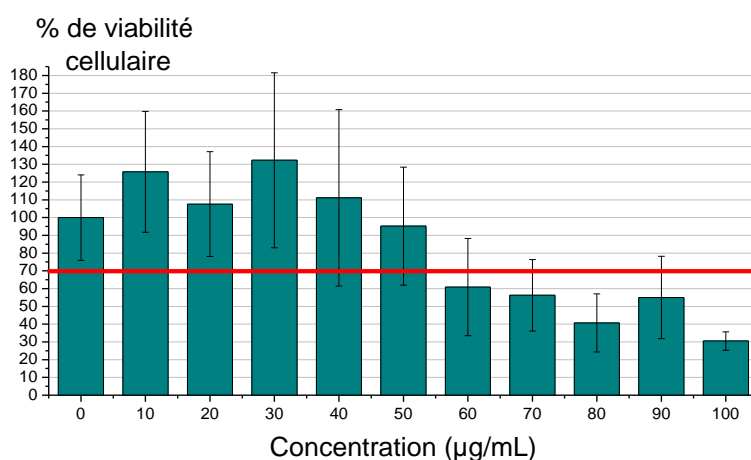


Figure II.35 : Viabilité des cellules (en %) en fonction de la concentration de micelles de PEG-*b*-PMA_tBu

Les cellules incubées avec des micelles de PEG-*b*-PMA_tBu à une concentration supérieure ou égale à 60 µg/mL sont endommagées. Néanmoins, la prise en compte des barres d'erreurs donne une toxicité des micelles seulement à partir de 90 µg/mL.

De même, la toxicité des nanoparticules de PEG-*b*-PSu *via* un test MTT a été mesurée. La Figure II.36 indique la viabilité cellulaire des cellules L929 en présence de nanoparticules à différentes concentrations (0 à 225 µg/mL). Sur le diagramme, il y a deux valeurs à 0 µg/mL car la dernière concentration a été obtenue par une dilution différente des autres concentrations. De ce fait, un nouveau « blanc » a été réalisé pour correspondre à la bonne dilution. On peut voir que les nanoparticules ne sont pas du tout cytotoxiques pour la gamme de concentration étudiée.

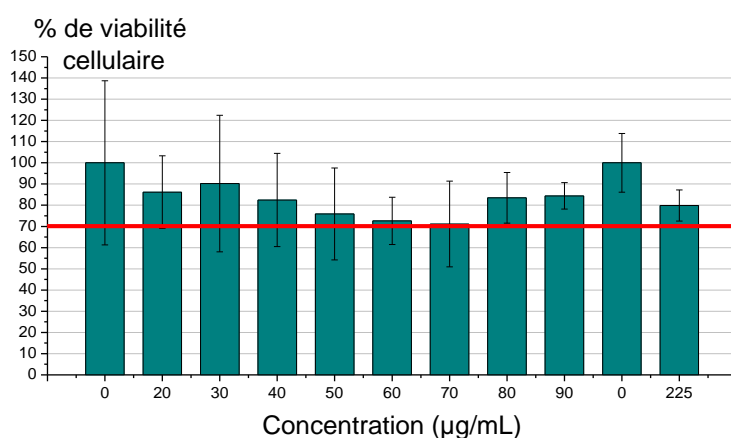


Figure II.36 : Viabilité des cellules (en %) en fonction de la concentration de nanoparticules de PEG-*b*-PSu

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

La cytotoxicité par des tests MTT sur des copolymères capables de s'auto-assembler a déjà été étudiée. Néanmoins, ces études ont été faites sur des copolymères dont la composition est différente des copolymères étudiés dans ce chapitre. En général, la gamme de concentration étudiée est de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'équipe de Wang⁵² n'a pas observé de toxicité des micelles de PEG-*b*-polyméthacrylamide sur des cellules de fibroblastes de souris (3T3) avec cette gamme de concentration. Des triblocs poly(acide méthacrylique)-*b*-PEG-*b*-poly(acide méthacrylique) synthétisés par Luo et coll⁵³. présentent une cytotoxicité à partir de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ envers des cellules L929.

Pour les micelles PEG-*b*-PMA*t*Bu, il semble que la cytotoxicité soit plus importante que celle observée dans la littérature pour les mêmes concentrations. Alors qu'avec les nanoparticules PEG-*b*-PSu, dans cette gamme de concentration, il n'y a pas de toxicité envers les cellules. Chaque système a une cytotoxicité qui lui est propre, dépendant de la constitution des blocs et de leur longueur. Il est donc bien nécessaire de faire ces tests pour chaque nouveau copolymère.

II.5 Conclusion

Dans ce chapitre, la synthèse de deux types de copolymères amphiphiles a été décrite. Ces copolymères se différencient par leur partie hydrophobe qui a elle-même un comportement spécifique sous irradiation.

Un premier copolymère, PEG-*b*-PMA*t*Bu, a été synthétisé à partir d'un PEG amorceur par ATRP du méthacrylate de *tert*-butyle. Après des techniques de caractérisation classiques, permettant de confirmer la présence des deux blocs, l'auto-assemblage de ce copolymère a été obtenu par nanopréciipitation. Une optimisation de ce protocole de nanopréciipitation a permis d'obtenir des micelles avec une structure « crew-cut » dont le rayon de giration est de 12 nm d'après les mesures par diffusion de neutrons.

Le second copolymère PEG-*b*-Polysulfone a nécessité plusieurs étapes de synthèse. Un polythioether (PTE), précurseur du polysulfone, a été synthétisé *via* une polymérisation thiol-ène, impliquant l'utilisation de deux monomères difonctionnels. Suite à cette polymérisation, un PEG fonctionnalisé a été greffé à ce PTE *via* une réaction thiol-yne. Enfin, l'oxydation du copolymère permet d'obtenir un copolymère à base de polysulfone (PSu). Bien que le copolymère PEG-*b*-PSu ait une masse plus faible que le copolymère PEG-*b*-PMA*t*Bu, des nanoparticules avec un rayon plus grand (55 nm) ont été obtenues.

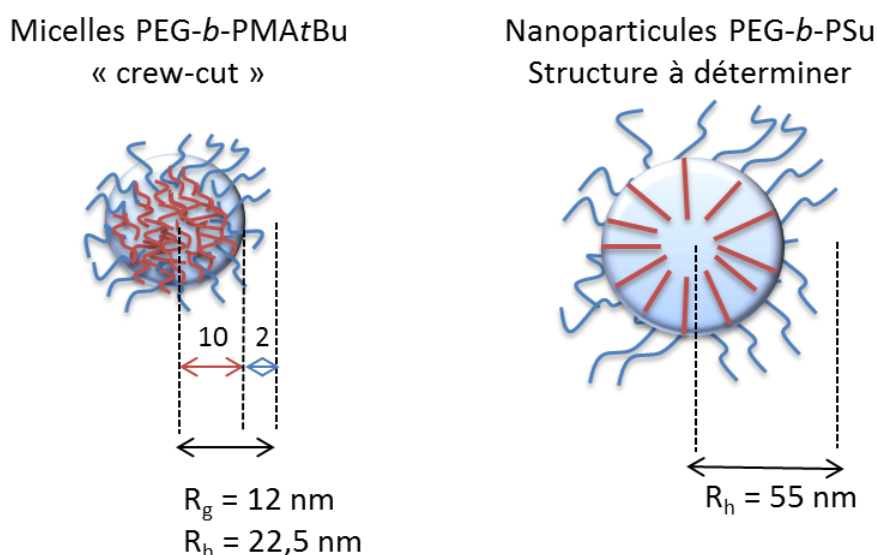


Figure II.37 : Tailles et structures des copolymères PEG-*b*-PMA*t*Bu et PEG-*b*-PSu dans l'eau

II.6 Références

1. Ungar, I. S.; Kircher, J. F.; Gager, W. B.; Sliemers, F. A.; Leininger, R. I., Radiolysis of the isomeric poly(butyl methacrylates). *Journal of Polymer Science Part A: General Papers* **1963**, *1* (1), 277-288.
2. Lobe, J. M.; Swager, T. M., Radiation Detection: Resistivity Responses in Functional Poly(Olefin Sulfone)/Carbon Nanotube Composites. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (1), 95-98.
3. Bowden, M. J.; Thompson, L. F., Electron irradiation of poly(olefin sulfones). Application to electron beam resists. *Journal of Applied Polymer Science* **1973**, *17* (10), 3211-3221.
4. Lodge, T. P., Block Copolymers: Past Successes and Future Challenges. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2003**, *204* (2), 265-273.
5. (a) Tyrrell, Z. L.; Shen, Y.; Radosz, M., Fabrication of micellar nanoparticles for drug delivery through the self-assembly of block copolymers. *Progress in Polymer Science* **2010**, *35* (9), 1128-1143; (b) Rösler, A.; Vandermeulen, G. W. M.; Klok, H.-A., Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, Supplement, 270-279; (c) Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y., Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *47* (1), 113-131.
6. Bates, C. M.; Maher, M. J.; Janes, D. W.; Ellison, C. J.; Willson, C. G., Block Copolymer Lithography. *Macromolecules* **2014**, *47* (1), 2-12.
7. Matyjaszewski, K.; Davis, T. P., *Handbook of radical polymerization*. Wiley-Interscience New York: **2002**; Vol. 5.
8. Wang, J.-S.; Matyjaszewski, K., Controlled/"living" radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (20), 5614-5615.
9. Kato, M.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M.; Higashimura, T., Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization. *Macromolecules* **1995**, *28* (5), 1721-1723.
10. Matyjaszewski, K., Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules* **2012**, *45* (10), 4015-4039.
11. Kwak, Y.; Magenau, A. J. D.; Matyjaszewski, K., ARGET ATRP of Methyl Acrylate with Inexpensive Ligands and ppm Concentrations of Catalyst. *Macromolecules* **2011**, *44* (4), 811-819.
12. (a) Jankova, K.; Chen, X.; Kops, J.; Batsberg, W., Synthesis of Amphiphilic PS-b-PEG-b-PS by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **1998**, *31* (2), 538-541; (b) J. Ashford, E.; Naldi, V.; O'Dell, R.; C. Billingham, N.; P. Armes, S., First example of the atom transfer radical polymerisation of an acidic monomer: direct synthesis of methacrylic acid copolymers in aqueous media. *Chemical Communications* **1999**, (14), 1285-1286.
13. (a) Lee, S. B.; Russell, A. J.; Matyjaszewski, K., ATRP Synthesis of Amphiphilic Random, Gradient, and Block Copolymers of 2-(Dimethylamino)ethyl Methacrylate and n-Butyl Methacrylate in Aqueous Media. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (5), 1386-1393; (b) Cai, Y.; Armes, S. P., A Zwitterionic ABC Triblock Copolymer That Forms a "Trinity" of Micellar Aggregates in Aqueous Solution. *Macromolecules* **2004**, *37* (19), 7116-7122.

14. (a) Zhou, H.; Liu, C.; Gao, C.; Qu, Y.; Shi, K.; Zhang, W., Polymerization-induced self-assembly of block copolymer through dispersion RAFT polymerization in ionic liquid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2016**, *54* (11), 1517-1525; (b) Turturică, G.; Andrei, M.; Stănescu, P. O.; Drăghici, C.; Vuluga, D. M.; Zaharia, A.; Sârbu, A.; Teodorescu, M., ABA triblock copolymers of poly(N-isopropylacrylamide-co-5,6-benzo-2-methylene -1,3-dioxepane) (A) and poly(ethylene glycol) (B): synthesis and thermogelation and degradation properties in aqueous solutions. *Colloid and Polymer Science* **2016**, *294* (4), 743-753; (c) Lu, F.; Luo, Y.; Li, B.; Zhao, Q.; Schork, F. J., Synthesis of Thermo-Sensitive Nanocapsules via Inverse Miniemulsion Polymerization Using a PEO-RAFT Agent. *Macromolecules* **2010**, *43* (1), 568-571; (d) Wang, L.; Liu, G.; Wang, X.; Hu, J.; Zhang, G.; Liu, S., Acid-Disintegratable Polymersomes of pH-Responsive Amphiphilic Diblock Copolymers for Intracellular Drug Delivery. *Macromolecules* **2015**, *48* (19), 7262-7272; (e) Gao, C.; Li, S.; Li, Q.; Shi, P.; Shah, S. A.; Zhang, W., Dispersion RAFT polymerization: comparison between the monofunctional and bifunctional macromolecular RAFT agents. *Polymer Chemistry* **2014**, *5* (24), 6957-6966; (f) He, Y.; Lodge, T. P., Thermoreversible Ion Gels with Tunable Melting Temperatures from Triblock and Pentablock Copolymers. *Macromolecules* **2008**, *41* (1), 167-174.
15. (a) Khanal, A.; Yusa, S.-i.; Nakashima, K., Fabrication of Nanoaggregates of a Triple Hydrophilic Block Copolymer by Cetyltrimethylammonium Chloride Binding. *Langmuir* **2007**, *23* (21), 10511-10517; (b) Hu, J.; Whittaker, M. R.; Quinn, J. F.; Davis, T. P., Nitric Oxide (NO) Endows Arylamine-Containing Block Copolymers with Unique Photoresponsive and Switchable LCST Properties. *Macromolecules* **2016**, *49* (7), 2741-2749.
16. (a) Ranger, M.; Jones, M.-C.; Yessine, M.-A.; Leroux, J.-C., From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2001**, *39* (22), 3861-3874; (b) Dufresne, M. H.; Garrec, D. L.; Sant, V.; Leroux, J. C.; Ranger, M., Preparation and characterization of water-soluble pH-sensitive nanocarriers for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *277* (1-2), 81-90; (c) Sant, V. P.; Smith, D.; Leroux, J.-C., Novel pH-sensitive supramolecular assemblies for oral delivery of poorly water soluble drugs: preparation and characterization. *Journal of Controlled Release* **2004**, *97* (2), 301-312; (d) Dufresne, M.-H.; Leroux, J.-C., Study of the Micellization Behavior of Different Order Amino Block Copolymers with Heparin. *Pharmaceutical Research* **2004**, *21* (1), 160-169; (e) Gaucher, G.; Dufresne, M.-H.; Sant, V. P.; Kang, N.; Maysinger, D.; Leroux, J.-C., Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2005**, *109* (1-3), 169-188; (f) Jones, M.-C.; Ranger, M.; Leroux, J.-C., pH-Sensitive Unimolecular Polymeric Micelles: Synthesis of a Novel Drug Carrier. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14* (4), 774-781.
17. (a) Suggs, L. J.; Payne, R. G.; Yaszemski, M. J.; Alemany, L. B.; Mikos, A. G., Synthesis and Characterization of a Block Copolymer Consisting of Poly(propylene fumarate) and Poly(ethylene glycol). *Macromolecules* **1997**, *30* (15), 4318-4323; (b) Erothu, H.; Sohdi, A. A.; Kumar, A. C.; Sutherland, A. J.; Dagron-Lartigau, C.; Allal, A.; Hiorns, R. C.; Topham, P. D., Facile synthesis of poly(3-hexylthiophene)-block-poly(ethylene oxide) copolymers via Steglich esterification. *Polymer Chemistry* **2013**, *4* (13), 3652-3655.
18. (a) Iha, R. K.; Wooley, K. L.; Nyström, A. M.; Burke, D. J.; Kade, M. J.; Hawker, C. J., Applications of Orthogonal "Click" Chemistries in the Synthesis of Functional Soft Materials. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (11), 5620-5686; (b) Kempe, K.; Krieg, A.; Becer, C. R.; Schubert, U. S., "Clicking" on/with polymers: a rapidly expanding field for the straightforward preparation of novel macromolecular architectures. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (1), 176-191; (c) Goldmann, A. S.; Glassner, M.; Inglis, A. J.; Barner-Kowollik, C., Post-Functionalization of Polymers via Orthogonal Ligation Chemistry. *Macromolecular Rapid Communications* **2013**, *34* (10), 810-849.

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

19. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2004-2021.
20. (a) Opsteen, J. A.; van Hest, J. C. M., Modular synthesis of block copolymers via cycloaddition of terminal azide and alkyne functionalized polymers. *Chemical Communications* **2005**, (1), 57-59; (b) Drockenmuller, E.; Colinet, I.; Damiron, D.; Gal, F.; Perez, H.; Carrot, G., Efficient Approaches for the Surface Modification of Platinum Nanoparticles via Click Chemistry. *Macromolecules* **2010**, *43* (22), 9371-9375.
21. (a) Lowe, A. B., Thiol-ene "click" reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry* **2010**, *1* (1), 17-36; (b) Theato, P.; Klok, H. A., *Functional Polymers by Post-Polymerization Modification: Concepts, Guidelines and Applications*. Wiley: **2013**.
22. Lowe, A. B., Thiol-yne 'click'/coupling chemistry and recent applications in polymer and materials synthesis and modification. *Polymer* **2014**, *55* (22), 5517-5549.
23. Deubel, F.; Bretzler, V.; Holzner, R.; Helbich, T.; Nuyken, O.; Rieger, B.; Jordan, R., Polythioethers by Thiol-Ene Click Polyaddition of α,ω -Alkylene Thiols. *Macromolecular Rapid Communications* **2013**, *34* (12), 1020-1025.
24. Sprafke, J. K.; Spruell, J. M.; Mattson, K. M.; Montarnal, D.; McGrath, A. J.; Pötzsch, R.; Miyajima, D.; Hu, J.; Latimer, A. A.; Voit, B. I.; Aida, T.; Hawker, C. J., Revisiting thiol-yne chemistry: Selective and efficient monoaddition for block and graft copolymer formation. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2015**, *53* (2), 319-326.
25. Posner, T., Beiträge zur Kenntniss der ungesättigten Verbindungen. II. Ueber die Addition von Mercaptanen an ungesättigte Kohlenwasserstoffe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1905**, *38* (1), 646-657.
26. Serniuk, G. E.; Banes, F. W.; Swaney, M. W., Study of the Reaction of Buna Rubbers with Aliphatic Mercaptans. *Journal of the American Chemical Society* **1948**, *70* (5), 1804-1808.
27. Griesbaum, K., Problems and Possibilities of the Free-Radical Addition of Thiols to Unsaturated Compounds. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1970**, *9* (4), 273-287.
28. (a) Hoyle, C. E.; Lee, T. Y.; Roper, T., Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, *42* (21), 5301-5338; (b) Kade, M. J.; Burke, D. J.; Hawker, C. J., The power of thiol-ene chemistry. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2010**, *48* (4), 743-750.
29. Dondoni, A., The Emergence of Thiol-Ene Coupling as a Click Process for Materials and Bioorganic Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (47), 8995-8997.
30. (a) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (9), 1540-1573; (b) Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N., Thiol-click chemistry: a multifaceted toolbox for small molecule and polymer synthesis. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (4), 1355-1387.
31. Killops, K. L.; Campos, L. M.; Hawker, C. J., Robust, Efficient, and Orthogonal Synthesis of Dendrimers via Thiol-ene "Click" Chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (15), 5062-5064.
32. Walling, C.; Helmreich, W., Reactivity and Reversibility in the Reaction of Thiyl Radicals with Olefins. *Journal of the American Chemical Society* **1959**, *81* (5), 1144-1148.

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

33. Koo, S. P. S.; Stamenović, M. M.; Prasath, R. A.; Inglis, A. J.; Du Prez, F. E.; Barner-Kowollik, C.; Van Camp, W.; Junkers, T., Limitations of radical thiol-ene reactions for polymer-polymer conjugation. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2010**, *48* (8), 1699-1713.
34. Türünç, O.; Meier, M. A. R., A novel polymerization approach via thiol-yne addition. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2012**, *50* (9), 1689-1695.
35. Chen, G.; Kumar, J.; Gregory, A.; Stenzel, M. H., Efficient synthesis of dendrimers via a thiol-yne and esterification process and their potential application in the delivery of platinum anti-cancer drugs. *Chemical Communications* **2009**, (41), 6291-6293.
36. Konkolewicz, D.; Poon, C. K.; Gray-Weale, A.; Perrier, S., Hyperbranched alternating block copolymers using thiol-yne chemistry: materials with tuneable properties. *Chemical Communications* **2011**, *47* (1), 239-241.
37. Fairbanks, B. D.; Sims, E. A.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N., Reaction Rates and Mechanisms for Radical, Photoinitiated Addition of Thiols to Alkynes, and Implications for Thiol-Yne Photopolymerizations and Click Reactions. *Macromolecules* **2010**, *43* (9), 4113-4119.
38. Liu, J.; Lam, J. W. Y.; Jim, C. K. W.; Ng, J. C. Y.; Shi, J.; Su, H.; Yeung, K. F.; Hong, Y.; Faisal, M.; Yu, Y.; Wong, K. S.; Tang, B. Z., Thiol-Yne Click Polymerization: Regio- and Stereoselective Synthesis of Sulfur-Rich Acetylenic Polymers with Controllable Chain Conformations and Tunable Optical Properties. *Macromolecules* **2011**, *44* (1), 68-79.
39. Fairbanks, B. D.; Scott, T. F.; Kloxin, C. J.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N., Thiol-Yne Photopolymerizations: Novel Mechanism, Kinetics, and Step-Growth Formation of Highly Cross-Linked Networks. *Macromolecules* **2009**, *42* (1), 211-217.
40. Gokmen, M. T.; Brassinne, J.; Prasath, R. A.; Du Prez, F. E., Revealing the nature of thio-click reactions on the solid phase. *Chemical Communications* **2011**, *47* (16), 4652-4654.
41. Xia, J.; Matyjaszewski, K., Controlled/"Living" Radical Polymerization. Atom Transfer Radical Polymerization Using Multidentate Amine Ligands. *Macromolecules* **1997**, *30* (25), 7697-7700.
42. Fischer, H., The Persistent Radical Effect: A Principle for Selective Radical Reactions and Living Radical Polymerizations. *Chemical Reviews* **2001**, *101* (12), 3581-3610.
43. Lepeltier, E.; Bourgaux, C.; Couvreur, P., Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, *71*, 86-97.
44. Vitale, S. A.; Katz, J. L., Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid-Liquid Nucleation: "The Ouzo Effect". *Langmuir* **2003**, *19* (10), 4105-4110.
45. Legrand, P.; Lesieur, S.; Bochot, A.; Gref, R.; Raatjes, W.; Barratt, G.; Vauthier, C., Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *344* (1-2), 33-43.
46. Pedersen, J. S.; Gerstenberg, M. C., Scattering Form Factor of Block Copolymer Micelles. *Macromolecules* **1996**, *29* (4), 1363-1365.
47. Webber, S. E.; Munk, P.; Tuzar, Z., *Solvents and Self-Organization of Polymers*. Springer Netherlands: 2012.
48. Jasinski, F.; Lobry, E.; Tarablsi, B.; Chemtob, A.; Croutxé-Barghorn, C.; Le Nouen, D.; Criqui, A., Light-Mediated Thiol-Ene Polymerization in Miniemulsion: A Fast Route to Semicrystalline Polysulfide Nanoparticles. *ACS Macro Letters* **2014**, *3* (9), 958-962.

Chapitre II : Synthèse de nano-objets polymères : micelles/nanoparticules

49. (a) Marvel, C. S.; Chambers, R. R., Polyalkylene Sulfides from Diolefins and Dimercaptans. *Journal of the American Chemical Society* **1948**, *70* (3), 993-998; (b) Lluch, C.; Ronda, J. C.; Galià, M.; Lligadas, G.; Cádiz, V., Rapid Approach to Biobased Telechelics through Two One-Pot Thiol-Ene Click Reactions. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (6), 1646-1653.
50. (a) Malkoch, M.; Schleicher, K.; Drockenmuller, E.; Hawker, C. J.; Russell, T. P.; Wu, P.; Fokin, V. V., Structurally Diverse Dendritic Libraries: A Highly Efficient Functionalization Approach Using Click Chemistry. *Macromolecules* **2005**, *38* (9), 3663-3678; (b) Damiron, D.; Desorme, M.; Ostaci, R.-V.; Al Akhrass, S.; Hamaide, T.; Drockenmuller, E., Functionalized random copolymers from versatile one-pot click chemistry/ATRP tandems approaches. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2009**, *47* (15), 3803-3813.
51. van den Berg, O.; Dispinar, T.; Hommez, B.; Du Prez, F. E., Renewable sulfur-containing thermoplastics via AB-type thiol-ene polyaddition. *European Polymer Journal* **2013**, *49* (4), 804-812.
52. Zhou, X.; Luo, S.; Tang, R.; Wang, R.; Wang, J., Diblock Copolymers of Polyethylene Glycol and a Polymethacrylamide with Side-Chains Containing Twin Ortho Ester Rings: Synthesis, Characterization, and Evaluation as Potential pH-Responsive Micelles. *Macromolecular Bioscience* **2015**, *15* (3), 385-394.
53. Luo, Y.-L.; Yu, W.; Xu, F., pH-responsive PMAA-b-PEG-b-PMAA triblock copolymer micelles for prednisone drug release and release kinetics. *Polymer Bulletin* **2012**, *69* (5), 597-620.

CHAPITRE III

III Chapitre 3 : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

Contenu

III	Chapitre 3 : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles.....	91
III.1	Irradiation des micelles PEG- <i>b</i> -poly(méthacrylate de <i>tert</i> -butyle)	92
III.1.1	Irradiation en milieu oxygéné	93
III.1.2	Irradiation en milieu désoxygéné.....	102
III.1.3	Perspectives : tests de chargement	105
III.1.4	Conclusion	107
III.2	Irradiation des nanoparticules PEG- <i>b</i> -polysulfone.....	108
III.2.1	Irradiation en milieu oxygéné	108
III.2.2	Irradiation en milieu désoxygéné.....	115
III.2.3	Conclusion	118
III.3	Tests de cytotoxicité <i>in vitro</i>	120
III.4	Comportement des micelles/nanoparticules sous irradiation.....	122
III.5	Références	123

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

L'irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles synthétisées et caractérisées dans le chapitre précédent va être étudiée dans ce chapitre III. Ces objets vont servir de modèles pour une étude de stabilité face à des rayonnements ionisants. En effet, ce type de nanostructure est présent dans le domaine des nano-médicaments où la micelle est un vecteur de principe actif qui doit être capable de protéger ce principe actif dans le corps humain. D'autre part, si le polymère se dégrade sous l'effet du rayonnement, on peut envisager de coupler chimiothérapie et radiothérapie pour faire du relargage. Les objets peuvent également être irradiés pour les radiostériliser. La lithographie est aussi un domaine dans lequel on retrouve l'irradiation de structures nanométriques.

Les études de stabilité sont faites dans l'eau. Dans notre étude, les solutions sont irradiées par un appareil appelé GammaCell 3000 Elan irradiator équipé d'une source de ^{137}Cs qui émet des rayons gamma d'une énergie de 660 keV. Les solutions sont irradiées de manière uniforme et continue avec une gamme de dose d'irradiation importante pour étudier à la fois l'effet de la radiostérilisation mais également la possibilité d'un éventuel relargage. Cette gamme va de 40 Gy (10 min) à 20000 Gy (75h). De plus, l'irradiation a été faite sous atmosphères normale et inerte (présence et absence d'oxygène). Seule, l'irradiation de 75h (20000 Gy) n'a pas été faite sans oxygène car le septum utilisé pour maintenir une atmosphère inerte fini par se détériorer et n'est plus étanche après une période aussi longue.

Les solutions de micelles PEG-*b*-PMA t Bu sont irradiées à une concentration de 0,25 mg/mL et les solutions de nanoparticules PEG-*b*-PSu sont irradiées à une concentration de 0,45 mg/mL.

III.1 Irradiation des micelles PEG-*b*-poly(méthacrylate de *tert*-butyle)

Les solutions de micelles PEG-*b*-PMA t Bu ont été irradiées en présence et en absence d'oxygène. Dans les deux cas, il y a formation d'un hydrogel (voir Figure III.1). Alors que celui-ci est quantifié par pesée, seule la fraction de micelles irradiées et solubles est analysée par différentes techniques.

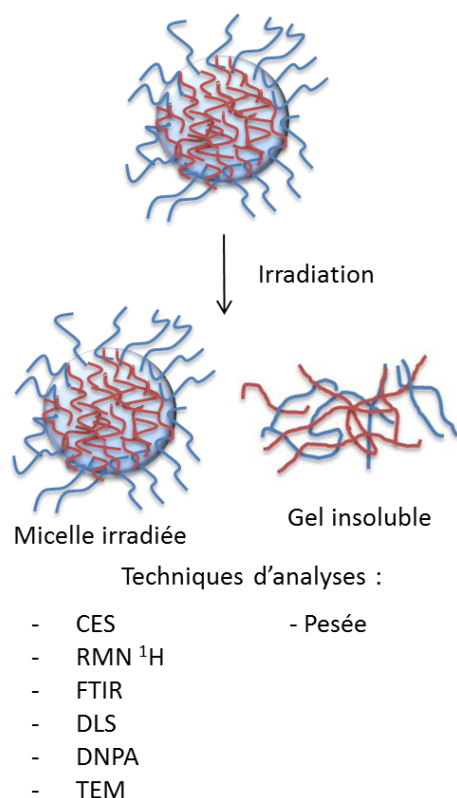


Figure III.1 : Irradiation des micelles PEG-*b*-PMAtBu

III.1.1 Irradiation en milieu oxygéné

III.1.1.1 Etude par chromatographie et spectroscopie

Après irradiation, la solution de micelles est séchée puis la fraction soluble est dispersée dans du THF pour être analysée en chromatographie d'exclusion stérique (CES).

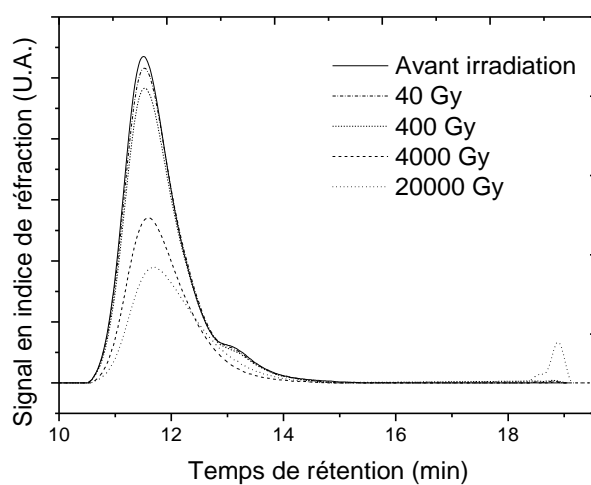


Figure III.2 : Chromatogrammes du copolymère PEG-*b*-PMAtBu après irradiation en milieu oxygéné

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

La Figure III.2 montre l'effet de l'irradiation sur la masse du copolymère à différentes doses d'irradiation. Bien qu'il soit difficile de voir le léger décalage des masses molaires vers les petites masses, la gélification d'une partie du copolymère est plus évidente avec la diminution de l'intensité du pic principal. Un hydrogel est formé lorsqu'un polymère subit des réticulations. On ne peut calculer des rendements de scission et de réticulation à partir des valeurs de CES car la fraction analysée ne tient pas compte de l'ensemble des micelles irradiées du fait de la gélification d'une partie de l'échantillon. Cependant, on peut déterminer un taux de gel qui correspond à la fraction massique d'hydrogel.

Dose (Gy)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	I_p	Taux de gel (%)
0	16300	20200	1,2	-
40	16900	20300	1,2	4
400	16600	20100	1,2	10
4000	16700	19700	1,2	50
20000	14 700 et 130	17500 et 130	1,2 et 1,0	65

Tableau III.1 : M_n , M_w , I_p et taux de gel du copolymère PEG-*b*-PMA_tBu après irradiation en milieu oxygéné

Ici, les taux de gel calculés augmentent avec la dose d'irradiation pour atteindre une valeur de 65 % à 20000 Gy. A cette dose, plus de la moitié du copolymère a donc été gelée. La gélification semble se produire de manière majoritaire.

Sur le Tableau III.1, les M_n et M_w des copolymères aux différentes irradiations sont également présentées ainsi que leur indice de polymolécularité. La masse molaire est inchangée jusqu'à 4000 Gy et c'est à partir de 20000 Gy que la masse diminue avec l'apparition d'une nouvelle masse à 130 g/mol, soit l'équivalent de la masse molaire d'un monomère MA_tBu ou de trois monomères d'éthylène glycol. Les polymolécularités restent constantes également.

Le PMA_tBu qui a été étudié à l'état solide¹ a un comportement sous irradiation très proche du PMMA, connu pour se dégrader par coupure. De plus, la structure du PMA_tBu indique que ce sont majoritairement des coupures qui peuvent avoir lieu au sein du polymère. En effet, Miller et coll². ont montré que selon la structure chimique des polymères vinyliques la dégradation (scission) ou la réticulation peut être anticipée. Suite à l'irradiation, le polymère vinylique subit un arrachement d'hydrogène conduisant à un radical carbocentré.

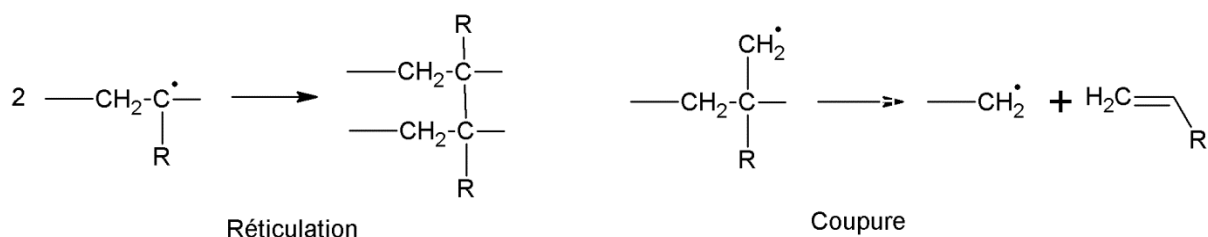


Figure III.3 : Réactions de réticulation et de coupure (scission) de chaînes

C'est le type de radical formé qui va déterminer lequel des deux événements va se produire. Dans le cas des acrylates, le substituant ou le groupe pendent du squelette stabilise le radical formé par arrachement d'un hydrogène en α , il est favorable à la réticulation. Dans le cas des méthacrylates, (abstraction d'un hydrogène en β du groupe pendent) les radicaux sont moins stabilisés et entraînent plutôt un clivage de la liaison (C-C) dans le squelette.

Dans le cas du PMA t Bu, on s'attend donc à avoir des phénomènes de scissions ou coupures.

Il faut remarquer que l'on n'attend pas de différences majeures en termes de scission entre des effets directs et indirects sur le PMA t Bu. Les radicaux libres amènent en général des arrachements de H en position la plus accessible, ici sur le groupement R et en beta. On peut simplement supposer que le groupement *tert*-butyle, de par son nombre d'hydrogène, serait une cible privilégiée pour les radicaux et protégerait la chaîne principale des attaques indirectes.

La présence du PEG a également une influence sur l'irradiation du copolymère. Selon l'état dans lequel il est irradié, le PEG ne subit pas la même dégradation. A l'état solide en présence d'oxygène, les coupures de chaînes dominent sur la réticulation jusqu'à plus de 200 kGy d'irradiation³. En solution, le PEG n'a pas le même comportement. En effet, le polymère en solution est mobile, favorisant la recombinaison des radicaux créés pendant l'irradiation, surtout sous atmosphère inerte³. C'est la réticulation qui est majoritaire comme le montre la Figure III.4.

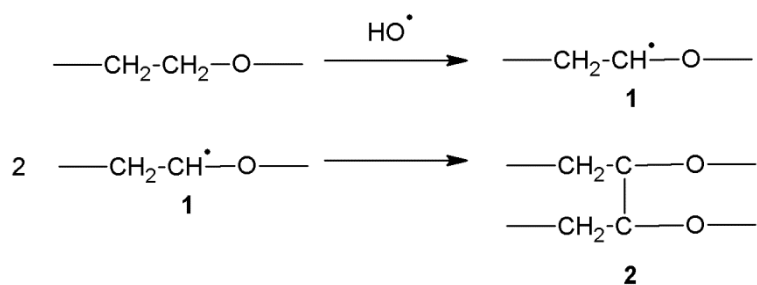


Figure III.4 : Mécanisme de réticulation du PEG

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

Dans notre cas, nous sommes en présence d'un copolymère dont le comportement sous irradiation peut être différent des homopolymères seuls étudiés dans la littérature. Néanmoins, il est possible de faire des comparaisons pour identifier des analogies ou des différences.

Comme ce sont les radicaux hydroxyles de l'eau qui agissent ici, il est envisageable que ces radicaux attaquent dans un premier temps les chaînes hydrophiles du PEG entraînant sa réticulation. L'irradiation de solutions aqueuses de PEG à différentes concentrations a été faite par Güven⁴ pour étudier le pourcentage de gélification en fonction de la dose. Ce pourcentage atteint 85 % à 20000 Gy à la plus faible concentration de 6 g/L. Dans notre étude, la concentration en copolymère est de 0,25 g/L soit une concentration en PEG de 0,095 g/L. Le pourcentage de gélification est de 65 % à 20000 Gy. Les phénomènes de réticulation semblent donc plus efficaces dans notre cas, probablement en raison du nano-assemblage du polymère, qui crée de fait des points de contacts supplémentaires dans le réseau.

La diminution de la masse à 20000 Gy peut être due à des coupures de chaînes qui ont lieu ensuite dans la micelle sûrement au niveau du PMA t Bu. Le rendement de scission mesuré^{1a} pour le PMA t Bu à une dose d'irradiation de 300000 Gy est de $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ à l'état solide. Dans notre cas, à la dose maximale de 20000 Gy, on s'attend à 0,22 nombre de coupure par chaîne, ce qui correspond à une variation de 3000 g/mol du M_n . La différence de masse du pic initial observée est de 2000 g/mol, les ordres de grandeur des rendements de coupure semblent donc comparables avec ce qui est connu dans la littérature. Il ne faut cependant pas oublier qu'une partie significative du PMA t Bu est immobilisée dans la fraction insoluble, ce qui empêche d'être plus quantitatif quant au rendement de coupure effectif.

Ensuite, des spectres RMN ^1H ont été effectués sur la fraction soluble après séchage et resolubilisation dans le chloroforme deutéré. Sur la Figure III.5, on peut voir avec l'irradiation que le ratio du pic des méthyles du *tert*-butyle du PMA t Bu sur le pic des groupements CH_2 du PEG augmente. On passe d'un ratio de 2,5 avant irradiation à un ratio de 33 après irradiation à 20000 Gy. La CES ne nous indique pas de perte significative de la partie PEG du polymère après irradiation. Il y a donc un changement de solubilité du PEG dans le CDCl_3 suite à l'irradiation qui explique cette diminution de son signal RMN, par la formation de grosses structures peu mobiles. Ce changement est vérifié avec l'analyse dans le THF deutéré des copolymères irradiés où les deux blocs sont bien solubles.

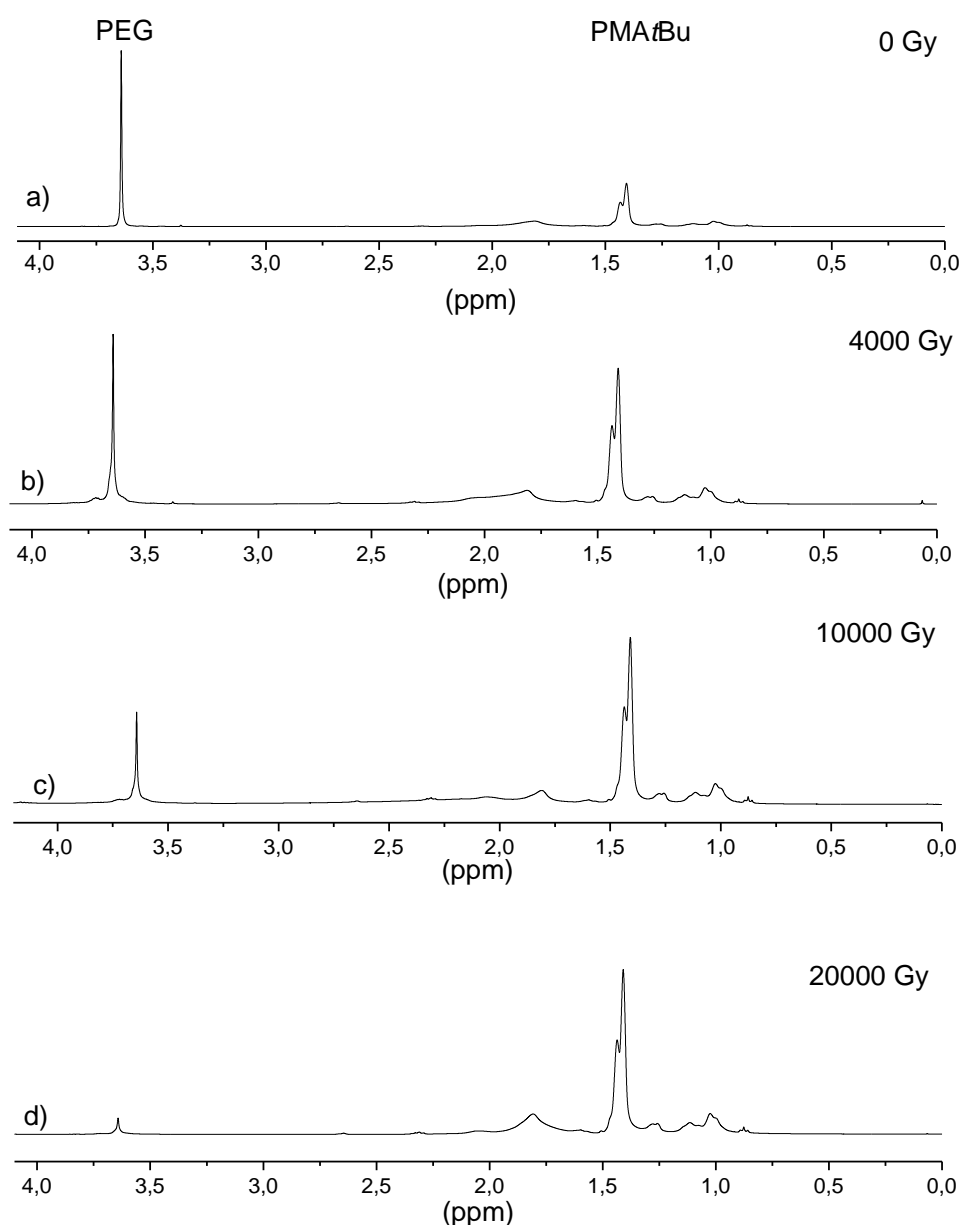


Figure III.5 : Spectres RMN ^1H dans le CDCl_3 des copolymères PEG-*b*-PMA*t*Bu après irradiation en milieu oxygéné

Une analyse FTIR a été également menée sur ces micelles irradiées. L'analyse précise de ces spectres est difficile à cause de la perte de résolution qui se traduit par un élargissement des pics après irradiation. Cet élargissement indique une plus grande hétérogénéité au niveau de la structure des micelles. De plus, un pic large et intense à 1585 cm^{-1} apparaît sur le spectre des micelles irradiées à 20000 Gy. Ce pic est sûrement dû à une fonction carboxylate qui peut être formée lors de l'oxydation du PEG⁵.

Suite aux analyses FTIR et RMN ^1H , on peut suggérer que des changements fins d'hydrophobicité du PEG à forte dose sont associés à des oxydations.

III.1.1.2 Etude par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

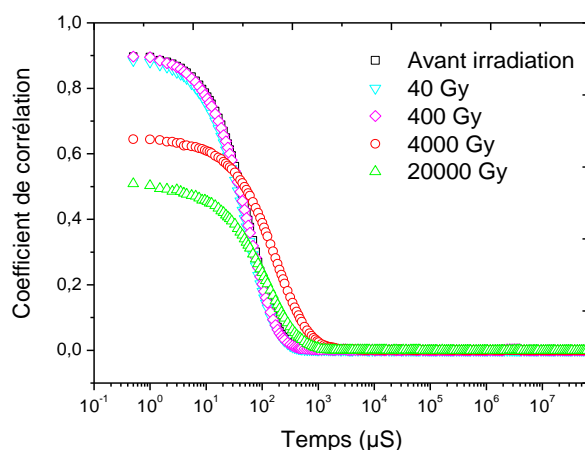


Figure III.6 : Fonctions de corrélation des micelles PEG-*b*-PMAAtBu après irradiation en milieu oxygéné

L'irradiation entraînant la formation d'hydrogel, il est préférable de filtrer les échantillons pour ne pas être gêné par les grosses particules du gel lors des études en diffusion. A 40 Gy et 400 Gy, le corrélogramme est inchangé par rapport à celui avant irradiation. Avec l'irradiation à 4000 Gy, la fonction de corrélation est décalée vers des temps de relaxation plus élevés signe que les micelles sont de tailles plus grandes. A 20000 Gy, la courbe est de nouveau décalée vers des temps plus courts, la taille des micelles est plus petite que celle à 4000 Gy, peut être en raison des coupures à l'intérieur des micelles.

L'augmentation de la taille observée en DLS après irradiation peut être due à une agrégation des micelles ou encore une destruction de celles-ci. Cependant, les pentes des courbes de corrélation donnent une indication sur la polydispersité de l'échantillon. La pente correspondant à l'irradiation à 4000 Gy et à 20000 Gy est beaucoup plus grande que celle de la courbe initiale. L'irradiation commence à former des gros objets en petite quantité. L'échantillon est plus polydisperse.

Enfin, la diminution de la valeur à l'intersection de la courbe et de l'axe des ordonnées indique que la qualité du signal de l'échantillon baisse. Il s'agit simplement de la signature de la formation de gel qui diminue d'autant la quantité de micelles en solution.

Dose (Gy)	D (nm)	Polydispersité
0	45	0,14
40	46	0,18
400	44	0,16
4000	120	0,28
20000	90	0,36

Tableau III.2 : Tailles et polydispersités des micelles PEG-*b*-PMA_tBu après irradiation en milieu oxygéné

III.1.1.3 Etude par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)

La nanoprécipitation du copolymère est faite directement dans le D₂O puis les solutions sont irradiées, filtrées et analysées en DNPA. Le signal de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion pour les micelles avant et après irradiation sous oxygène est représenté sur la Figure III.7.

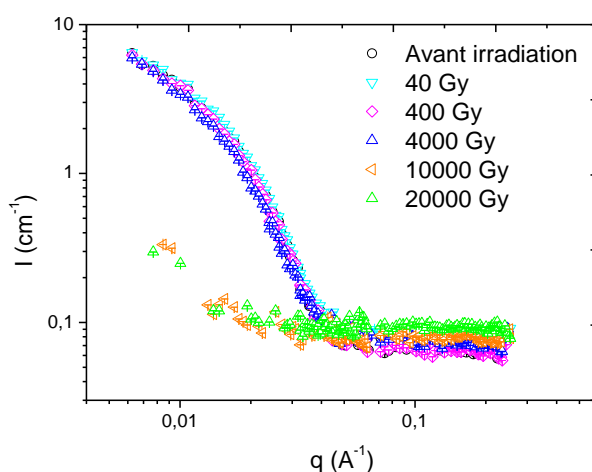


Figure III.7 : Spectres DNPA des micelles PEG-*b*-PMA_tBu après irradiation en milieu oxygéné

Le signal est inchangé jusqu'à 4000 Gy d'irradiation, signe que la micelle conserve la même taille et la même forme de micelle « crew-cut » vue dans le chapitre II.

Cependant, à partir de 10000 Gy, le signal change brusquement : le plateau n'est plus visible et la remontée du signal se fait à plus petit q indiquant que les micelles sont de tailles plus élevées et/ou qu'il y a de l'agrégation. Le signal à 20000 Gy est similaire. De ces différentes observations, on peut dire que l'irradiation n'a pas d'effet progressif sur la taille et la forme des micelles. Il semble qu'il y ait un seuil d'irradiation à partir duquel les micelles sont de plus grande taille et/ou s'agrègent de manière importante. De plus, même après avoir atteint ce seuil il n'y a pas d'évolution de la taille ni de la forme.

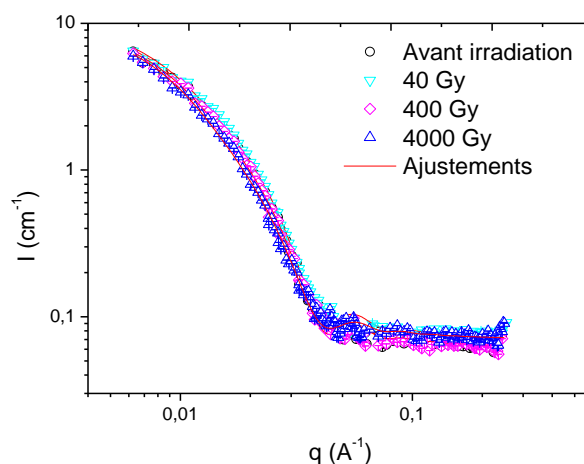


Figure III.8 : Spectres DNPA des micelles PEG-*b*-PMAtBu après irradiation en milieu oxygéné et leur courbe d'ajustement

Ces courbes sont ajustées par le modèle hairy-sphere décrit dans le chapitre précédent. Les courbes correspondant aux irradiations à 10000 Gy et 20000 Gy n'ont pas pu être ajustées avec ce modèle. Le Tableau III.3 regroupe les valeurs obtenues d' I_0 , R_c et R_g après ajustement. Le nombre de chaînes par micelles (150) reste le même jusqu'à 4000 Gy.

Dose (Gy)	I_0 (cm^{-1})	R_{coeur} (nm)	R_g (nm)
0	$9,9 \pm 0,3$	$10,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
40	$10,4 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
400	$9,5 \pm 0,3$	$10,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
4000	$9,5 \pm 0,3$	$10,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$

Tableau III.3 : Résumé des valeurs estimées d' I_0 , R_c et R_g pour les micelles PEG-*b*-PMAtBu après irradiation en milieu oxygéné

Ce tableau confirme que l'irradiation n'a pas d'effet sur la taille et la forme des nano-objets jusqu'à 4000 Gy. On retrouve les mêmes valeurs de R_c et de R_g définissant la taille de la micelle.

Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus précédemment en diffusion de lumière, on observe également ce seuil d'irradiation en DLS mais à une dose d'irradiation plus faible soit 4000 Gy. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la DLS est plus sensible aux objets de grande taille, même en quantité faible.

Pour estimer la taille des micelles après irradiation à 10000 Gy, un cliché TEM a été fait en coloration négative.

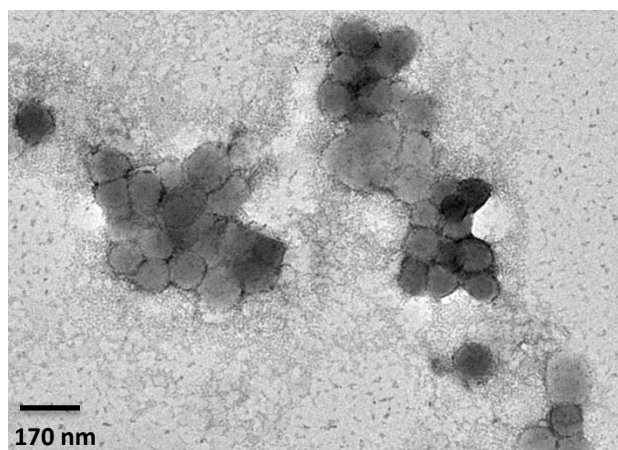


Figure III.9 : Image TEM par coloration négative des micelles PEG-*b*-PMAAtBu après irradiation à 10000 Gy en milieu oxygéné

On observe sur la Figure III.9 qu'après irradiation à 10000 Gy, la taille des micelles a augmenté. En effet, elle passe de 16 nm avant irradiation (en TEM) à 95 nm après irradiation. Cette taille est proche de celle trouvée en DLS à 20000 Gy qui est de 90 nm. De plus, après irradiation, la coloration avec l'acétate d'uranyle donne un contraste différent : les micelles sont plus foncées, suggérant une adsorption de l'uranyle à leur surface.

En conclusion, nous avons observé différents changements suite à l'irradiation des micelles PEG-*b*-PMAAtBu en milieu oxygéné. D'une part, cette irradiation conduit à la formation d'un gel attribué au PEG. D'après la littérature, ce gel se forme plus facilement à des concentrations plus élevées. D'autre part, des coupures sont observées au niveau du PMAAtBu à des doses élevées. Par RMN, nous avons mis en évidence que les copolymères après irradiation s'organisent sous forme de micelles dans le CDCl₃ alors que les chaînes sont bien solubilisées dans le solvant avant irradiation. Ceci suggère une modification de la structure suite à l'irradiation qui peut venir de l'oxydation du PEG. D'après les mesures de diffusion, à 4000 Gy, on observe une coexistence de gros et de petits objets alors qu'à 20000 Gy, il y a majoritairement de gros objets.

Suite à ces observations, en milieu oxygéné, nous allons, maintenant, étudier le comportement des objets sous atmosphère inerte.

III.1.2 Irradiation en milieu désoxygéné

III.1.2.1 Etude par chromatographie et spectroscopie

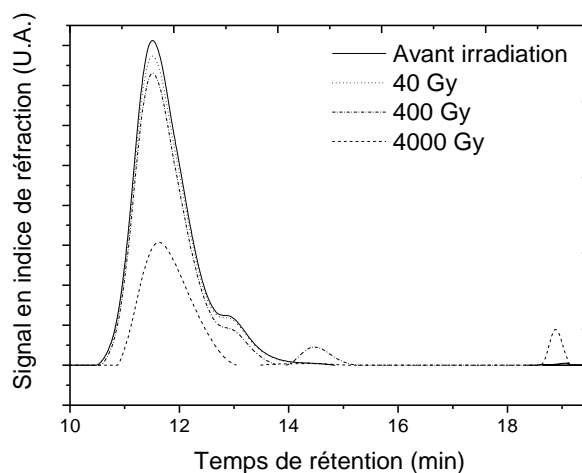


Figure III.10 : Chromatogrammes du copolymère PEG-*b*-PMAAtBu après irradiation en milieu désoxygéné

Les chromatogrammes du copolymère irradié sous atmosphère inerte à différentes doses d'irradiation sont représentés sur la Figure III.10. On rappelle que les irradiations à 20000 Gy n'ont pas été faites sous atmosphère inerte en raison de problèmes d'étanchéité. Les masses molaires (M_n) ne semblent pas changer avec l'irradiation mais la largeur des pics diminue. De plus, la quantité de copolymère analysée baisse progressivement. A 400 Gy, on voit l'apparition d'un pic à 2600 g/mol que l'on retrouve à 4000 Gy mais avec une intensité plus faible. A cette dose, une nouvelle masse apparaît à 130 g/mol. Comme précédemment, la diminution de la quantité de copolymère est liée à la formation d'hydrogel.

L'apparition du pic à 2600 g/mol est de l'ordre de grandeur de la valeur attendue pour une coupure du PMAAtBu à cette dose mais la masse du pic principal n'est pas affectée (la légère différence de valeur en fonction de l'irradiation n'est pas significative et est liée à la différence de polymolécularité), ce qui suggère que la partie PEG correspondant à ce pic est prise dans le gel. Cette apparition de nouveaux pics montre qu'il y a des coupures de chaînes sur des sites privilégiés du copolymère. En absence d'oxygène, les scissions de chaînes sont favorisées à plus faibles doses.

Sur le Tableau III.4, en comparant le taux de gel aux différentes doses avec et sans oxygène, on observe que sans O_2 , celui-ci reste identique à 40 et 400 Gy, mais augmente légèrement à 4000 Gy. Il passe de 50 % avec oxygène à 62 % sans. Le taux de gel mesuré est aussi important qu'une solution équivalente 60 fois plus concentrée⁴.

Dose (Gy)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	I_p	Taux de gel (%)
0	16300	20200	1,2	-
40	16600	20200	1,2	5
400	17200 et 2600	20500	1,2 et 1,0	10
4000	18000, 3000 (faible) et 130	20000, 3200 et 130	1,1 ; 1,1 et 1,0	62

Tableau III.4 : M_n , M_w , I_p et taux de gel du copolymère PEG-*b*-PMA α Bu après irradiation en milieu désoxygéné

Afin d'identifier des modifications chimiques de la fraction des polymères solubles, une analyse RMN ^1H a été menée sur les micelles irradiées séparées du gel.

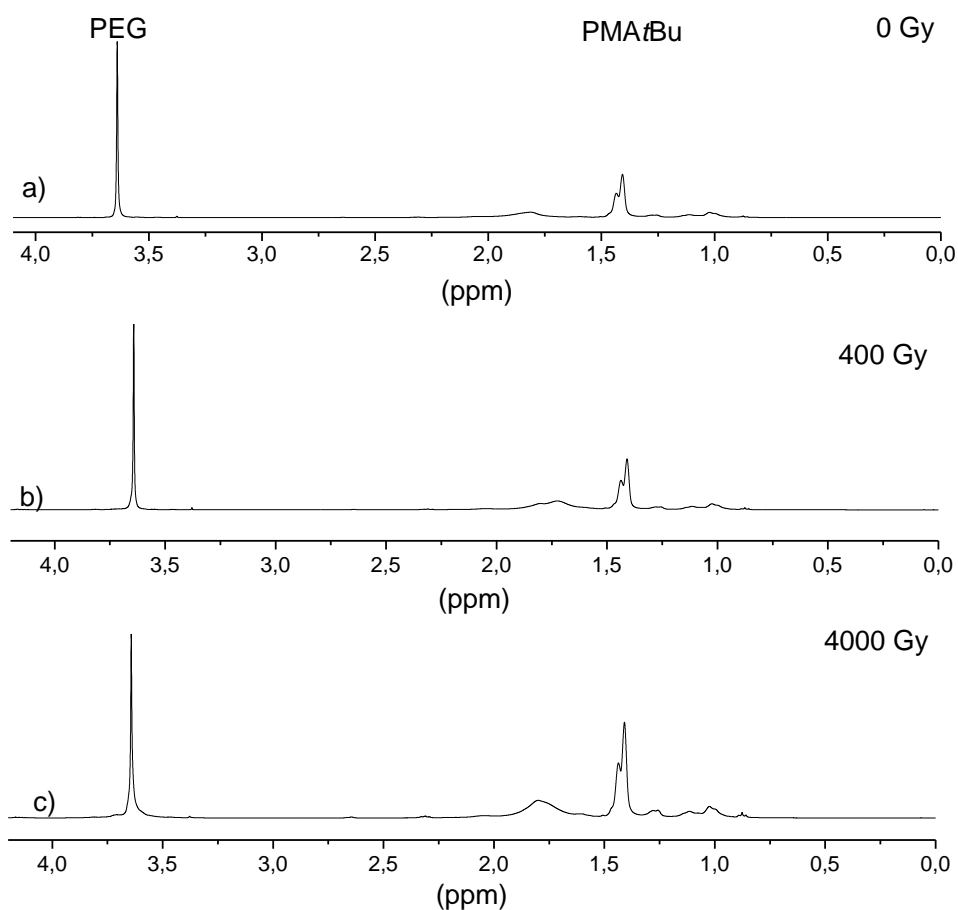


Figure III.11 : Spectres RMN ^1H dans le CDCl_3 des copolymères PEG-*b*-PMA α Bu après irradiation en milieu désoxygéné

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

Le ratio du pic des méthyles du *tert*-butyle du PMA*t*Bu sur le pic des groupements CH₂ du PEG augmente mais de façon moindre après irradiation sans oxygène. Ici, l'irradiation ne semble pas avoir d'impact sur la partie PEG du copolymère soluble pour les doses étudiées, ce qui confirme un effet d'oxydation dans le cas avec oxygène.

Comme précédemment, des études en diffusion ont été conduites pour connaître l'effet de l'irradiation sur la taille et la forme des nano-objets.

III.1.2.2 Etude par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Sous atmosphère inerte, il n'y a aucun changement jusqu'à 4000 Gy.

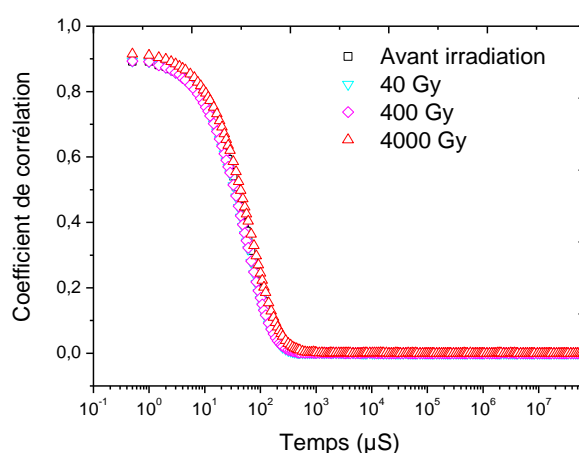


Figure III.12 : Fonctions de corrélation des micelles PEG-*b*-PMA*t*Bu après irradiation en milieu désoxygéné

Les valeurs de taille de micelles obtenues par la méthode des cumulants confirment ces observations.

Dose (Gy)	D (nm)	Polydispersité
0 Gy	42	0,17
40 Gy	41	0,09
400 Gy	41	0,13
4000 Gy	41	0,15

Tableau III.5 : Tailles et polydispersités des micelles PEG-*b*-PMA*t*Bu après irradiation en milieu désoxygéné

III.1.2.3 Etude par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)

Les solutions de micelles irradiées dans le D₂O sous atmosphère inerte sont filtrées puis analysées en DNPA. Le signal de l'intensité diffusée pour des solutions irradiées à 4000 Gy

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles sans oxygène, représenté sur la Figure III.13, se superpose au signal avant irradiation. Il ne semble pas y avoir de changement sous atmosphère inerte à cette dose.

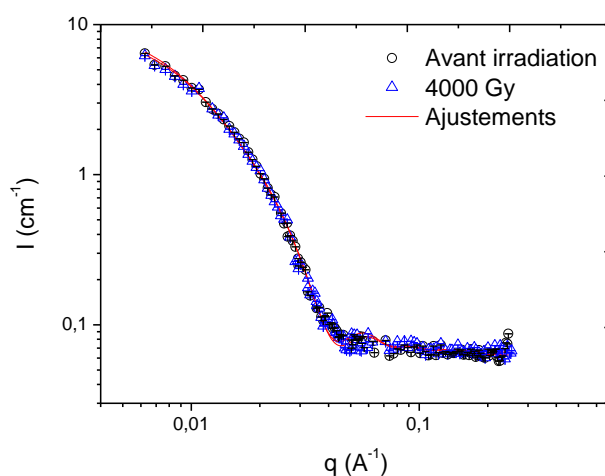


Figure III.13 : Spectres DNPA des micelles PEG-*b*-PMAAtBu après irradiation en milieu désoxygéné et leur courbe d'ajustement

Un ajustement de ces deux courbes par le modèle hairy-sphere indique que les valeurs sont les mêmes avant et après irradiation.

Sous atmosphère inerte, le phénomène de gélification est identique à ceux de la littérature, mais pour des concentrations beaucoup plus faibles. A ces doses d'irradiations, aucun changement structural n'est observé sur le copolymère. En CES, le phénomène de coupure est observé à des doses plus faibles, dès 400 Gy de manière incomplète sur l'ensemble des chaînes. Cependant, ces coupures n'ont pas d'impact sur la structure des objets.

Les micelles PEG-*b*-PMAAtBu présentant moins d'effets au niveau de leur structure sous atmosphère inerte, nous nous sommes focalisés sur ce système pour améliorer l'effet de l'irradiation. Le chargement des micelles avec des molécules radiosensibilisantes a ainsi été étudié.

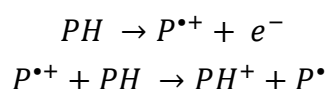
III.1.3 Perspectives : tests de chargement

Des tests de chargement dans les micelles ont été faits avec différents colorants pour évaluer le relargage (cardiogreen, pyrène, RedNile, rhodamine B). Les molécules utilisées pour les chargements ne doivent pas être trop hydrophiles afin d'éviter des phénomènes de relargage rapide (observé pour la rhodamine B). Une fois chargées, les micelles sont stables plusieurs mois.

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

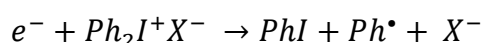
Ces chargements ont également été faits avec un radiosensibilisateur, le diphenyliodonium, afin de rendre le cœur des micelles PEG-*b*-PMA*t*Bu plus sensibles aux rayonnements. Les sels d'onium (diarylionium, triarylsulfonium, dialkylphénacylsulfonium...) sont connus pour être des photo-amorceurs de polymérisations cationiques⁶ mais également pour être des générateurs d'acide⁷ dans des résines dites chimiquement amplifiées. Un mécanisme de réactions sous rayonnement de ces générateurs d'acides a été proposé⁸. Le principal chemin de réaction est l'ionisation du polymère. L'excitation directe du générateur d'acide est considérée moins importante.

(III-1)



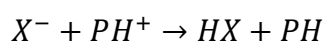
En présence des sels, les électrons issus de l'irradiation réduisent les sels d'onium qui se décomposent :

(III-2)



Enfin, les anions dissociés des sels d'onium se recombinent lentement avec le polymère protoné, du fait de la faible mobilité des anions, et des acides forts sont générés en plus de radicaux alkyles.

(III-3)



Les micelles ont été chargées avec un taux en DPI de 30% en poids par une technique de nanoprecipitation. Une mesure en DLS indique que la taille des micelles reste inchangée suite au chargement. Afin de vérifier qu'il y ait bien du DPI dans les solutions, un spectre FTIR a été mesuré. Sur ce spectre FTIR, on retrouve les pics caractéristiques du copolymère avec en plus, des pics correspondants à des groupements aromatiques (onium).

La Figure III.14 représente les fonctions de corrélations des micelles chargées en DPI sous l'effet de l'irradiation sans oxygène. On observe une diminution de la taille des micelles suite à l'irradiation avec un décalage du corrélogramme vers des temps de relaxation plus petits sans perdre en qualité de signal. Ici, les micelles ont diminué en taille. Le DPI étant chargé au cœur de la micelle, il est plus proche de la partie PMA*t*Bu que de celle du PEG. La diminution de la taille de la micelle pourrait être due à une dégradation du PMA*t*Bu.

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

modifications chimiques relativement limitées sur la structure du copolymère entraînent des changements importants sur la structure des objets à partir d'une dose seuil (4000 Gy). Le chargement des micelles PEG-*b*-PMA_tBu avec une molécule radiosensibilisante montre que sous atmosphère inerte, il est possible de voir des diminutions de la taille des objets après irradiation. Le chargement de la micelle peut clairement en moduler le comportement sous rayonnement. Une question liée est de savoir si le chargement est sensibilisé ou stabilisé vis-à-vis du rayonnement à l'intérieur des micelles.

La seconde partie du chapitre est consacrée à l'étude du comportement sous irradiation de nanoparticules PEG-*b*-polysulfone dont le cœur est plus radiosensible.

III.2 Irradiation des nanoparticules PEG-*b*-polysulfone

Les solutions de nanoparticules PEG-*b*-PSu ont été étudiées sous irradiation avec l'influence de l'oxygène. Un hydrogel est formé suite à l'irradiation. Pour toutes les analyses qui suivent, on cherchera à le séparer des micelles solubles comme précédemment (voir Figure III.1).

III.2.1 Irradiation en milieu oxygéné

III.2.1.1 Etude par chromatographie et spectroscopie

Pour déterminer l'effet de l'irradiation sur la masse molaire des copolymères, une analyse par CES a été menée sur chaque échantillon irradié. Après irradiation de la solution de nanoparticules, celle-ci est séchée puis ressolubilisée dans un mélange DMSO/THF. Dans le chapitre II, nous avons vu que la solubilité du copolymère PEG-*b*-PSu conduisait à des valeurs aberrantes en CES et qu'il était préférable de se rapporter à la masse du copolymère avec le polythioether avant oxydation (voir chapitre II). Les masses présentées ont été réajustées en fonction de cette différence.

La Figure III.16 montre les chromatogrammes du copolymère avant irradiation, à 40 Gy, à 400 Gy et à 4000 Gy. Les M_n des copolymères irradiés sont décalées vers les plus petites masses et la quantité analysée diminue également de manière progressive. De nouveau, une partie du copolymère subit une gélification entraînant une diminution de la quantité de copolymère analysé par CES. Jusqu'à 400 Gy d'irradiation, le changement de M_n n'est pas important alors qu'à 4000 Gy, la masse est vraiment différente avec un indice de polymolécularité plus faible.

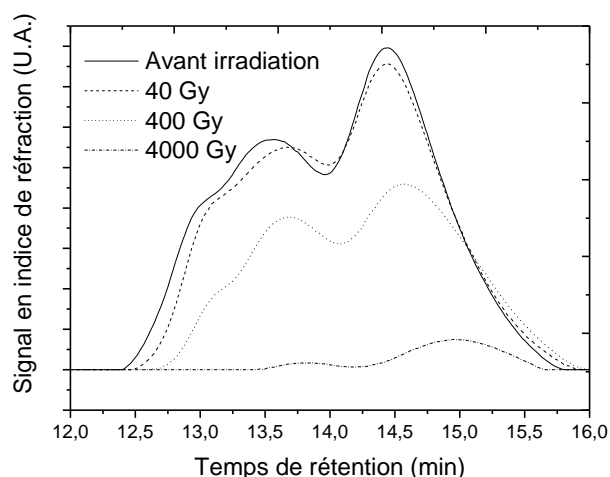


Figure III.16 : Chromatogrammes du copolymère PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu oxygéné

Le Tableau III.6 résume les différentes valeurs de M_n , M_w , I_p et taux de gel.

Dose (Gy)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	I_p	Taux de gel (%)
0	8700	10900	1,2	-
40	8400	10400	1,2	5
400	8400	10300	1,2	42
4000	5300	5800	1,1	90

Tableau III.6 : M_n , M_w , I_p et taux de gel du copolymère PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu oxygéné

On se retrouve ici dans la même situation que précédemment, avec la solubilité partielle du copolymère après irradiation. Les taux de gel indiquent qu'il y a une gélification progressive du copolymère avec la dose d'irradiation, allant même jusqu'à 90 % à 4000 Gy. A des doses équivalentes, le taux de gel est plus important pour les nanoparticules PEG-*b*-PSu que pour les micelles PEG-*b*-PMA*t*Bu. Cette observation semble indiquer que la gélification n'est pas seulement due à la partie PEG.

Les polysulfones aliphatiques sont connus pour subir de fortes dégradations après exposition à des rayonnements ionisants à l'état solide⁹. Le mécanisme de dégradation est représenté sur la Figure III.17.

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

Cela semble difficile du point de vue du dépôt d'énergie puisque cela correspondrait à 300 ionisations pour 100 eV. Dans la littérature¹³, pour le poly(hexène-1-sulfone) à l'état solide sous air, le rendement est de $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$, ce qui suggère 10 eV par événement d'ionisation, une valeur faible, mais possible pour un matériau à faible énergie de bande interdite.¹

Deux explications peuvent être proposées à ces rendements très importants :

-la gélification enrichit la fraction soluble en copolymères coupés. Si tous les copolymères coupés restent en solution, la gélification de 90% du copolymère initial peut augmenter d'un facteur 10 le rendement apparent. Cependant, on obtient ainsi un rendement minimum de $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$, toujours physiquement impossible.

-Il y a une source supplémentaire d'événements radiolytiques. On peut penser à des transferts d'énergie ou de radicaux depuis la couronne de la micelle vers son cœur, suivant des mécanismes qui restent à préciser.

Le taux de gel obtenu à 4000 Gy est de 90 % pour une concentration en PEG de 0,18 g/L ($C_{\text{PEG-}b\text{-PSu}} = 0,45 \text{ g/L}$). Ce taux est bien plus important que celui estimé par Güven⁴ pour une concentration en PEG à 6 g/L à 4000 Gy qui est de 62 %. Ce comportement semble indiquer qu'il y a un effet de la structure avec la présence du PSu.

Des analyses spectroscopiques ont également été faites directement dans le chloroforme deutéré à cause de l'insolubilité du copolymère dans le THF. Seule la partie soluble (sans le gel) est analysée. Le spectre RMN ¹H des nanoparticules avant irradiation, représenté sur la Figure III.18.a, n'a pas la même allure que celui du copolymère. En effet pour le copolymère initial, le pic du signal du PEG à 3,6 ppm est au même endroit que le signal d'un groupement CH₂ du groupement sulfone (voir Figure II.29 dans le chapitre II). Après auto-assemblage, il semblerait que les environnements chimiques des protons de la partie sulfone aient changé car un seul pic avec une forte intégration à 1,9 ppm correspondrait à cette partie.

Sur la Figure III.18, les différents spectres après irradiation sont représentés. A 400 Gy et 4000 Gy, le pic de la partie sulfone est moins déblindé à 1,6 ppm. A 20000 Gy, on voit nettement la chute du pic correspondant au bloc PEG. Le pic correspondant à la partie sulfone est toujours moins déblindé qu'avant irradiation. On observe le même phénomène qu'avec les micelles PEG-*b*-PMA*t*Bu sous irradiation en environnement oxygéné. Le décalage

¹ On considère classiquement qu'une ionisation requière trois fois l'énergie de la bande interdite

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

du pic vers un environnement moins déblindé pourrait suggérer une réduction totale de la sulfone. Cependant, les déplacements des protons proches des sulfones sont très sensibles à l'environnement¹⁴, et on pourrait observer simplement ici une modification conformationnelle de la micelle.

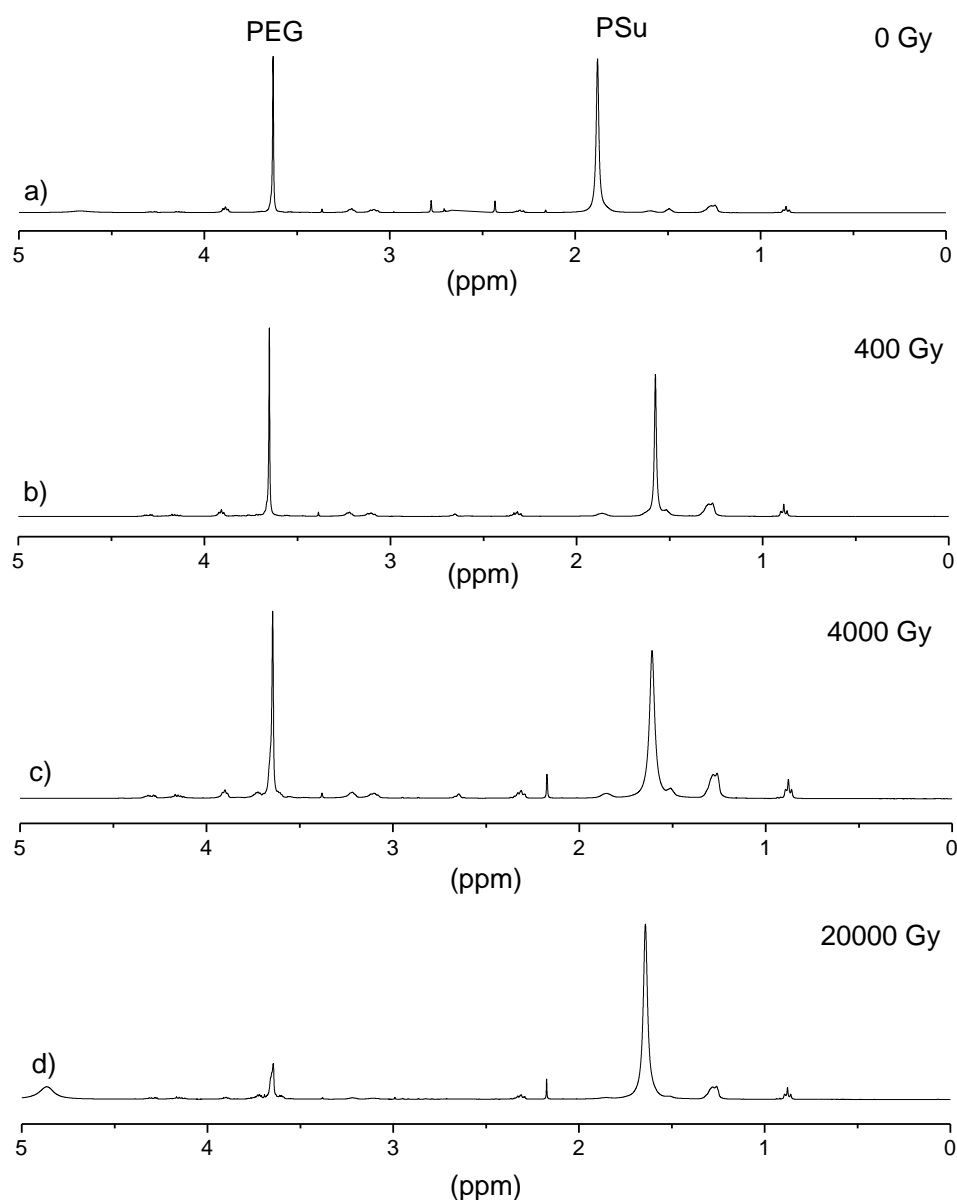


Figure III.18 : Spectres RMN ¹H dans le CDCl₃ des copolymères PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu oxygéné

L'analyse FTIR des nanoparticules après irradiation a perdu en résolution comparée au spectre avant irradiation. Néanmoins, l'apparition de pics à 1650 cm⁻¹ et 1015 cm⁻¹ est notable. Le pic à 1650 cm⁻¹ est sûrement dû à l'oxydation du PEG qui s'accompagne de formation de liaisons carboxylates en bouts de chaînes tandis que le pic à 1015 cm⁻¹ peut

être rapproché des sulfoxides et suggère un changement dans la structure du PSu suite à l'irradiation en plus des coupures. La présence de sulfoxides serait cohérente avec le déplacement des protons de 1,9 ppm à 1,6 ppm, mais reste difficile à expliquer lors d'une irradiation en milieu oxygéné.

La structure des objets après irradiation a été suivie par des analyses de diffusion de lumière et neutron.

III.2.1.2 Etude par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

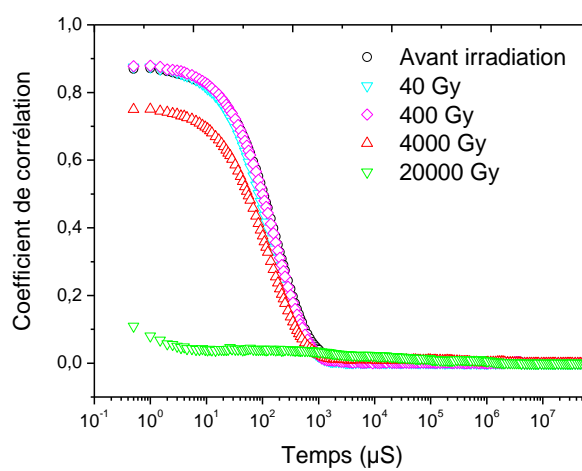


Figure III.19 : Fonctions de corrélation des nanoparticules PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu oxygéné

Les corrélogrammes des différentes solutions irradiées sont présentés dans la Figure III.19. On observe un changement dans les corrélogrammes à partir de 4000 Gy. Bien qu'à cette dose, le corrélogramme perd un peu en qualité de signal, c'est à 20000 Gy, qu'il y a une grande diminution du nombre d'objets diffusants en solution. Les valeurs des tailles des objets déterminées par la méthode des cumulants sont regroupées dans le Tableau III.7.

Dose (Gy)	DLS (nm)	Polydispersité
0	112	0,42
40	102	0,37
400	118	0,34
4000	91	0,40
20000	N.D.	N.D.

Tableau III.7 : Tailles et polydispersités des nanoparticules PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu oxygéné

Une légère diminution de la taille des nanoparticules est observée à 4000 Gy mais elle n'est pas significative. La taille des objets à 20000 Gy n'a pas pu être déterminée en raison du trop faible nombre d'objets diffusants en solution.

III.2.1.3 Etude par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)

La Figure III.20 montre l'évolution des spectres DNPA des nanoparticules PEG-*b*-PSu (précipitées dans du D₂O) avec l'irradiation. Les signaux d'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion pour les nanoparticules avant irradiation, irradiées à 40 Gy, 400 Gy et à 4000 Gy, ont le même comportement, confirmant les observations de la DLS. La courbe de l'intensité pour les nanoparticules irradiées à 20000 Gy présente un comportement différent avec une remontée vers des plus petits vecteurs de diffusion q indiquant une augmentation de la taille des micelles et/ou une agrégation.

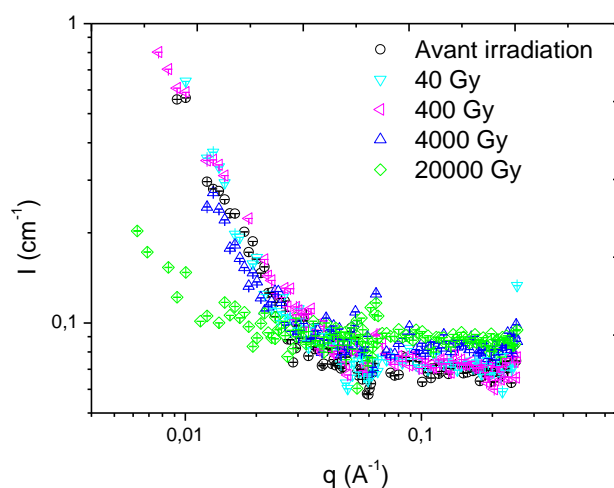


Figure III.20 : Spectres DNPA des nanoparticules PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu oxygéné

Pour évaluer la taille des nanoparticules après irradiation à 20000 Gy, un cliché de TEM a été pris après coloration négative de la grille de microscopie (cf. Figure III.21). Après irradiation, la taille des nanoparticules mesurée en microscopie est de 110 nm en moyenne. Cette technique permet de voir qu'il y a conservation de la structure mais suggère que l'augmentation de la taille observée en DNPA correspond peut être à l'association de plusieurs nanoparticules.

L'irradiation des nanoparticules PEG-*b*-PSu en milieu oxygéné conduit à la formation d'un gel de PEG insoluble dont le rendement est important comparé aux données de la littérature. Bien qu'en CES, on observe un nombre total de coupures important à 4000 Gy et qu'en RMN ¹H, des modifications apparaissent dès 400 Gy, aucun changement n'est observé sur la

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles structure des objets. C'est seulement lorsque les nanoparticules subissent une oxydation du PEG à 20000 Gy que leurs structures changent. En TEM, on voit que l'augmentation de taille observée par diffusion peut-être due à une association des NPs (la structure initiale reste la même). De nouveau, ce sont de fins changements chimiques au niveau de la structure du polymère qui entraînent des changements dans l'assemblage des objets.

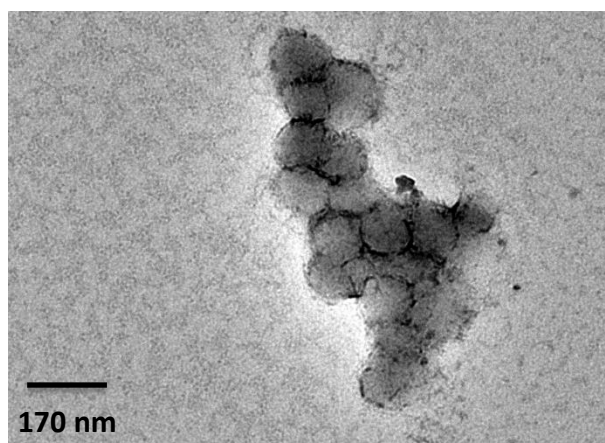


Figure III.21 : Image TEM par coloration négative des nanoparticules PEG-*b*-PSu après irradiation à 20000 Gy en milieu oxygéné

III.2.2 Irradiation en milieu désoxygéné

III.2.2.1 Etude par chromatographie et spectroscopie

Les irradiations ont ensuite été faites sous atmosphère inerte. La Figure III.22 représente les chromatogrammes des nanoparticules PEG-*b*-PSu après irradiation. Avec l'irradiation, les M_n changent peu par rapport à la valeur avant irradiation. On voit également ici, une diminution de la quantité de copolymère avec l'augmentation de la dose d'irradiation.

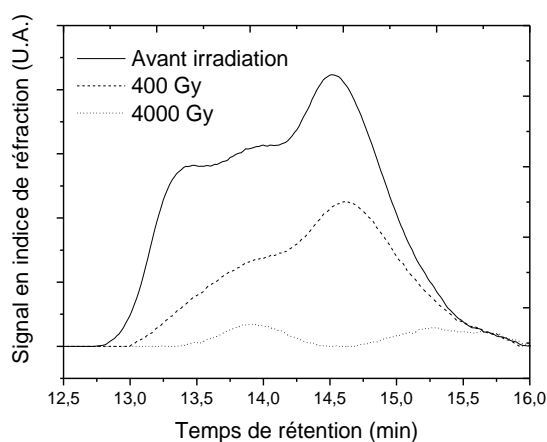


Figure III.22 : Chromatogrammes du copolymère PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu désoxygéné

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

Le Tableau III.8 indique qu'avec l'irradiation, les M_n diminuent et que l'indice de polymolécularité augmente.

Dose (Gy)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	I_p	Taux de gel (%)
0	8700	10300	1,2	-
400	7800	9000	1,2	47
4000	7000	8800	1,3	93

Tableau III.8 : M_n , M_w , I_p et taux de gel du copolymère PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu désoxygéné

La quantité d'hydrogel formée à 400 Gy et 4000 Gy est la même que précédemment. De même, l'absence d'oxygène ne semble pas avoir d'effet sur les scissions de chaînes où on voit que la diminution des M_n n'est pas plus importante.

On calcule le nombre de coupures par chaînes à chaque dose d'irradiation. Il est de 0,15 coupures par chaînes à 400 Gy contre 0,25 à 4000 Gy. Le rendement de scission moyen est de $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$, toujours très important.

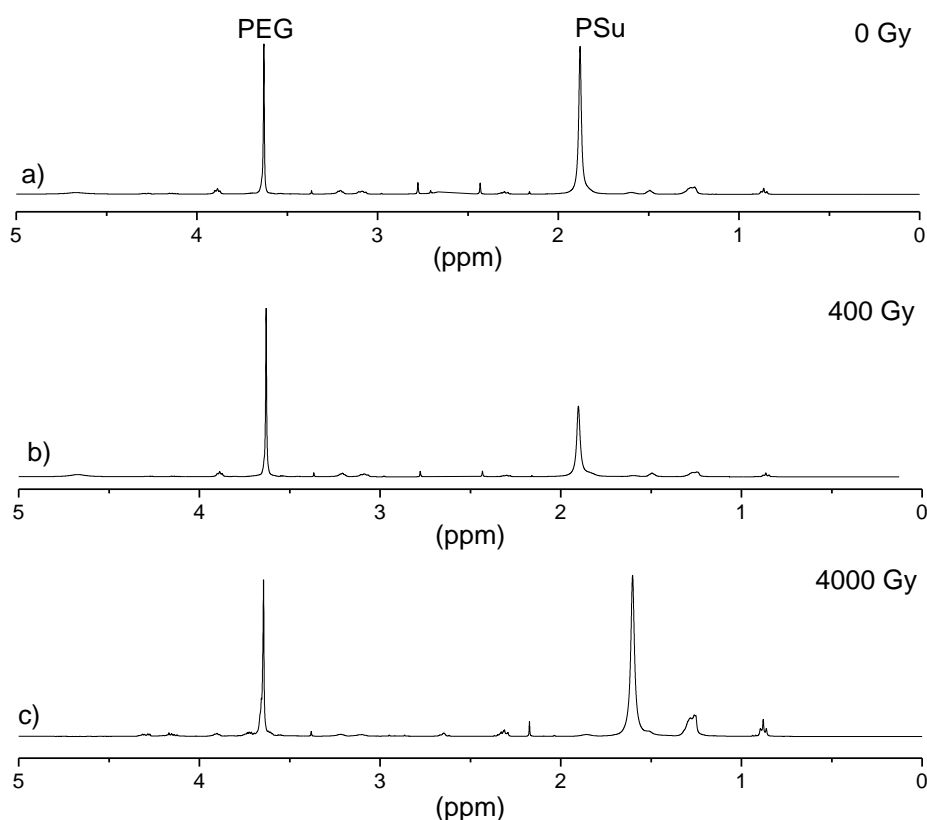


Figure III.23 : Spectres RMN ¹H dans le CDCl₃ des copolymères PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu désoxygéné

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

Comme précédemment, une analyse en RMN ^1H a été conduite. Deux observations importantes sont faites. Le pic de la partie sulfone a une intensité plus faible que celui de la partie PEG à 400 Gy puis à 4000 Gy, les deux pics ont la même intensité. Dans le même temps, le pic de la partie sulfone est décalé vers des déplacements chimiques plus faibles. On peut proposer que c'est le PSu qui réagit en premier avec des scissions dès 400 Gy et qu'ensuite cette partie subit des réductions de la partie sulfone en sulfoxide. Sous atmosphère inerte, la partie PEG ne semble pas subir d'effet sur sa structure.

III.2.2.2 Etude par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La Figure III.24 montre les fonctions de corrélations des nanoparticules PEG-*b*-PSu irradiées sous atmosphère inerte. On voit que la courbe correspondant à l'irradiation à 4000 Gy décroît indiquant que le nombre d'objets diffusants a diminué avec l'irradiation. On observe d'ailleurs une précipitation à cette dose. Il est difficile d'estimer le changement de taille avec cette courbe dont on ne voit pas le plateau.

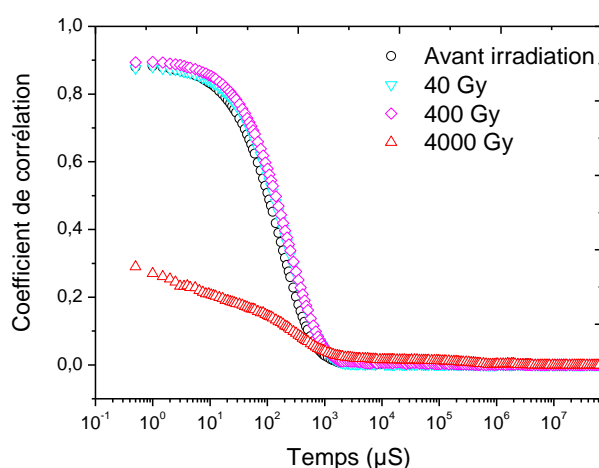


Figure III.24 : Fonctions de corrélation des nanoparticules PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu désoxygéné

La méthode des cumulants indique qu'à 4000 Gy, il y a une augmentation de la taille. Les autres nanoparticules irradiées à moins de 4000 Gy présentent des tailles autour de 100 nm, elles n'ont pas subi de changement avec l'irradiation.

Dose (Gy)	DLS (nm)	Polydispersité
0	115	0,44
40	97	0,40
400	101	0,44
4000	214	0,35

Tableau III.9 : Tailles et polydispersités des nanoparticules PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu désoxygéné

III.2.2.3 Etude par diffusion de neutron aux petits angles (DNPA)

Lorsque les irradiations sont conduites sans oxygène, le signal des nanoparticules irradiées à 4000 Gy en DNPA est légèrement décalé vers les petits q indiquant une taille des nanoparticules plus grande.

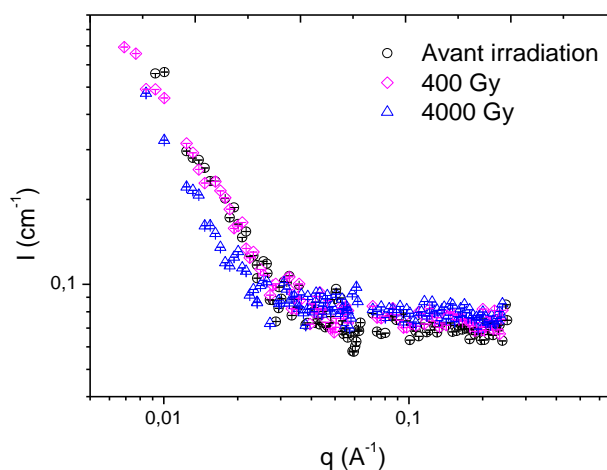


Figure III.25 : Spectres DNPA des nanoparticules PEG-*b*-PSu après irradiation en milieu désoxygéné

Sous atmosphère inerte, les phénomènes de coupure et de gélification sont comparables à ceux observés avec oxygène. Contrairement à ce qui est observé sous air, la partie PSu subit des coupures dès 400 Gy sans être réduite. L'augmentation de la taille des objets est observée à une dose de 4000 Gy (plus faible qu'avec O₂), cela est dû à la radiosensibilité plus importante de la partie polysulfone.

III.2.3 Conclusion

Le comportement des nanoparticules PEG-*b*-PSu est résumé en Figure III.26. En CES, pour les deux atmosphères, le phénomène prédominant est la gélification probablement liée à la partie PEG.

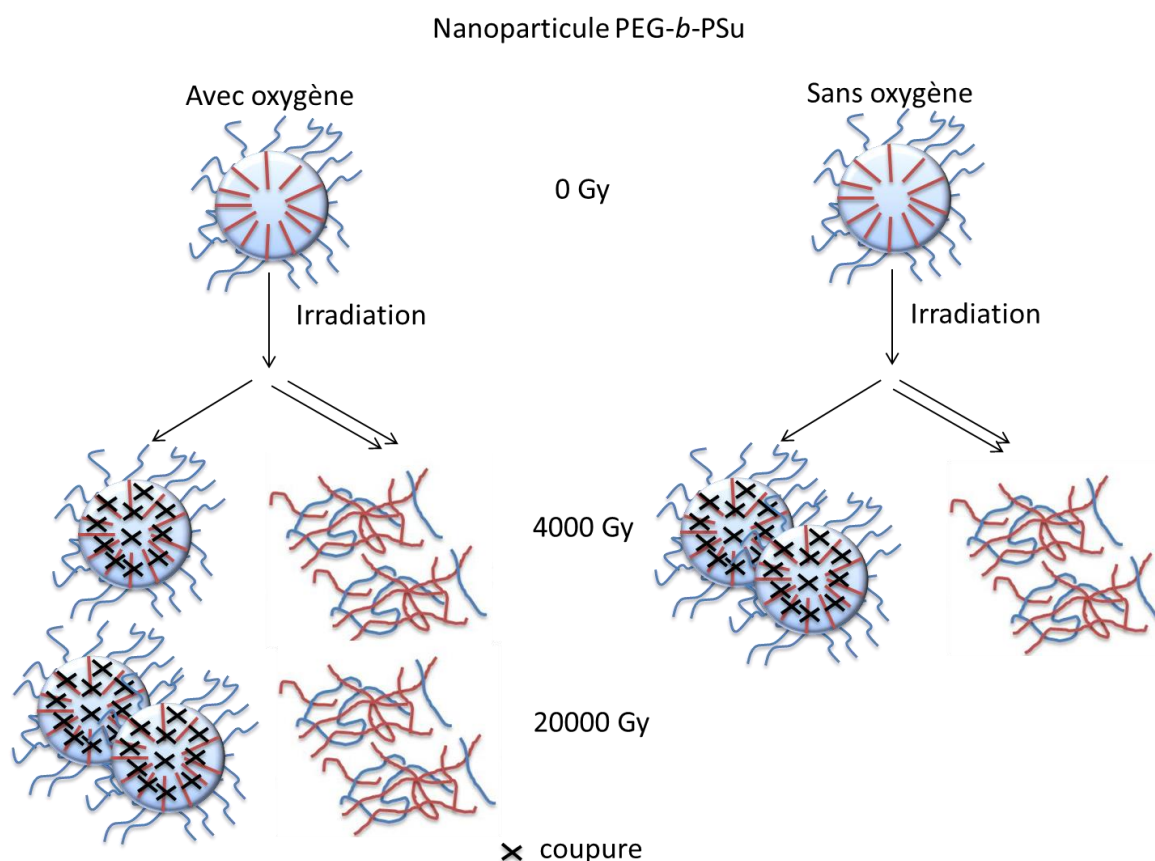


Figure III.26 : Effets de l'irradiation sur les nanoparticules PEG-*b*-PSu

Cependant, d'importants phénomènes de coupures sont aussi observés au niveau du polysulfone qui est clairement plus sensible que le PMA*t*Bu. On peut noter aussi que la baisse de la taille des polymères observée en CES n'entraîne pas une diminution de la taille des nano-objets, bien au contraire. Sous oxygène, les objets grossissent à partir de 4000 Gy alors que sous atmosphère inerte, le phénomène se produit à une dose plus faible (400 Gy). On peut donc suggérer que celui-ci est lié à des recombinaisons de radicaux favorisées sous atmosphère inerte.

Les augmentations de tailles observées en diffusion semblent être des associations de NPs. Cette association est certainement liée au phénomène de gélification important observé avec ces nano-objets sous irradiation.

III.3 Tests de cytotoxicité *in vitro*

L'influence de l'irradiation des micelles/nanoparticules sur la toxicité des cellules L929 a été évaluée.

La toxicité des micelles PEG-*b*-PMA_tBu irradiées à 4000 Gy sous atmosphère oxydante a été mesurée à différentes concentrations (0 à 100 µg/mL) et est représentée sur la Figure III.27. Après irradiation, le pourcentage de cellules viables est plus important allant même jusqu'à être au-dessus du seuil de toxicité. Cette toxicité plus faible peut être attribuée à la diminution de la fraction soluble de nanoparticules.

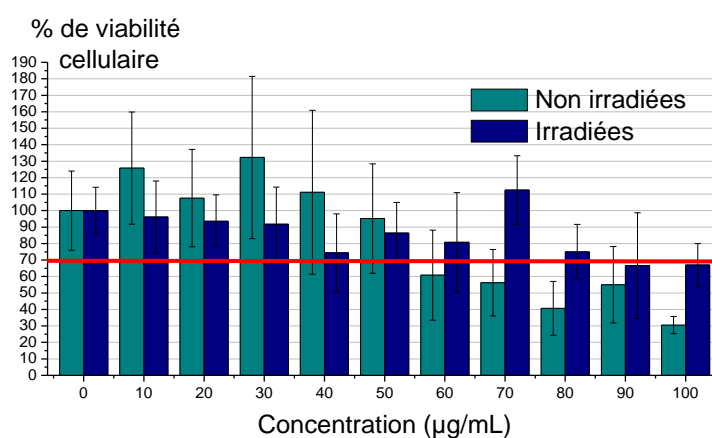


Figure III.27 : Viabilité des cellules (en %) en fonction de la concentration de micelles PEG-*b*-PMA_tBu non irradiées et irradiées à 4000 Gy (test MTT)

La Figure III.28 représente le pourcentage de viabilité cellulaire dans le cas des nanoparticules PEG-*b*-PSu irradiées à 4000 Gy.

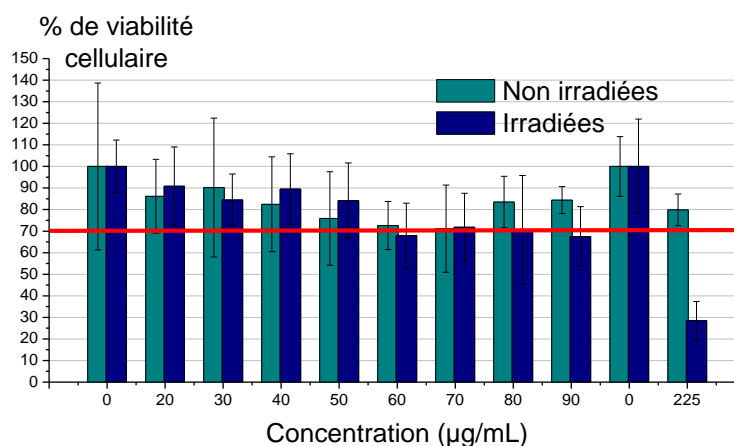


Figure III.28 : Viabilité des cellules (en %) en fonction de la concentration de nanoparticules PEG-*b*-PSu non irradiées et irradiées à 4000 Gy (test MTT)

Chapitre III : Irradiation de micelles/nanoparticules de copolymères amphiphiles

Jusqu'à 90 µg/mL, les nano-objets sont aussi peu toxiques avant qu'après irradiation. Par contre, à 225 µg/mL, la toxicité des nanoparticules envers les cellules est plus importante passant de 20 % avant irradiation, à 70 % après irradiation. Un des produits de dégradation issus de l'irradiation des nanoparticules est toxique à concentration importante. Nous pouvons penser en particulier à la formation de SO₂ ou de sulfoxyde.

III.4 Comportement des micelles/nanoparticules sous irradiation

L'effet de l'irradiation sur deux types de copolymères amphiphiles a été étudié dans ce chapitre. Les micelles PEG-*b*-poly(méthacrylate de *tert*-butyle) (PEG-*b*-PMA*t*Bu) ne sont pas dégradées au niveau du cœur du PMA*t*Bu mais plutôt sur la partie couronne avec une gélification. A partir d'une dose seuil, la taille des micelles augmente de façon très importante en présence d'oxygène. Ce changement est lié à des changements structuraux fins au niveau du polymère (oxydation du PEG).

Avec des nanoparticules plus radiosensibles, mais également plus grosses, à base de PEG-*b*-polysulfone (PEG-*b*-PSu), le PEG se gélifie mais avec des rendements beaucoup plus importants. Des phénomènes de coupure très efficaces sont également observés. C'est la partie PSu plus radiosensible que le PMA*t*Bu qui se dégrade, mais les processus en jeu restent à caractériser.

La cytotoxicité des micelles/nanoparticules après irradiation a légèrement changé. Dans le cas des micelles PEG-*b*-PMA*t*Bu, une diminution de la toxicité est observée mais pour les nanoparticules PEG-*b*-PSu, pour des concentrations élevées, la toxicité augmente à cause de la formation de SO₂.

La présence de PEG pose problème intrinsèquement avec la formation d'hydrogel pour des doses d'irradiations faibles (à partir de 4000 Gy). Or, il a été vu dans le chapitre I, que lors de la radiostérilisation ou le « drug delivery », ce sont souvent des micelles avec une couronne de PEG qui sont utilisées. Les doses de radiostérilisation étant supérieures à 20000 Gy, la présence de ce gel peut poser problème pour ce genre d'application. D'autre part, la présence de ce gel nous a empêchés de déterminer des rendements de scission et de réticulation absolus. Il serait intéressant de le remplacer par un autre polymère hydrosoluble et biocompatible. En parallèle, l'utilisation d'un polymère particulièrement radiosensible, le polysulfone, conduit à des phénomènes de coupures plus importants que ceux attendus. Bien que celui-ci soit hydrophobe, l'action indirecte de l'irradiation *via* la diffusion de radicaux issus de la radiolyse de l'eau peut expliquer ces phénomènes importants. Ce dernier point reste à explorer. Enfin, le chargement des micelles PEG-*b*-PMA*t*Bu par des radiosensibilisateurs a montré qu'il était possible de moduler les effets de l'irradiation. Les méthodes utilisées pour radiosensibiliser les polymères peuvent être transposées aux nano-objets.

III.5 Références

1. (a) Kircher, J. F.; Sliemers, F. A.; Markle, R. A.; Gager, W. B.; Leininger, R. I., On the Degradation and Electron Spin Resonance Spectra of Irradiated Methacrylate Polymers¹. *The Journal of Physical Chemistry* **1965**, *69* (1), 189-193; (b) Hiraoka, H., Radiation Chemistry of Poly(methacrylates). *IBM Journal of Research and Development* **1977**, *21* (2), 121-130; (c) Dole, M., *The Radiation Chemistry of Macromolecules*. Elsevier Science: 2013; (d) Ungar, I. S.; Kircher, J. F.; Gager, W. B.; Sliemers, F. A.; Leininger, R. I., Radiolysis of the isomeric poly(butyl methacrylates). *Journal of Polymer Science Part A: General Papers* **1963**, *1* (1), 277-288.
2. Miller, A. A.; Lawton, E. J.; Balwit, J. S., Effect of chemical structure of vinyl polymers on crosslinking and degradation by ionizing radiation. *Journal of Polymer Science* **1954**, *14* (77), 503-504.
3. Jurkin, T.; Pucić, I., Poly(ethylene oxide) irradiated in the solid state, melt and aqueous solution—a DSC and WAXD study. *Radiation Physics and Chemistry* **2012**, *81* (9), 1303-1308.
4. Savaş, H.; Güven, O., Gelation, swelling and water vapor permeability behavior of radiation synthesized poly(ethylene oxide) hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry* **2002**, *64* (1), 35-40.
5. Fishman, A.; Acton, A.; Lee-Ruff, E., A Simple Preparation of PEG-Carboxylates by Direct Oxidation. *Synthetic Communications* **2004**, *34* (12), 2309-2312.
6. Crivello, J. V., Cationic polymerization — Iodonium and sulfonium salt photoinitiators. In *Initiators — Poly-Reactions — Optical Activity*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1984**; pp 1-48.
7. Nagahara, S.; Kozawa, T.; Yamamoto, Y.; Tagawa, S., Radiation Chemistry of Triphenylsulfonium Salts in EB and X-Ray Chemically Amplified Resists Proton Generation Mechanisms. *Journal of Photopolymer Science and Technology* **1998**, *11* (4), 577-580.
8. Takahiro, K.; Yoichi, Y.; Mitsuru, U.; Seiichi, T., Radiation-Induced Acid Generation Reactions in Chemically Amplified Resists for Electron Beam and X-Ray Lithography. *Japanese Journal of Applied Physics* **1992**, *31* (12S), 4301.
9. Hill, D. J. T.; Whittaker, A. K., Radiation Chemistry of Polymers. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.: **2002**.
10. Ayscough, P. B.; Ivin, K. J.; O'Donnell, J. H., Electron spin resonance spectra of [gamma]-irradiated sulphones and polysulphones. *Transactions of the Faraday Society* **1965**, *61* (0), 1110-1117.
11. Brown, J. R.; O'Donnell, J. H., The Degradation of Poly(butene-1 sulfone) during γ Irradiation. *Macromolecules* **1970**, *3* (2), 265-267.
12. Reed, C. E.; Reed, W. F., Light scattering power of randomly cut random coils with application to the determination of depolymerization rates. *The Journal of Chemical Physics* **1989**, *91* (11), 7193-7199.
13. Brown, J. R.; O'Donnell, J. H., γ Radiolysis of Poly(butene-1 sulfone) and Poly(hexane-1 sulfone). *Macromolecules* **1972**, *5* (2), 109-114.
14. Abraham, R. J.; Mobli, M., *Modelling 1H NMR Spectra of Organic Compounds: Theory, Applications and NMR Prediction Software*. Wiley: **2008**.

CHAPITRE IV

IV. Chapitre 4 : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

Contenu

IV. Chapitre 4 : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères.....	127
IV.1 Nanoparticules greffées de polymères	128
IV.1.1 Définition/ Avantage	128
IV.1.2 Méthodes de greffage	129
IV.2 Synthèse des nano-objets hybrides.....	133
IV.2.1 Synthèse des ligands polymères	133
IV.2.2 Synthèse des nanoparticules d'or greffées de polymères.....	143
IV.2.3 Tests de greffage d'un principe actif sur les nano-objets	145
IV.3 Caractérisation des nano-objets hybrides.....	149
IV.3.1 Caractérisation de la couronne polymère.....	150
IV.3.2 Caractérisation du cœur métallique	155
IV.3.3 Caractérisation des nano-objets hybrides par diffusion de neutron aux petits angles (DNPA).....	161
IV.4 Tests de cytotoxicité <i>in vitro</i>	166
IV.5 Conclusion	172
IV.6 Références	174

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

Ce quatrième chapitre est consacré à la synthèse de nanoparticules d'or greffées de polymères. Dans une première partie, une étude bibliographique sur ces systèmes sera présentée : les stratégies pour les synthétiser ainsi que les différents exemples présents dans la littérature. Ensuite, la préparation de ces nano-objets en deux étapes est décrite ainsi que les tests de greffage de principe actif sur ces objets. Enfin une partie caractérisation, à la fois de la couronne (analyse thermique) et du cœur métallique (microscopie et diffusion de rayons X) est présentée. Les nano-objets ont été également caractérisés dans leur ensemble par la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA). Pour finir, la toxicité des nano-objets obtenus a été testée en milieu cellulaire.

IV.1 Nanoparticules greffées de polymères

IV.1.1 Définition/ Avantage

La synthèse de nano-objets cœur-couronne avec un cœur inorganique et une couronne organique (polymère) a connu un intérêt grandissant depuis une vingtaine d'années. La synergie induite par les propriétés électroniques, optiques et magnétiques des nanoparticules inorganiques et les propriétés physicochimiques des polymères permet de créer des systèmes avec des critères modulables selon les applications recherchées. On retrouve principalement ce type de matériau dans les domaines de l'optoélectronique¹, du médical/pharmaceutique² ou des systèmes catalytiques³. Deux approches principales sont employées pour la préparation de nanoparticules greffées de polymères : la première consiste en la physisorption réversible de chaînes de polymères sur la surface des nanoparticules *via* des interactions faibles de type Van der Waals ou des liaisons hydrogène. La seconde implique l'attachement de chaînes macromoléculaires sur la surface des nanoparticules *via* chimisorption donc par liaison covalente. La liaison covalente des polymères sur la surface courbée des nanoparticules peut être faite soit par une méthode dite « grafting to » soit par une méthode « grafting from ». La méthode « grafting to » consiste à préparer des chaînes de polymères qui seront ensuite greffées sur les nanoparticules en utilisant l'affinité entre le groupement terminal du polymère et les fonctions présentes à la surface des nanoparticules. La méthode dite « grafting from » implique la croissance *in situ* de chaînes polymères à partir de fonctions amorçantes préalablement greffées à la surface des nanoparticules. L'approche par physisorption entraîne des problèmes de stabilité à cause des liaisons faibles qui peuvent facilement se

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères rompre selon l'environnement. Dans notre étude, on va privilégier le greffage covalent des chaînes polymères sur les nanoparticules afin d'avoir des systèmes stables.

D'autre part, on cherchera aussi à contrôler la taille des chaînes polymères greffées pour pouvoir les comparer avant et après irradiation. Il existe de nombreuses techniques de polymérisation contrôlée comme les polymérisations anionique ou cationique vivante ou encore les différentes polymérisations par ouverture de cycle pour n'en citer que quelques-unes. Bien que l'on trouve quelques exemples dans la littérature de polymérisation vivante à la surface des particules⁴, ce sont principalement les polymérisations radicalaires contrôlées (PRC) qui sont utilisées car elles sont faciles à mettre en place (voir chapitre II).

Dans notre cas, c'est une voie « grafting to », un peu particulière, qui sera privilégiée afin de mieux contrôler la taille des chaînes avant le greffage. Nous y reviendrons en détails dans les paragraphes suivants IV.1.2.3.

IV.1.2 Méthodes de greffage

IV.1.2.1 Greffage de chaînes polymères à la surface de nanoparticules d'or

Bien que les méthodes de greffage de polymères aient d'abord été développées sur des surfaces planes⁵, le greffage sur des nanoparticules en solution a connu rapidement une grande avancée⁶. Le greffage de polymères à la surface de nanoparticules a commencé avec des nanoparticules de silice^{6a, 7}. Ces synthèses ont été ainsi appliquées à de nombreuses autres nanoparticules comme les nanoparticules d'oxydes métalliques (TiO_2 ⁸, Fe_3O_4 ⁹, ZnO ¹⁰...), de platine¹¹ ou de quantum dots (CdSe)¹².

Dans notre cas, nous nous sommes particulièrement intéressés aux nanoparticules d'or fonctionnalisées (voir effet radiosensibilisant dans le chapitre I). La partie suivante présente donc différents exemples de la littérature pour greffer des chaînes polymères à la surface de nanoparticules d'or selon les deux approches : « grafting from » et « grafting to ».

IV.1.2.2 Greffage par voie « grafting from »

La technique du « grafting from » permet d'avoir des densités de greffage de polymères élevées à la surface des nanoparticules (moins d'effet d'encombrement stérique que la voie « grafting to »). La polymérisation est réalisée à partir de la surface, qui contient des amorceurs immobilisés en une ou plusieurs étapes, et est limitée seulement par la diffusion des monomères.

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

La synthèse des nanoparticules peut se faire par réaction d'échanges. Nuß¹³ et coll. ont synthétisé dans un premier temps des nanoparticules d'or avec des ligands dodécane-thiol puis les ont échangés avec un amorceur bromé à pont disulfure. La liaison disulfure se rompt puis le thiol de l'amorceur bromé s'échange avec le dodécane-thiol. L'ATRP de l'acrylate de butyle en surface a été menée avec du CuBr et sans amorceur sacrificiel. L'ATG prouve que le greffage est dense à la surface des particules (90 % de polymères).

Bien que cette technique soit efficace, une autre stratégie consiste à utiliser directement un amorceur bromé avec un pont disulfure comme ligand pour la synthèse *in situ* des nanoparticules. Ainsi les nanoparticules amorçantes sont obtenues en une seule étape.

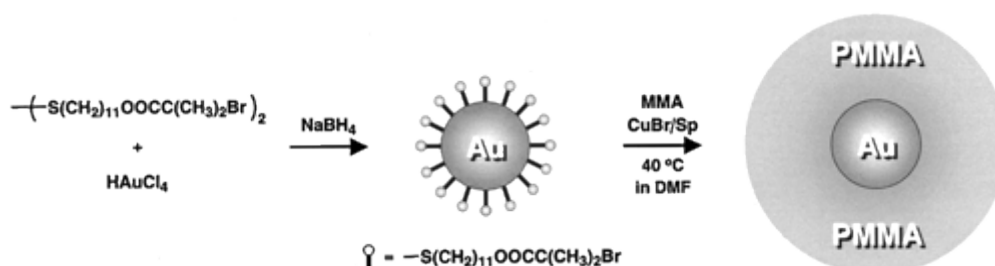


Figure IV.1 : Synthèse de nanoparticules d'or greffées de PMMA par Ohno et coll.¹⁴

De cette manière, l'équipe d'Ohno¹⁴ a synthétisé des brosses de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) sur des nanoparticules d'or en présence d'amorceur libre. Des nanoparticules d'or avec une couronne polymère bien définie et de faible polymolécularité sont obtenues. La densité de greffage est estimée à 0,3 chaînes/nm². Des acrylamides ont également été polymérisés par Roth et coll.¹⁵, l'équipe de Kim¹⁶ ou encore Li et coll.¹⁷ Ces polymérisations sont en général conduites en présence du couple CuBr/PMDETA.

Une autre stratégie consiste à surgreffer les ligands présents sur les nanoparticules avec une molécule bromée. Mandal et coll.¹⁸ ont synthétisé des nanoparticules d'or greffées d'une couche de 11-mercapto-undecanol. Une molécule bromée a ensuite été fonctionnalisée sur cette couche pour permettre la polymérisation du méthacrylate de méthyle sans présence d'amorceur sacrificiel.

La présence d'amorceur sacrificiel lors des polymérisations est dictée par la taille des nanoparticules. En effet, lorsque celles-ci ont une taille supérieure à 10 nm, on peut assimiler leur surface à celle d'une surface plane. De ce fait, pour respecter la proportion amorceur/monomère, il est nécessaire d'ajouter des amorceurs sacrificiels. Au contraire

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères pour des nanoparticules de tailles inférieures à 10 nm dont les surfaces spécifiques sont importantes, il y a plus d'amorceurs donc la proportion amorceur/monomère est respectée.

L'approche « grafting from » sur des nanoparticules d'or pour polymériser des méthacrylates a majoritairement été faite sur des PMMA qui ne sont pas hydrosolubles ni hydrolysables. Cette voie permet un contrôle de la polymérisation (I_p faible) mais elle ne permet pas de connaître de manière précise les masses molaires. C'est pour cela que dans notre étude, nous privilégierons la voie « grafting to ».

IV.1.2.3 Greffage par voie « grafting to »

Cette méthode consiste à greffer de manière covalente des polymères déjà synthétisés dont la masse et la polymolécularité sont connues et généralement contrôlées. Les macromolécules obtenues ont des bouts de chaînes fonctionnalisés par des groupements qui ont une affinité pour la surface des nanoparticules.

Il existe dans la littérature plusieurs stratégies pour obtenir des nanoparticules d'or greffées de polymère par la méthode « grafting to ». Les nanoparticules d'or peuvent être dans un premier temps synthétisées en présence d'un ligand court puis un échange de ligands avec le polymère est réalisé. Une autre méthode consiste à la synthèse *in situ* des nanoparticules en présence d'un sel réducteur et d'un polymère fonctionnalisé thiol qui va agir directement comme ligand.

Lorsque la synthèse des nanoparticules d'or a lieu avant la mise en contact avec le ligand, elles sont obtenues généralement par réaction d'un sel d'or (HAuCl_4) avec du citrate de sodium. Les citrates à la surface des nanoparticules vont ensuite s'échanger sous agitation avec le polymère qui a une fonction terminale thiol. Avec cette stratégie, ce sont des ligands polymères synthétisés par RAFT que l'on retrouve majoritairement. En effet, les polymères issus de cette polymérisation ont des fonctions de type dithioester ou trithiocarbonate qui sont échangeables, directement ou après réduction en thiol, avec les citrates à la surface des nanoparticules. Ainsi, Boyer et coll.¹⁹ ont copolymérisé de l'acrylate d'oligo(oxyde d'éthylène) et de l'acrylate de di(oxyde d'éthylène) éthyl éther. Jones et coll.²⁰ ont greffé des chaînes de PNIPAM (polymère thermosensible) à la surface de nanoparticules d'or pour étudier les propriétés thermiques des nano-objets en solution. A cause des propriétés intéressantes de ce polymère, d'autres équipes comme celles de Zhu²¹ et Yusa²² se sont penchées sur la synthèse de ces nano-objets et les ont étudiés sous différentes conditions thermiques. De nombreux autres polymères ont été greffés à la surface de nanoparticules

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères d'or par cette méthode comme le poly(N,N-diméthylacrylamide) (PDMA)²³ mais également des copolymères comme le POE-*b*-PDMA²⁴ ou le poly[acrylate de poly(oxyde d'éthylène) méthyl éther]-*b*-PNIPAM²⁵.

Pour les nanoparticules synthétisées *in situ*, les ligands polymères greffés à leur surface peuvent être obtenus par RAFT ou ATRP. Ceux issus d'une polymérisation RAFT, subissent une réduction de la fonction trithiocarbonate ou dithioester en même temps que la synthèse *in situ* des nanoparticules ou dans une étape isolée.

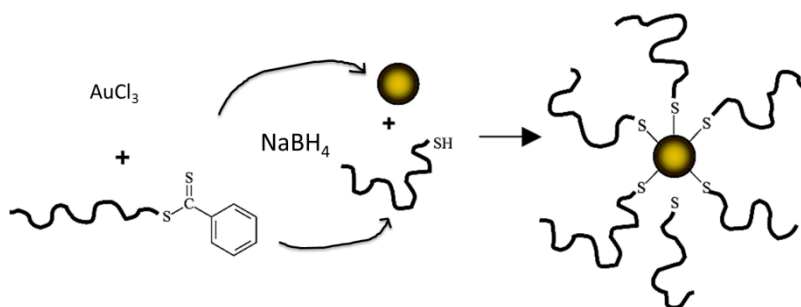


Figure IV.2 : Synthèse de nanoparticules d'or *in situ* par l'équipe de Lowe²⁶

De cette manière, Lowe et coll.²⁶ ont décrit la synthèse de nanoparticules d'or greffées de copolymères hydrosolubles polymérisés dans l'eau. Shan et coll.²⁷ ont polymérisé du NIPAM et du styrène pour obtenir des nanoparticules d'or en présence d'un sel de lithium. Un copolymère amphiphile à base de polystyrène-*b*-poly(oxyde d'éthylène) (PS-*b*-POE) a été synthétisé par RAFT avec une jonction trithiocarbonate qui permet au copolymère d'avoir une forme en V à la surface des nanoparticules d'or lors de sa réduction avec du NaBH₄²⁸. La synthèse du poly[1-méthyl 3-(2-méthacryloyloxy propylimidazolium brome) (PMMPImB) par Li et coll.²⁹ est faite par RAFT, puis le dithioester est réduit en thiol et enfin les nanoparticules sont formées.

Les polymères obtenus par ATRP nécessitent la synthèse préalable d'une molécule amorçante avec un pont disulfure et des fonctions bromées. Bach et coll.³⁰ et aussi l'équipe de Matsuura³¹ ont décrit la synthèse d'un polyméthacrylate par ATRP à partir des fonctions bromées en bouts de chaînes de l'amorceur. Le polymère en présence de sels d'or (HAuCl₄) et de réducteur (NaBH₄) va se greffer *via* la rupture de son pont disulfure à la surface des nanoparticules d'or.

Dans notre étude, nous avons décidé de synthétiser les nanoparticules d'or greffées de polymère à partir de cette dernière méthode « grafting to ». En effet, nous voulons étudier l'effet de l'irradiation à proximité des nanoparticules d'or sur les chaînes polymères greffées.

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

De ce fait, il est important de connaître de manière précise la masse et la polymolécularité des chaînes polymères greffées à la surface des particules pour pouvoir ensuite les comparer à celles obtenues après irradiation.

IV.2 Synthèse des nano-objets hybrides

IV.2.1 Synthèse des ligands polymères

Comme développée précédemment, la synthèse des nanoparticules greffées de polymères se fera par voie « grafting to ». La procédure générale est présentée dans le schéma de la Figure IV.3. Dans une première partie, on s'intéresse à synthétiser le ligand polymère.

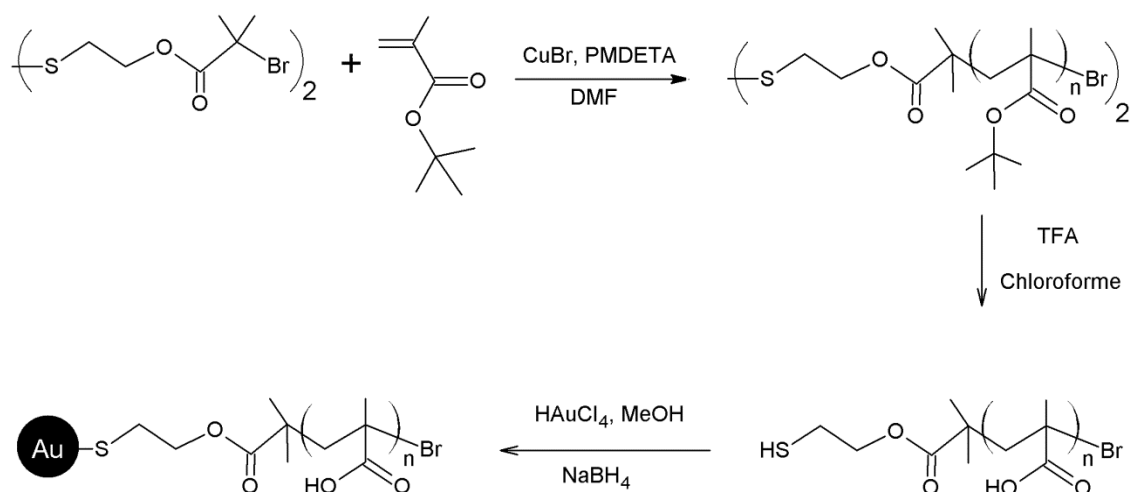


Figure IV.3 : Synthèse des nanoparticules d'or greffées polymères

IV.2.1.1 Synthèse d'un amorceur à pont disulfure et dibromé

Une première étape va consister à synthétiser une molécule comportant à la fois un pont disulfure mais également des fonctions amorçantes pour la polymérisation ATRP. La molécule communément utilisée dans la littérature est le 2,2'-dithioéthanol.³⁰

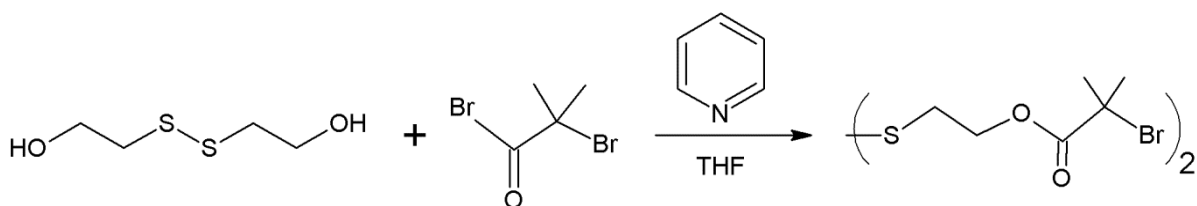


Figure IV.4 : Synthèse de l'amorceur ATRP avec un pont disulfure

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères
C'est une réaction d'estérification entre les fonctions hydroxyles et le bromure d'acyle (bromure de 2-bromo-isobutyryle). Le 2,2'-dithioethanol est dissout dans du THF en présence de pyridine. Après 24 h de réaction, le produit est purifié par filtration, lavé puis séché pour obtenir une huile incolore.

IV.2.1.2 Synthèse des ligands polymères par ATRP

IV.2.1.2.1 Choix des monomères/polymères utilisés

Dans notre étude, les polymères doivent être solubles dans l'eau afin de conduire les études d'irradiation dans ce milieu et permettre une application biologique. Dans un second temps, ils doivent permettre le greffage d'un principe actif. Nous nous sommes donc intéressés à des monomères hydrosolubles ou hydrolysables dont les polymères avaient des propriétés bien connues sous irradiation. Ainsi, le choix des monomères s'est porté sur les méthacrylates. La polymérisation du méthacrylate de *tert*-butyle (MA*t*Bu) par ATRP a largement été décrite dans la littérature³². Le polymère formé peut être facilement hydrolysable afin d'obtenir le poly (acide méthacrylique) (PMAA) dont les fonctions COOH peuvent réagir avec les fonctions présentes sur le principe actif. L'hydrolyse du PMA*t*Bu a également été beaucoup étudiée : il a été montré que cette hydrolyse du groupement *tert*-butyle est totale lors d'une attaque par un acide^{11a} ou lors d'un traitement thermique³³. La polymérisation directe de l'acide méthacrylique ne peut être faite par ATRP car le complexe métallique utilisé va réagir avec le monomère pour former un carboxylate métallique inhibant le rôle de catalyseur du complexe métallique³⁴. Un autre monomère utilisé ici est le méthacrylate d'hydroxyéthyle (HEMA). C'est également un monomère dont la polymérisation par ATRP³⁵ est connue et la présence d'une fonction hydroxyle dans l'unité monomère est aussi un potentiel point d'ancrage pour un greffage ultérieur. De plus, le PHEMA est connu pour son excellente biocompatibilité³⁶ ; on le retrouve donc dans de nombreuses applications médicales.

Nous nous sommes ensuite intéressés à synthétiser des copolymères statistiques avec des compositions variables : poly(MA*t*Bu,HEMA), poly(MAPEG,HEMA) et poly(MAPEG,MA*t*Bu). L'introduction du PEG (polyéthylène glycol) est possible grâce au monomère méthacrylate de PEG-méthyl éther disponible commercialement. Il est intéressant d'utiliser un copolymère contenant du PEG pour moduler la biocompatibilité du système final.

IV.2.1.2.2 Polymérisation des ligands polymères

Les conditions de polymérisations ATRP d'un méthacrylate ont été décrites dans le chapitre II. Cette polymérisation est plus efficace avec un amorceur ester bromé. L'amorceur utilisé a été présenté dans le paragraphe précédent : c'est le 2-bromoisobutyrate disulfure.

Les conditions de polymérisation de chaque ligand polymère sont résumées dans le tableau ci-dessous. Le rapport CuBr/PMDETA/amorceur est le même pour toutes les polymérisations : 2/2/1. Le pourcentage volumique en monomère dans le DMF est toujours d'environ 65 % et la réaction se fait à 60°C sous azote.

Les ligands polymères synthétisés étant des disulfures, on les appelle PMA t Bu-DS pour le poly(méthacrylate de *tert*-butyle) disulfure par exemple. Après arrêt de la réaction, le cuivre est extrait du milieu réactionnel *via* la précipitation du polymère.

Ligand polymère	Solvant de précipitation	M _{n,théorique} (g/mol)	Temps de réaction (min)	Taux de conversion (%)
PMA t Bu-DS	MeOH/eau	10000	300	61
PMA t Bu-DS	MeOH/eau	20800	300	70
PHEMA-PMA t Bu-DS	Toluène	7600	200	45
PEG-PMA t Bu-DS	-	10200	300	-
PEG-PHEMA-DS	Toluène	10600	200	-
PHEMA-DS	THF	10000	30	58

Tableau IV.1 : Résumé des conditions de polymérisation des ligands polymères

Le taux de conversion des différentes polymérisations peut être calculé par mesure gravimétrique (voir Annexe 1). Les valeurs mesurées en fonction des conditions de polymérisation sont représentées dans le Tableau IV.1 ci-dessus.

Pour les copolymères ligands à base de méthacrylate de PEG, les taux de conversion n'ont pas pu être déterminés par gravimétrie car le méthacrylate de PEG est un polymère. En général, avec ce monomère le suivi cinétique se fait par RMN ¹H. Cependant, ici, le copolymère formé donne des signaux en RMN ¹H qui masquent ceux des bouts de chaînes.

Les taux de conversion en fonction du temps pour les polymérisations décrites ci-dessus sont présentés dans la Figure IV.5.a. Nous observons que la vitesse de polymérisation du PMA t Bu-DS avec une masse théorique de 10000 g/mol augmente plus rapidement que pour le PMA t Bu-DS dont la masse théorique est de 20000 g/mol. Pour le premier ligand polymère,

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

la conversion finale est de 61 % contre 70 % pour le second. Pour le PHEMA-DS, seul un prélèvement à la fin de la réaction (30 min) est effectué car la solution prend en masse. On peut néanmoins discuter de la vitesse de polymérisation de ce polymère qui est bien plus importante que pour le PMA \bar{t} Bu-DS. On atteint un taux de conversion de 58% en une demi-heure. Cette vitesse plus élevée pour le PHEMA-DS vient du fait que l'HEMA est plus polaire que le MA \bar{t} Bu. Ainsi, dans le DMF, cette polarité a un effet sur la structure et la fonction des espèces catalytiques entraînant une augmentation de la vitesse de polymérisation³⁵. Pour le copolymère statistique, la vitesse de polymérisation semble proche de celle du PMA \bar{t} Bu-DS de masse théorique 10000 g/mol mais le plateau du taux de conversion est très vite atteint dès les premières 30 min de la réaction comme pour le PHEMA-DS. Le taux de conversion pour ce copolymère est de 45 %.

Comme nous l'avons dit précédemment, une polymérisation contrôlée se caractérise par une évolution de $\ln([M]_0/[M])$ linéaire, avec M la concentration en monomère, en fonction de $t^{2/3}$ dans le cas des méthacrylates³⁷. La Figure IV.5.b montre que pour le PMA \bar{t} Bu-DS, indépendamment de la masse molaire visée, cette relation est vérifiée.

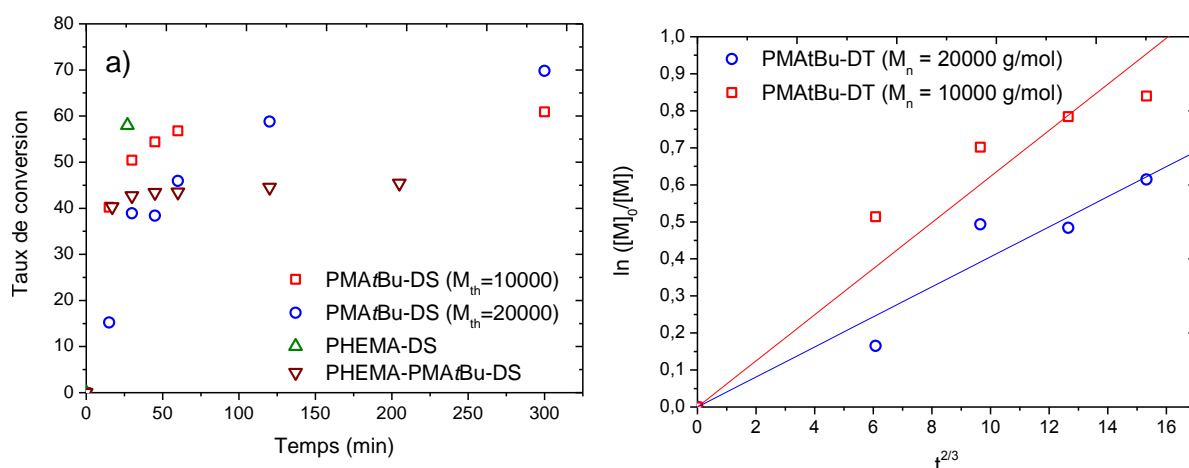


Figure IV.5 : Cinétiques des polymérisations a) Taux de conversion en fonction du temps des différentes polymérisations – b) $\ln([M]_0/[M])$ en fonction de $t^{2/3}$

Maintenant, on vérifie aussi le contrôle de la polymérisation par la mesure des masses molaires et des polymolécularités par chromatographie d'exclusion stérique (CES, Tableau IV.2).

La masse molaire du PHEMA-DS n'a pu être déterminée par CES car les analyses sont faites dans du THF et ce polymère n'est pas soluble dans ce solvant. Une détermination a été faite par RMN ^1H en faisant le rapport des intégrations des signaux des protons CH_2 proches du

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères soufre sur l'intégration des signaux des protons CH₂ dans l'unité répétitive. La masse molaire (M_n) ainsi calculée est de 6075 g/mol.

Echantillon	M _{n,théorique visée} (g/mol)	Taux de Conversion (%)	M _n (g/mol)	M _w (g/mol)	I _p
PMA _t Bu-DS	10000	61	8200	10400	1,3
PMA _t Bu-DS	20000	70	18800	24500	1,3
PHEMA-DS	10000	58	6075	-	-
PHEMA-PMA _t Bu-DS	7500	45	13300	18900	1,4
PEG-PMA _t Bu-DS	10000	-	4500	8000	1,8
PEG-PHEMA-DS	10000	-	19800	34100	1,7

Tableau IV.2 : Résumé des résultats concernant les masses des ligands polymères

Les homopolymères et copolymères synthétisés ont des polymolécularités assez faibles. Pour les masses molaires en nombre comparées à celles attendues théoriquement, on détermine une efficacité d'amorçage d'environ 74 % pour les PMA_tBu-DS, de 95 % pour le PHEMA-DS et de 25 % pour le copolymère PHEMA-PMA_tBu-DS. Les évolutions des masses molaires ainsi que les évolutions de l'indice de polymolécularité (I_p) en fonction du taux de conversion sont montrés sur la Figure IV.6.

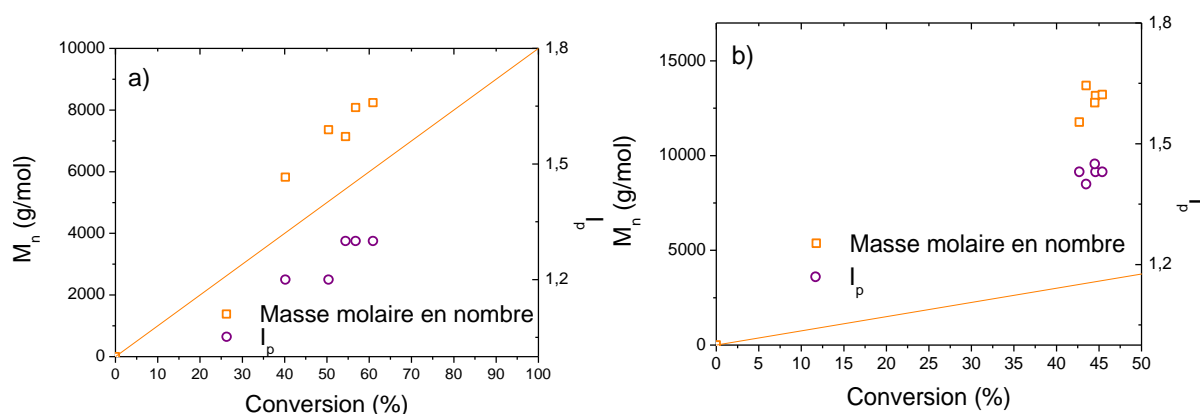


Figure IV.6 : M_n et I_p en fonction du taux de conversion pour a) PMA_tBu-DS-10000 et b) PHEMA-PMA_tBu-DS

Dans le cas des deux ligands polymères présentés sur la Figure IV.6, leurs indices de polymolécularité restent constants en fonction du taux de conversion. Le MA_tBu-DS présente une évolution linéaire du M_n en fonction de la conversion qui reste proche de la courbe théorique validant un des critères d'une polymérisation bien contrôlée. Pour le

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères copolymère, la droite de M_n en fonction de la conversion est plus éloignée de la droite théorique traduisant le défaut d'amorçage calculé plus haut (25%).

Pour les copolymères, en complément des analyses CES, une analyse structurale par RMN ^1H permet de quantifier les proportions d'un monomère par rapport à l'autre (voir plus loin).

IV.2.1.3 Hydrolyse des ligands à base de PMA t Bu

Afin de pouvoir synthétiser les nanoparticules d'or en milieu aqueux et aussi pouvoir fonctionnaliser ultérieurement les ligands polymères, nous chercherons à hydrolyser la fonction ester du PMA t Bu pour obtenir du poly(acide méthacrylique) (PMAA).

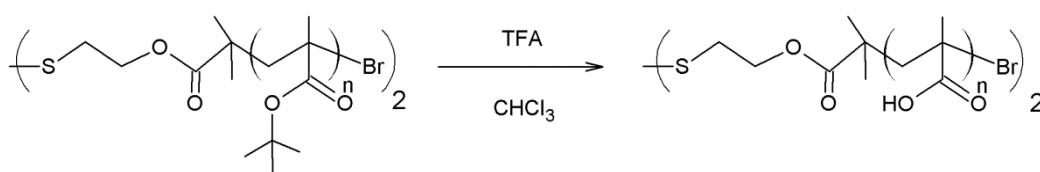


Figure IV.7 : Réaction d'hydrolyse des groupements *tert*-butyle du PMA t Bu

L'hydrolyse des homopolymères et copolymères contenant des groupements *tert*-butyle se fait dans le chloroforme en présence d'acide trifluoroacétique (TFA). Le milieu est agité pendant 5 jours pour assurer que l'hydrolyse soit complète : on observe alors une précipitation du ligand polymère dans le chloroforme. Le ligand polymère est purifié par filtration, suivie de plusieurs lavages au chloroforme pour éliminer le TFA. Tous les ligands polymères hydrolysés sont solubles dans l'eau excepté le copolymère avec du PHEMA qui gonfle et se solubilise difficilement.

L'efficacité de l'hydrolyse est vérifiée par FTIR et RMN ^1H . La Figure IV.8 représente les spectres FTIR des ligands polymères PMA t Bu-DS puis après hydrolyse PMAA-DS. Pour le PMA t Bu-DS, les bandes à 2975 cm^{-1} et 2930 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongations des liaisons (C-H) des groupements CH_3 et CH_2 respectivement. La bande intense à 1716 cm^{-1} correspond à la liaison (C=O) d'un ester. Après hydrolyse, sur le spectre en bleu, la bande de la liaison (C=O) est décalée à 1690 cm^{-1} . La bande reste importante mais est plus large que précédemment. Ce décalage est caractéristique du passage d'un groupe carbonyle ester à celui d'un acide.

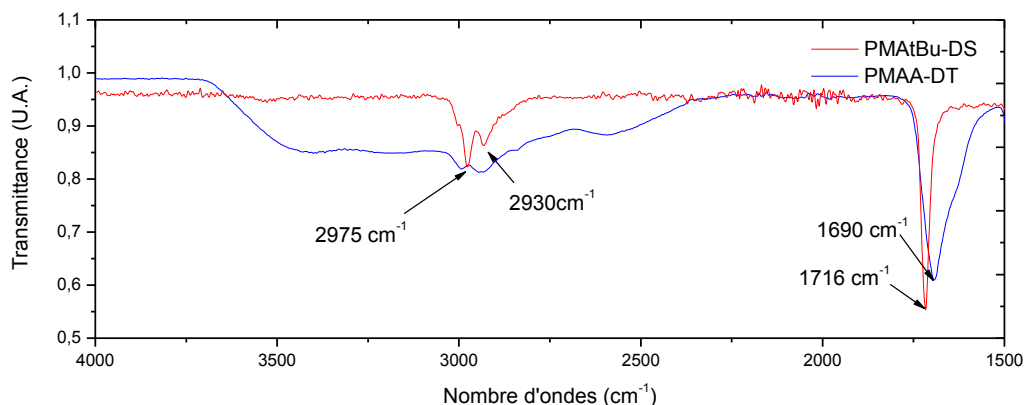


Figure IV.8 : Spectres FTIR des ligands polymères de PMAtBu-DS et PMAA-DS

Cette diminution traduit la disparition des groupements méthyles du *tert*-butyle au profit de groupements hydroxyles. Ces derniers apparaissent sur le spectre sous forme d'une large bande entre 3000 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} (vibration d'élongation des liaisons (O-H) d'un acide).

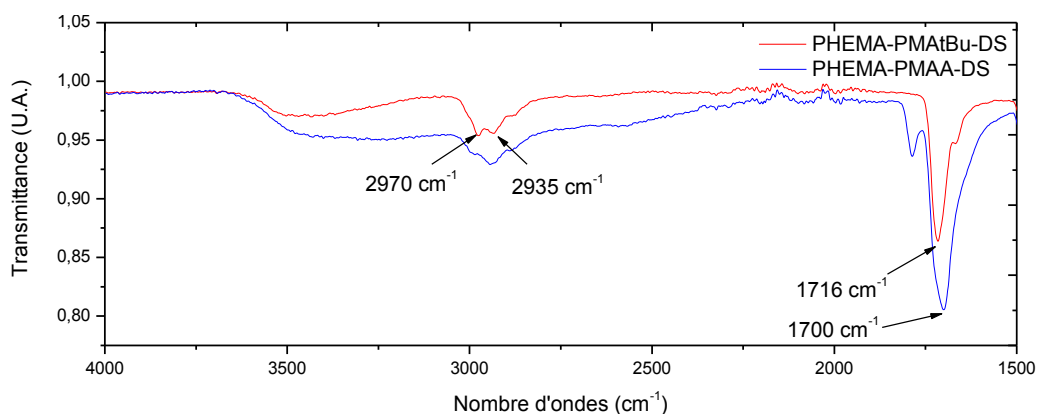


Figure IV.9 : Spectres FTIR des ligands polymères de PHEMA-PMAtBu-DS et de PHEMA-PMAA-DS

La Figure IV.9 représente les spectres FTIR des ligands polymères PHEMA-PMAtBu-DS puis après hydrolyse PHEMA-PMAA-DS. Comme précédemment, nous observons un décalage de la bande de liaison (C=O) traduisant le passage d'un ester à un acide. On note que le décalage est moins prononcé qu'avec le PMAtBu-DS, sûrement dû à la présence du PHEMA dont les fonctions ester n'ont pas été hydrolysées. En effet, l'hydrolyse du PHEMA peut se faire en présence d'acide mais il est également nécessaire de chauffer à des températures élevées³⁸. Nous observons qu'après hydrolyse, la bande attribuée aux vibrations de la liaison (C-H) des CH₂ est plus importante que celle des CH₃. Enfin, une large bande entre 3100 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} est observée sur le spectre du PHEMA-PMAtBu-DS et est attribuée aux vibrations d'élongation de la liaison (O-H) du PHEMA. Après hydrolyse, cette bande s'élargie davantage, incluant également les vibrations des liaisons (O-H) de l'acide.

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

Dans le cas des ligands copolymères PEG-PMAA-DS, l'analyse est plus difficile car la raie d'absorption liée aux vibrations $\nu_{C=O}$ de l'acide méthacrylate est superposée avec la raie relative aux vibrations $\nu_{C=O}$ de l'ester du méthacrylate de PEG.

Pour compléter l'analyse FTIR de manière plus quantitative, une analyse RMN 1H a également été menée.

Les spectres RMN 1H des échantillons PMA t Bu-DS (a) et PMAA-DS (b) sont représentés dans la Figure IV.10. Les pics (1) correspondant aux groupements CH_2 avec une intégration de 2 sont pris comme référence. Les méthyles du squelette correspondent aux pics notés (2) et leur intégrale est d'environ 3. Enfin, les deux spectres se différencient par le pic (3). Son absence sur le spectre (b) traduit la disparition des méthyles du groupement *tert*-butyle. Pour évaluer le taux d'hydrolyse, nous avons comparé les valeurs d'intégration des pics (3) avant et après hydrolyse. Le taux d'hydrolyse calculé est d'environ 96 %.

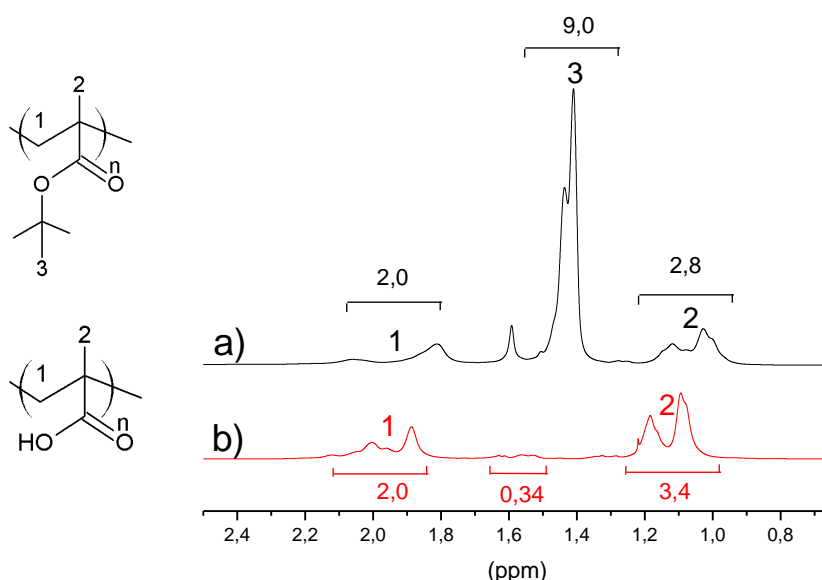


Figure IV.10 : Spectres RMN 1H des ligands polymères PMA t Bu-DS dans le $CDCl_3$ (a) et PMAA-DS dans le MeOD (b)

La Figure IV.11 représente les spectres RMN 1H des échantillons PHEMA-PMA t Bu-DS (a) et PHEMA-PMAA-DS (b). Le ligand copolymère contient deux unités monomères ayant le même squelette méthacrylate. De ce fait, les valeurs des intégrations théoriques changent, par rapport au ligand polymère étudié précédemment. En comparant les intégrations de chaque unité monomère, on peut estimer leur proportion. Ici, il y a autant d'unité HEMA que de MA t Bu dans le copolymère.

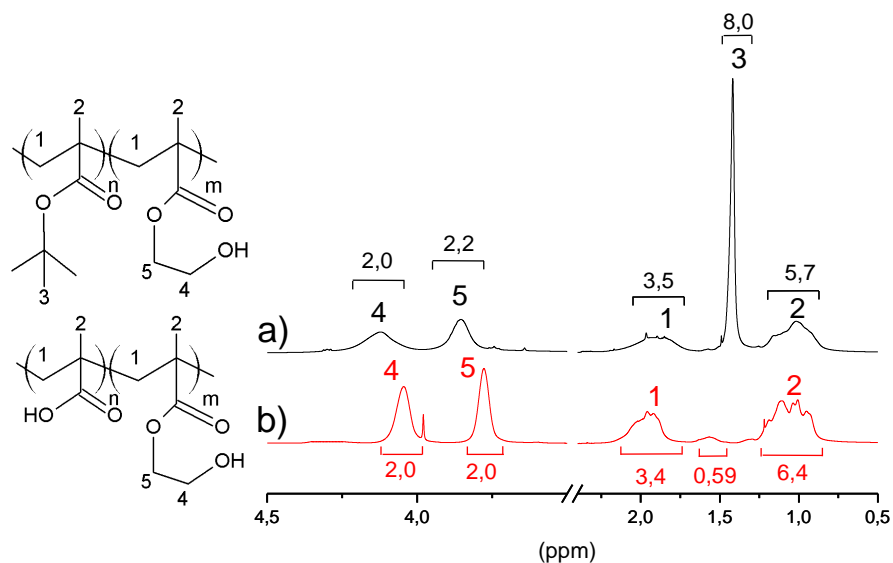


Figure IV.11 : Spectres RMN ^1H des ligands copolymères PHEMA-PMAAtBu-DS dans le CDCl_3 (a) et PHEMA-PMAA-DS dans le MeOD (b)

Après hydrolyse, les deux pics (4 et 5), correspondant aux groupements CH_2 près de l'ester et de l'hydroxyle des unités HEMA, sont inchangés (léger décalage dû au changement de solvant deutéré), confirmant qu'il n'y a pas eu hydrolyse de ces groupements. Les pics (1) et (2) sont également inchangés. Le pic (3) a quasiment disparu preuve d'une bonne hydrolyse. Le taux d'hydrolyse calculé est ici de 93 %.

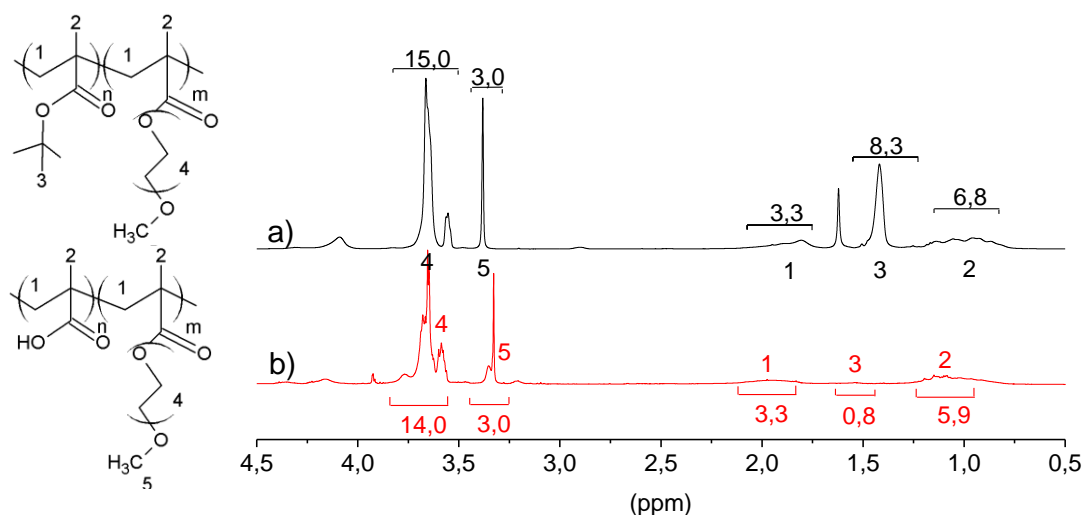


Figure IV.12 : Spectres RMN ^1H des ligands copolymères PEG-PMAAtBu-DS dans le CDCl_3 (a) et PEG-PMAA-DS dans le D_2O (b)

La Figure IV.12 représente les spectres RMN ^1H des échantillons PEG-PMAAtBu-DS (a) et PEG-PMAA-DS (b). De même que précédemment, le squelette méthacrylate est présent dans les

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères deux unités monomères. Il y a autant de PEG-méthacrylate que de PMAA. Après hydrolyse, seul le pic (3) a disparu confirmant l'hydrolyse. Le taux d'hydrolyse est dans ce cas de 91%.

Pour mener à bien les synthèses des nanoparticules, il est nécessaire de connaître avec précision les masses molaires des ligands après hydrolyse. Bien que pour le PHEMA-DS nous avons pu calculer la masse molaire en RMN ^1H , il n'est pas possible de le faire pour les autres ligands. En effet, les intégrations des signaux des protons CH_2 proches du soufre ne sont pas suffisamment définies, pour faire le rapport avec les intégrations des signaux des protons CH_2 de l'unité répétitive.

On a cherché à faire une estimation de la masse molaire après hydrolyse des ligands à partir du taux d'hydrolyse déterminé en RMN ^1H , de la masse molaire relative mesurée avant hydrolyse en CES et des masses molaires des unités monomères (u.m.) avant et après hydrolyse :

$$M_n \text{ relative estimée} = M_n \text{ relative CES} \times \frac{M_{\text{u.m. après hydrolyse}}}{M_{\text{u.m. avant hydrolyse}}} \times \text{taux}_{\text{hydrolyse}}$$

Echantillon	Avant hydrolyse		Après hydrolyse	
	M_n relative CES (g/mol)	taux d'hydrolyse (%)	M_n relative estimée (g/mol)	
PMAA-DS-1	8200	96	4800	
PMAA-DS-2	18800	98	11100	
PHEMA-PMAA-DS	13300	93	10100	
PEG-PMAA-DS	4700	91	3700	
PHEMA-DS	6075	-	-	
PEG-PHEMA-DS	19800	-	-	

Tableau IV.3 : Tableau résumé des M_n avant et après hydrolyse

Ce calcul n'est évidemment qu'une estimation mais qui peut être utile car la mesure par CES est rendue difficile puisque les ligands polymères ne sont pas solubles dans le THF. Cependant, pour le ligand polymère PMAA-DS-2 et le ligand copolymère PHEMA-PMAA-DS, nous avons pu conduire une analyse CES en les dissolvant dans un minimum d'eau puis en les diluant dans le THF. Dans le cas du copolymère, on trouve une masse M_n de 10000 g/mol qui est très proche de la valeur estimée (10100 g/mol). Dans le cas du polymère (PMAA-DS-2), on trouve une masse de 4600 g/mol, soit quasiment la moitié de la M_n relative estimée dû probablement à une réduction de la liaison S-S suite à l'hydrolyse.

IV.2.2 Synthèse des nanoparticules d'or greffées de polymères

Comme nous l'avons vu précédemment, la synthèse de nanoparticules (NPs) d'or par voie « grafting to » consiste à synthétiser les NPs d'or en présence des ligands polymères avec une fonction thiol (ou disulfure). La préparation de ces NPs est basée sur la méthode de Brust³⁹ qui consiste à réduire un sel d'or par un hydrure de type NaBH_4 , en présence d'un ligand thiol. Cette technique permet d'obtenir des NPs de petite taille (inférieure à 10 nm). Elle est basée sur une réaction de compétition entre la réduction par NaBH_4 et le greffage du ligand.

Le sel d'or sous forme d' HAuCl_4 , est mis en excès en présence du ligand polymère dans du méthanol. On introduit le ligand thiol puis le NaBH_4 qui va réduire instantanément le sel d'or. Le ligand polymère est ainsi greffé de manière covalente et va contribuer à limiter la croissance des NPs d'or. Le milieu est laissé sous agitation pendant 24 h afin d'optimiser le taux de greffage.

Les NPs sont ensuite isolées du milieu réactionnel par précipitation et lavées avec plusieurs cycles de précipitation/centrifugation dans un mélange méthanol/éther. Les NPs ainsi obtenues sont séchées (poudre noire). Le greffage de ligands hydrosolubles à la surface de ces NPs permet une redissolution spontanée dans l'eau.

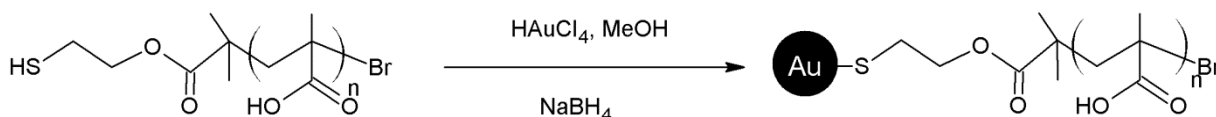


Figure IV.13 : Synthèse de NPs d'or greffées d'une couronne de PMAA

Ce protocole a été appliqué avec les ligands polymères et copolymères synthétisés préalablement (voir paragraphe précédent). Seul le PHEMA-PEG-DS n'a pas été greffé sur les NPs d'or car aucun solvant n'est compatible à la fois avec le copolymère, le NaBH_4 et les sels d'or. Pour les NPs d'or greffées d'une couronne de PHEMA, il est très difficile de les récupérer après séchage car elles forment un film mince adhérent.

Des premières caractérisations de ces NPs ont été faites en spectroscopie UV-Vis ainsi qu'en RMN ¹H.

Les NPs présentent le même spectre d'absorbance (cf. Figure IV.14) avec une bande plasmon qui varie très légèrement $\lambda_{\text{Au-PHEMA-PMAA}} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Au-PMAA-1et2}} = 517 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{Au-PEG-PMAA}} = 510 \text{ nm}$. La présence d'une seule bande de résonance indique que les NPs sont sphériques.

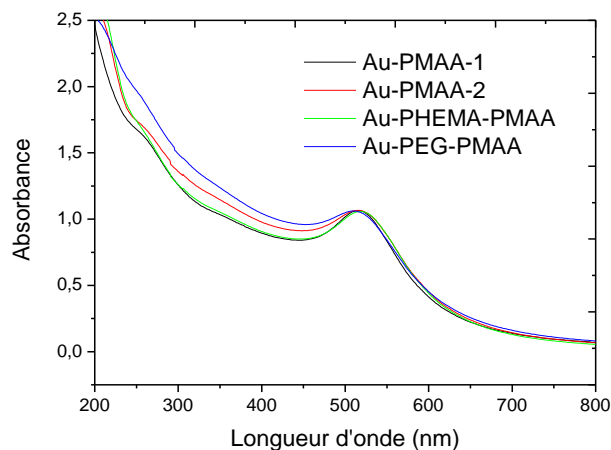


Figure IV.14 : Spectres UV-Vis des NPs dans l'eau à C = 0,17 mg/mL

La taille des NPs d'or étant reliée à la longueur d'onde de cette bande de résonance plasmon⁴⁰, on peut estimer que les NPs présentent des tailles proches dans tous les cas. Lorsque les NPs ont une taille inférieure à 32 nm ($\lambda_{\text{plasmon}} \leq 525$ nm), on peut déterminer un diamètre moyen des NPs *via* le rapport des valeurs d'absorbance de la bande de résonance et de la bande à 450 nm. Les NPs ont un diamètre compris entre 3 et 4 nm par cette estimation. La largeur de la bande est également liée à la polydispersité en taille des NPs. Cependant, l'absorption des polymères à partir de 450 nm, nous empêche ici de déterminer cette valeur.

La spectroscopie RMN ¹H permet d'identifier la présence des polymères à la surface des NPs. Les spectres des ligands (co)polymères sont faits dans le méthanol-d₄ alors que les spectres des NPs greffées sont effectués dans le D₂O.

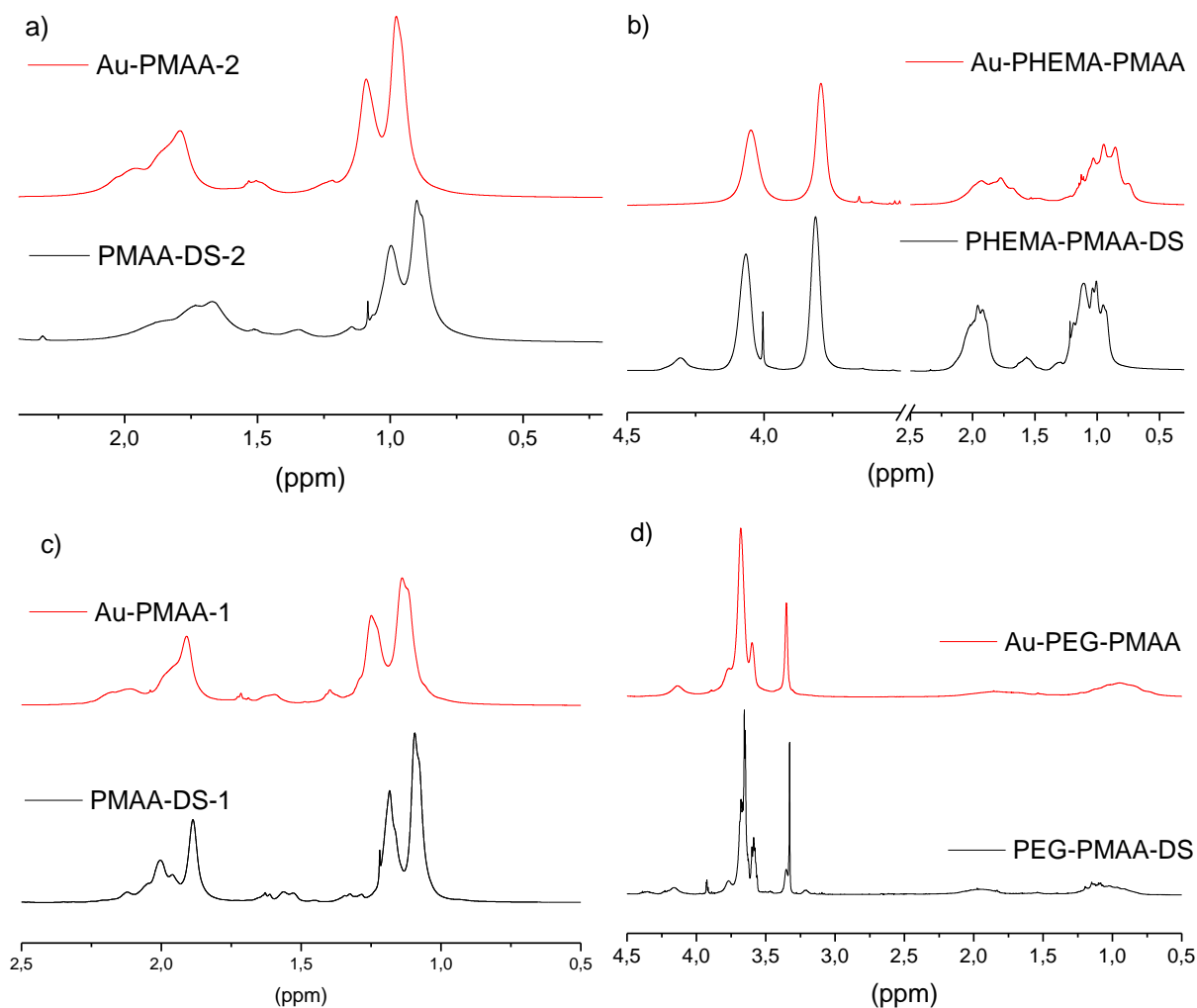


Figure IV.15 : Spectres RMN ^1H des NPs greffées et des ligands associés

Les spectroscopies UV-Vis et RMN ^1H ont donc permis de caractériser la formation de NPs d'or greffées de polymères. Une autre synthèse a également été faite dans le but de montrer la possibilité d'une utilisation dans le domaine de la vectorisation de médicaments avec le greffage d'un principe actif.

IV.2.3 Tests de greffage d'un principe actif sur les nano-objets

IV.2.3.1.1 Les nanoparticules inorganiques greffées de polymères comme nanovecteur

La doxorubicine (DOX) est un principe actif de type anthracycline⁴¹ (antibiotique anti-tumoral) dont la structure est présentée sur la Figure IV.16. Elle est approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) et est utilisée pour le traitement du cancer depuis plus de 30 ans.

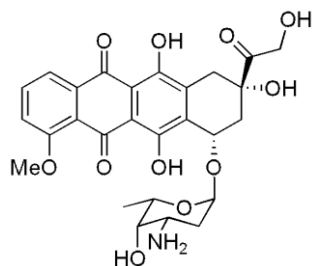


Figure IV.16 : Structure de la doxorubicine (DOX)

La DOX est ainsi connue pour se lier aux enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN et s'intercaler avec les paires de bases de l'ADN provoquant des effets cytotoxiques.

La DOX est le principe actif qui a été choisi dans notre étude car il est soluble dans l'eau, ce qui offre la possibilité de le greffer directement sur les NPs greffées de PMAA *via* les fonctions acides du polymère. Ses propriétés colorimétriques permettent de suivre facilement sa concentration ainsi que son environnement chimique pour s'assurer du bon greffage.

Sur les exemples identifiés, il existe peu de systèmes de NPs inorganiques greffées de polymères et de DOX dans la littérature. Le greffage de la DOX sur des NPs inorganiques greffées de polymères se fait principalement selon deux stratégies. La première implique la fonction NH₂ de la DOX et la seconde sa fonction carbonyle. Parmi les NPs dont le greffage de la DOX a été fait selon la première stratégie, on retrouve les NPs de Fe₃O₄ ou magnétite, greffées d'une couronne de PMAA⁴². Les groupements carboxyliques du PMAA sont activés en présence du couple NHS/EDC pour permettre le greffage. La réaction de greffage par cette stratégie peut également se faire par activation de la fonction acide par la DCC (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide)⁴³ ou encore en fonctionnalisant le polymère greffé avec une fonction carbonate pour créer une liaison carbamate avec la DOX⁴⁴. Lorsque la fonction carbonyle de la DOX est utilisée pour le greffage, c'est souvent une liaison hydrazone qui est formée avec le polymère greffé et fonctionnalisé préalablement avec une fonction hydrazide⁴⁴⁻⁴⁵.

Comme les fonctions disponibles à la surface de nos NPs d'or greffées sont des fonctions acides carboxyliques, on va choisir le couplage peptidique avec la liaison NH₂ de la DOX⁴². Le protocole utilisé par Majeed a ainsi été adapté.

IV.2.3.2 Réaction de greffage de la DOX sur les NPs Au-PMAA-2

La réaction est effectuée sur les NPs Au-PMAA-2 synthétisées avec le PMAA-DS-2. Celles-ci sont solubilisées dans un tampon phosphate à pH = 7,8. Cette réaction est permise grâce au couple NHS/EDC. L'EDC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide) est un agent de couplage utilisé pour coupler des groupements carboxyliques à des amines primaires. L'avantage de l'EDC est sa solubilité dans l'eau permettant ainsi une purification simple par dialyse. La réaction de couplage doit être rapide car l'ester activé formé avec l'EDC peut être rapidement hydrolysé en condition aqueuse. L'utilisation de NHS (N-hydroxysuccinimide) permet d'augmenter la stabilité de l'ester activé en réagissant avec l'acide. Il forme un ester moins labile et augmente l'efficacité de l'EDC. Lorsque l'ester activé est formé, la doxorubicine solubilisée dans de l'eau est ajoutée et la réaction est agitée pendant 24h. Pour éliminer les excès d'EDC/NHS ainsi que la doxorubicine qui n'aurait pas réagi, une dialyse contre l'eau est effectuée.

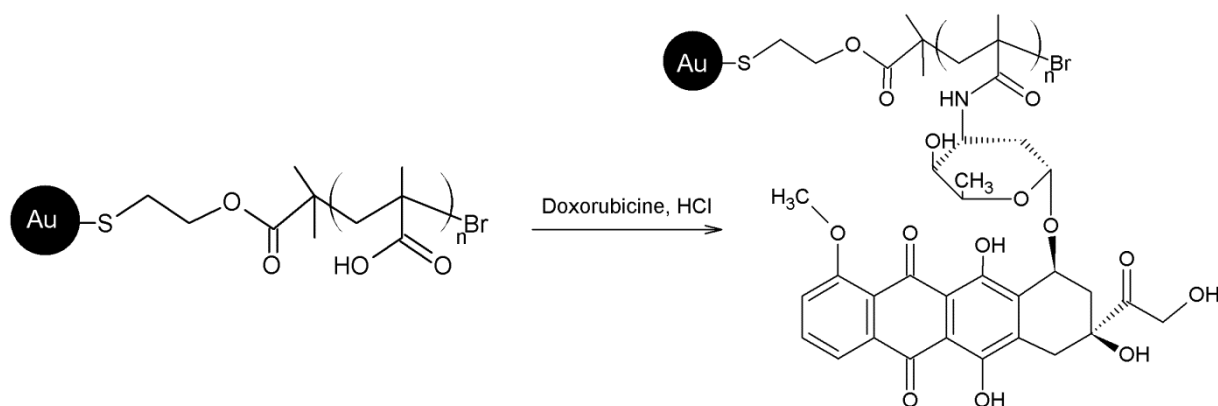


Figure IV.17 : Réaction de greffage de la DOX sur les NPs Au-PMAA

IV.2.3.3 Caractérisation du greffage de la DOX

Afin de vérifier le greffage de la DOX, le spectre UV-Vis des NPs après greffage est comparé à ceux des NPs avant greffage et de la DOX (cf. Figure IV.18).

Les NPs d'or greffées de PMAA avant greffage montrent un maximum d'absorption à $\lambda = 517$ nm avec une largeur à mi-hauteur d'environ 80 nm. Une forte absorption est également observée dans la partie UV du spectre. Le pic d'absorption de la DOX a un maximum à $\lambda = 484$ nm et une largeur à mi-hauteur de 103 nm. De plus, le pic n'est pas symétrique. On observe un léger épaulement à $\lambda = 538$ nm mais également d'autres pics dans la partie UV du spectre à $\lambda = 232$ nm, à $\lambda = 254$ nm et à $\lambda = 289$ nm. Après greffage, le maximum d'absorption des NPs est déplacé vers $\lambda = 506$ nm avec une largeur à mi-hauteur de 84 nm.

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

Ce maximum d'absorption se rapproche de celui de la DOX de même que la largeur à mi-hauteur du pic d'absorption qui a augmentée.

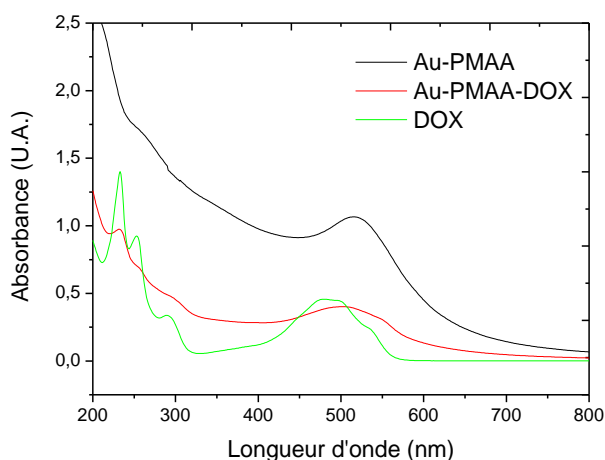


Figure IV.18 : Spectres UV-Vis des NPs d'or greffées de PMAA avant et après greffage et de la DOX seule

Le pic d'absorption n'est plus totalement symétrique non plus, avec un épaulement à $\lambda = 554$ nm. Dans la partie UV du spectre, un pic ressort de la forte absorption observée avant greffage à $\lambda = 232$ nm. La signature de la DOX sur les NPs est donc bien présente notamment avec le décalage de la longueur d'onde d'absorption des NPs, la largeur du pic plus grande, l'épaulement sur l'allure du pic ou encore le pic d'absorption à $\lambda = 232$ nm.

On peut quantifier la doxorubicine présente sur les NPs à partir de ces spectres d'absorbance. En calculant le coefficient d'extinction molaire de la DOX à $\lambda = 232$ nm, on peut évaluer la concentration en DOX dans l'échantillon. Cette concentration est de $3,05 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹. La concentration en unités monomères est de $6,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹. Il y a donc une molécule de DOX greffée tous les 2000 unités monomères. Une chaîne de polymère contenant approximativement 50 unités répétitives, la DOX n'est pas greffée sur toutes les chaînes. Il y a environ 2,5 % de DOX par rapport aux polymères. L'encombrement stérique de cette molécule explique sans doute ce faible taux de greffage.

Pour vérifier le greffage de la DOX sur les NPs, un spectre FTIR a également été réalisé (cf. Figure IV.19). Les bandes à 2990 cm⁻¹ et 2940 cm⁻¹ des groupements CH₃ et CH₂ sont toujours présentes dans les deux spectres. Après greffage, la forte bande à 1683 cm⁻¹ dû à la liaison (C=O) d'un acide a disparu signe qu'une amidification a eu lieu.

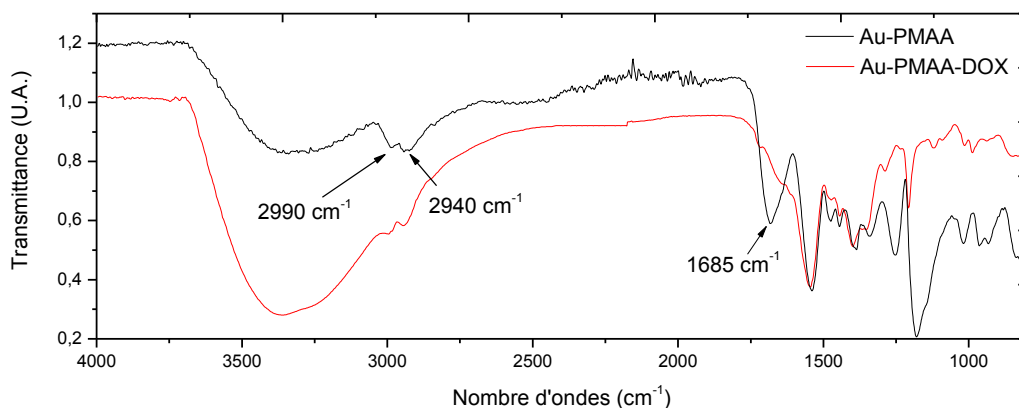


Figure IV.19: Spectres FTIR des NPs d'or greffées de PMAA avant et après greffage de la DOX

En spectroscopie UV-Visible, il a été vu que la DOX était présente en faible quantité sur les NPs. Nous l'avons vérifié par RMN ^1H (voir Figure IV.20 ci-dessous). En effet, on retrouve plusieurs pics entre 2 et 5 ppm correspondant à la DOX mais dont l'intensité est très faible. On a estimé à environ 2% le taux de DOX par rapport au polymère.

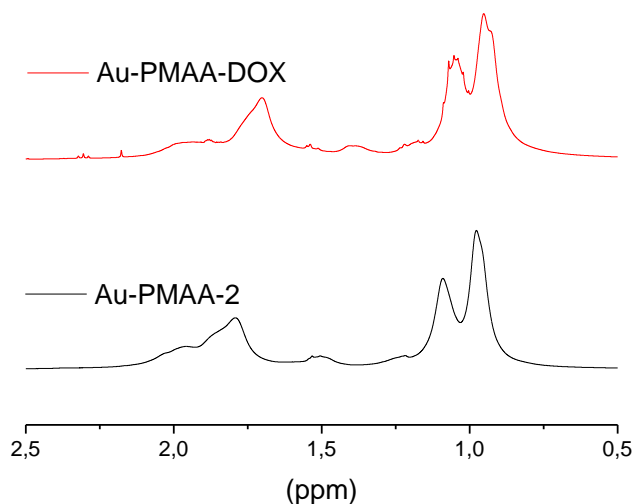


Figure IV.20 : Spectres RMN ^1H des NPs Au-PMAA-2 et des NPs Au-PMAA-DOX dans le D_2O

IV.3 Caractérisation des nano-objets hybrides

Maintenant que la synthèse des nano-objets a été présentée, nous allons nous attacher à faire une caractérisation fine de ceux-ci par différentes techniques. En effet, celle-ci est indispensable pour pouvoir quantifier ensuite l'effet de l'irradiation sur ces nano-objets. Pour connaître la composition de la couche organique des nanosystèmes, des analyses par ATG ainsi que par spectroscopie photoélectronique induite par rayons X (XPS) ont été

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères réalisées. Pour étudier particulièrement le cœur métallique, des analyses en TEM ainsi qu'en diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) ont été conduites. L'ensemble du système nanoparticule greffée de polymères a enfin été observé par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA).

IV.3.1 Caractérisation de la couronne polymère

IV.3.1.1 Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'ATG va nous permettre de déterminer de manière quantitative la quantité de couche organique par rapport au cœur métallique. Elle consiste à mesurer la variation de masse d'un échantillon en augmentant la température sous atmosphère contrôlée. On part de l'hypothèse que seule la couche organique va se dégrader dans la plage de température étudiée (30 à 800 °C), l'or se vaporisant à des températures plus élevées. On va ainsi pouvoir déterminer un pourcentage de matière organique des NPs.

Les analyses de thermogravimétrie décrites dans la littérature pour ce type d'objets, sont réalisées sous atmosphère inerte d'argon ; nous avons donc choisi initialement de faire de même. Cependant, nous avons observé que dans ces conditions, la dégradation du polymère n'est pas totale (résidu noir après analyse). Pour pallier à ce problème, nous avons conduit les analyses ATG sous oxygène (dégradation par oxydation).

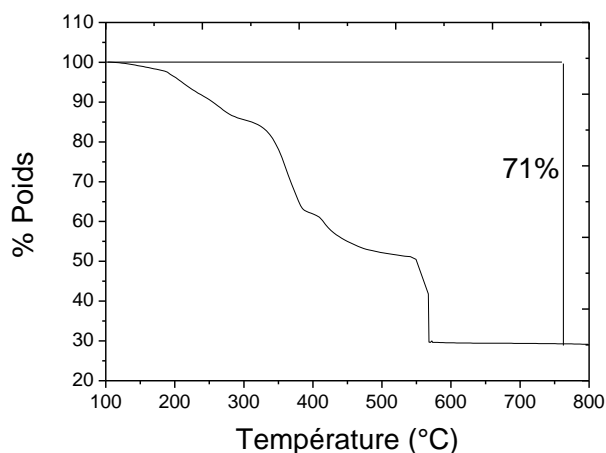


Figure IV.21 : Analyse ATG des NPs d'or greffées d'une couronne de PMAA (M_n = 4600 g/mol) sous O₂ (Au-PMAA-2)

La Figure IV.21 montre l'analyse ATG de NPs d'or greffées d'une couche de PMAA de M_n = 4600 g/mol sous oxygène (Au-PMAA-2). La quantité de matière organique à la surface des NPs est dans ce cas de 71 %. Il y a eu sous atmosphère inerte d'argon un pourcentage de

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

perte de masse de 54 % donc nettement plus faible. Jusqu'à 500°C, la courbe subit une dégradation progressive à partir de 100°C puis une dégradation plus marquée à partir de 350°C pour atteindre un plateau vers 500°C. Alors que pour la courbe analysée sous azote, une faible diminution est observée à partir de 600°C, une chute nette est observée pour l'analyse sous oxygène à 570°C. Après analyse, le résidu récupéré est de couleur jaune or caractéristique : toute la matière organique a bien été détruite. Il est donc nécessaire de travailler sous oxygène pour connaître précisément la quantité de polymère par rapport au cœur métallique. Toutes les autres NPs d'or greffées ont donc été analysées avec cette méthode et l'on obtient les résultats du Tableau IV.4 à partir des thermogrammes de la Figure IV.22.

Echantillon	% de matière organique
Au-PMAA-1 (Mn = 2400 g/mol)	55
Au-PMAA-2 (Mn = 4600 g/mol)	71
Au-PHEMA-PMAA (Mn = 5000 g/mol)	73
Au-PEG-PMAA (Mn = 1850 g/mol)	64

Tableau IV.4 : Résumé des pourcentages de matière organique à la surface des NPs

La Figure IV.22 montre les ATG de tous les nano-objets synthétisés. La courbe des NPs Au-PMAA-1 (a) a la même allure que la Figure IV.21 comme le polymère à la surface de ces NPs est le même (PMAA). L'allure de la courbe des NPs Au-PHEMA-PMAA (b) est très proche des précédentes à l'exception de la seconde dégradation qui a lieu autour de 700°C. Cette seconde couche dégradée est plus résistante thermiquement que le PMAA due à la présence du PHEMA. Enfin la Figure IV.22.c correspondant aux thermogrammes des NPs d'or greffées d'une couronne de PEG-PMAA (Au-PEG-PMAA) a aussi la même allure avec une seconde température de dégradation autour de 620°C.

Compte tenu des masses molaires, les pourcentages de matière organique trouvés à la surface des particules (en général de l'ordre de 65%) sont élevés par rapport à la quantité d'or. Nous ne pouvons exclure que du polymère ait co-précipité durant les phases de lavage.

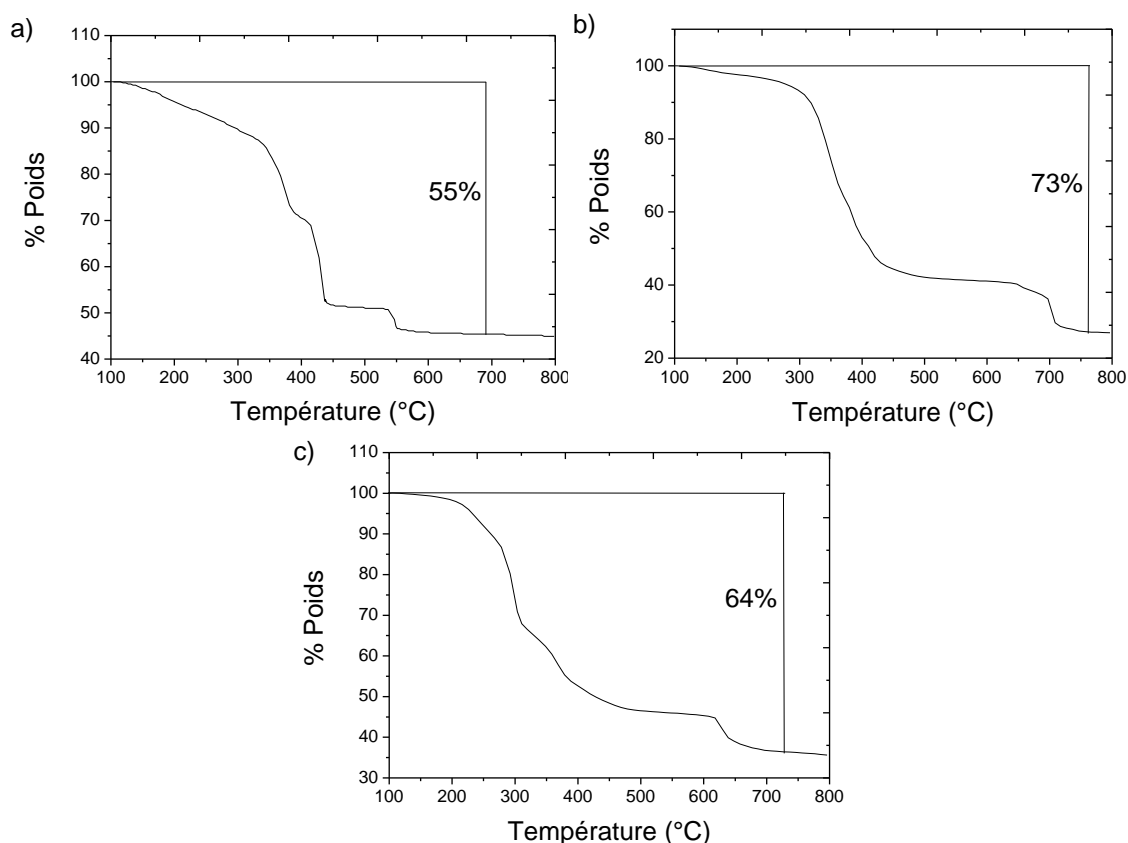


Figure IV.22 : Analyses ATG des NPs d'or greffées a) d'une couronne de PMAA ($M_n = 2400$ g/mol) (Au-PMAA-1), b) d'une couronne de PHEMA-PMAA ($M_n = 5000$ g/mol) (Au-PHEMA-PMAA) c) d'une couronne de PEG-PMAA ($M_n = 1850$ g/mol) (Au-PEG-PMAA)

Des analyses XPS ont également été menées pour connaître la composition de cette matière organique. On va choisir, à partir de là, de se focaliser sur deux systèmes. En effet, les nano-objets sont plus stables dans l'eau lorsque la couronne a une masse molaire plus importante. De même pour la suite, il est plus simple de comparer deux systèmes qui présentent des analogies en termes de masse de chaîne ou de quantité de matière organique à la surface des NPs. Il a donc été choisi de travailler préférentiellement avec les NPs Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA.

IV.3.1.2 Spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS)

La Figure IV.23 montre le spectre XPS des NPs d'or greffées de PMAA. Le spectre indique la présence de sodium, d'oxygène, de carbone et d'or. Le sodium provient sûrement du NaBH_4 qui, lors de la synthèse, a déprotoné les fonctions acides. Cette présence de sodium est comptabilisée comme composant inorganique en ATG. Une quantification précise par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS) est décrite plus tard.

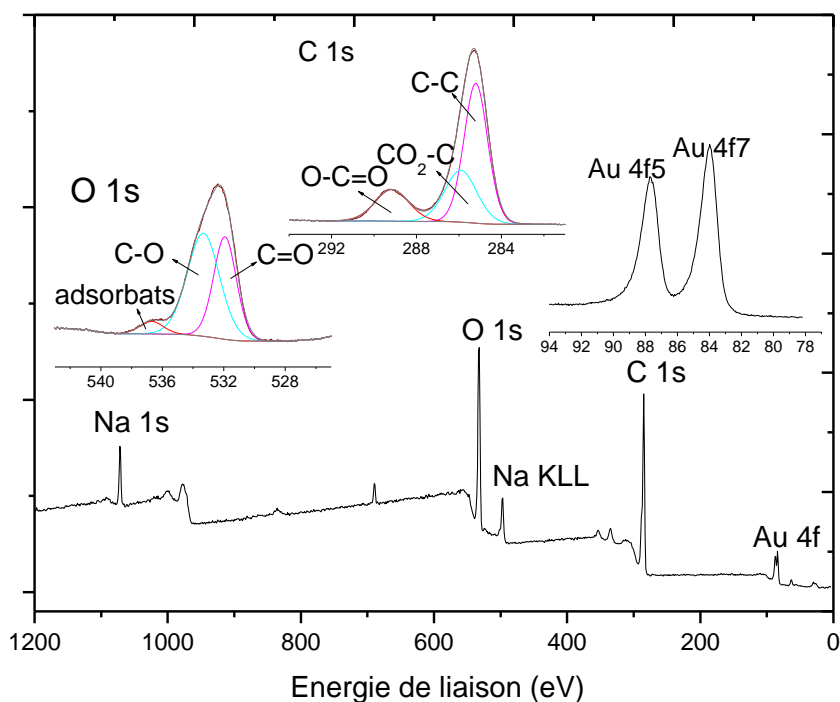


Figure IV.23 : Spectre XPS de NPs Au-PMAA-2

Le spectre des électrons 1s de l'oxygène peut être ajusté en trois courbes : le pic avec une énergie de liaison à 537 eV correspond à des adsorbats de l'air, celui à 533 eV correspond aux liaisons (C-O) et celui à 532 eV correspond aux liaisons (C=O).

Le spectre 1s du carbone est également ajusté en trois courbes : le pic à 289 eV correspond aux liaisons (O-C=O), le pic à 286 eV correspond lui aux liaisons (C-CO₂), et celui à 285 eV correspond aux liaisons de type (C-C).

Une analyse XPS a également été faite sur le résidu obtenu après ATG sous argon. La présence d'oxygène, de carbone, de sodium et d'or sur le spectre indique bien que la dégradation était incomplète. De plus, l'ajustement du spectre 1s du carbone se fait en quatre courbes et non trois comme précédemment : le pic supplémentaire à 284 eV correspond à un autre type de liaison carbone.

Le spectre XPS des NPs Au-PHEMA-PMAA en solution puis précipitées, est présenté sur la Figure IV.24. Le spectre indique la présence de sodium, de carbone, d'oxygène et d'or.

Le spectre des électrons 1s de l'oxygène peut être ajusté en quatre courbes : le pic avec une énergie de liaison à 537 eV correspond à des adsorbats de l'air, celui à 534 eV correspond

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères aux liaisons (C-O-C), celui à 533 eV correspond aux liaisons (C-O) et celui à 531 eV correspond aux liaisons (C=O).

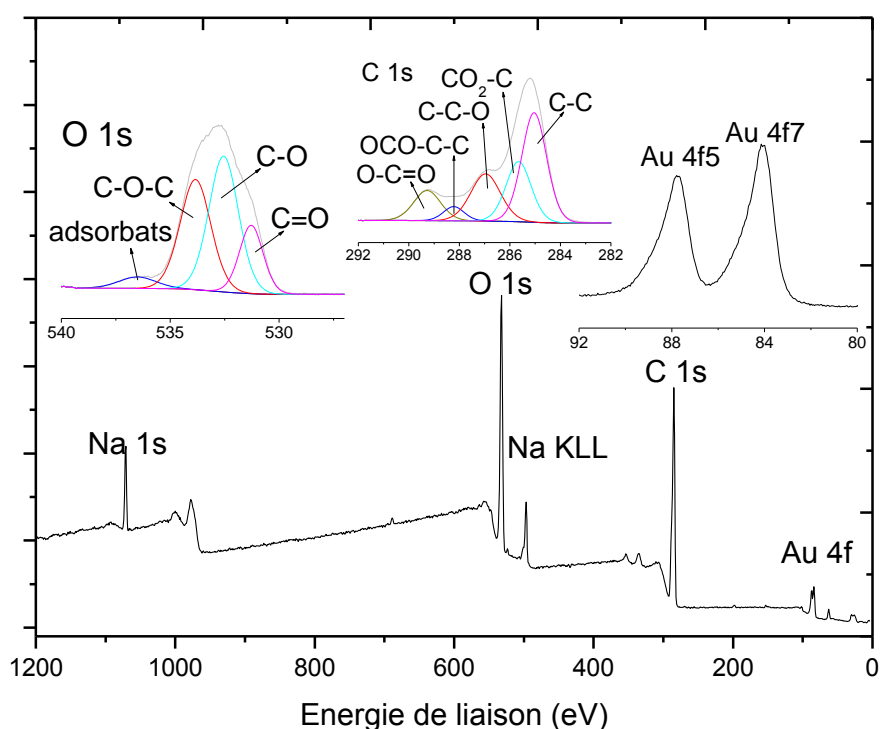


Figure IV.24 : Spectre XPS des NPs Au-PHEMA-PMAA

Ces pics sont différents de ceux trouvés pour l'Au-PMAA-2 car la présence du PHEMA modifie le nombre et le type de liaisons. En effet, il y a un nouveau type de liaison avec le PHEMA qui est la liaison de l'oxygène avec deux carbones. Les pics trouvés sont donc bien en accord avec la structure du polymère.

Le spectre des électrons 1s du carbone peut être ajusté en cinq courbes : le pic à 289 eV correspond aux liaisons (O-C=O), celui à 288 eV correspond aux liaisons (C-C-OCO), celui à 287 eV correspond aux liaisons (C-C-O), celui à 286 eV correspond lui aux liaisons (C-CO₂) et enfin celui à 285 eV correspond aux liaisons de type (C-C).

Ici, on trouve deux nouveaux types de liaisons qui sont associés aux liaisons carbones du PHEMA en α de l'ester avec un oxygène de l'ester et le carbone du CH₂ voisin. Le second type de liaison provient toujours du PHEMA et concerne le carbone en β de l'ester qui est en liaison avec l'oxygène du groupement hydroxyle et le carbone du CH₂ voisin.

En XPS, il est également possible de quantifier le pourcentage de concentration atomique d'un élément. Les nano-objets hybrides contiennent principalement du carbone et de

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères l'oxygène, néanmoins les proportions sont différentes de celles trouvées en ATG. De plus, la quantité de sodium par rapport à l'or semble excessive. L'XPS est une analyse de surface qui ne rend pas forcément compte de l'ensemble de l'échantillon.

% concentration atomique	Au	C	O	Na
Au-PMAA-2	1	68	28	3
Au-PHEMA-PMAA	1	66	29	4

Tableau IV.5 : Résumé des concentrations atomiques en % des différents éléments analysés en XPS

Pour connaître exactement la quantité d'or dans les échantillons (nécessaire pour les études de diffusion), on conduit des analyses ICP-MS. On connaît par ATG, la contribution d'inorganique (or et sodium) dans les échantillons, une quantification de l'or par analyse ICP-MS donnera à la fois la quantité d'or et par soustraction de l'ATG, la quantité de sodium. Les NPs d'or ont été préalablement dissoutes dans de l'eau régale puis la concentration en Au³⁺ a été mesurée.

	C _{nano-objets} (mg/mL)	C _{inorganique} (mg/mL)	C _{Au³⁺} mesurée (mg/mL)	% d'or	C _{Na} déduite (mg/mL)	% de Na
Au-PMAA-2	10,0	2,9	1,35	13,5 %	1,55	15,5 %
Au-PHEMA-PMAA	10,0	2,7	1,30	13,0 %	1,40	14,0 %

Tableau IV.6 : Résultats ICP-MS permettant de déterminer le pourcentage d'or et de sodium dans l'échantillon

Il y a environ 13 % d'or, 15% de sodium et 70% de polymère organique dans les NPs Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA, ce qui est plus en accord avec l'ATG.

On s'intéresse à présent à caractériser plus en détails le cœur d'or des nano-objets.

IV.3.2 Caractérisation du cœur métallique

IV.3.2.1 La microscopie électronique à transmission (TEM)

La microscopie électronique à transmission est une technique puissante, bien adaptée pour caractériser les NPs métalliques (taille, forme, degré d'agrégation). La partie métallique de la NP est surtout observée en TEM, grâce au numéro atomique élevé de l'or. La partie polymère est généralement dégradée sous le faisceau d'électrons.

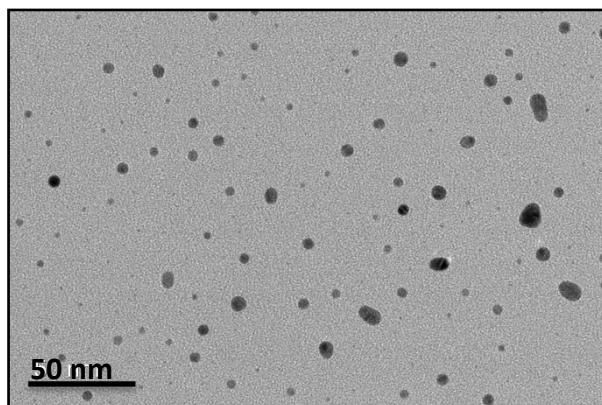


Figure IV.25 : Image TEM des NPs Au-PMAA-1

Les NPs Au-PMAA-1 à une concentration de 0,33 mg/mL observées sur la Figure IV.25 ne semblent pas agrégées mais la coloration différente de certaines NPs traduit une superposition de certaines. Cette technique basée sur l'évaporation de l'échantillon sur la grille ne rend pas compte de l'organisation des NPs en solution.

Des images en cryo-TEM ont donc également été prises pour observer les NPs directement dans la solution et éviter ainsi tout phénomène d'agrégation ou de superposition dû au séchage. Cette technique consiste à congeler de manière très rapide dans de l'éthane liquide à -160°C , les échantillons en solution. La cryo-microscopie permet de préserver la morphologie et la structure des objets « fragiles » et surtout de réduire les dommages causés par le faisceau d'irradiation qui empêche de voir l'échantillon dans son ensemble.

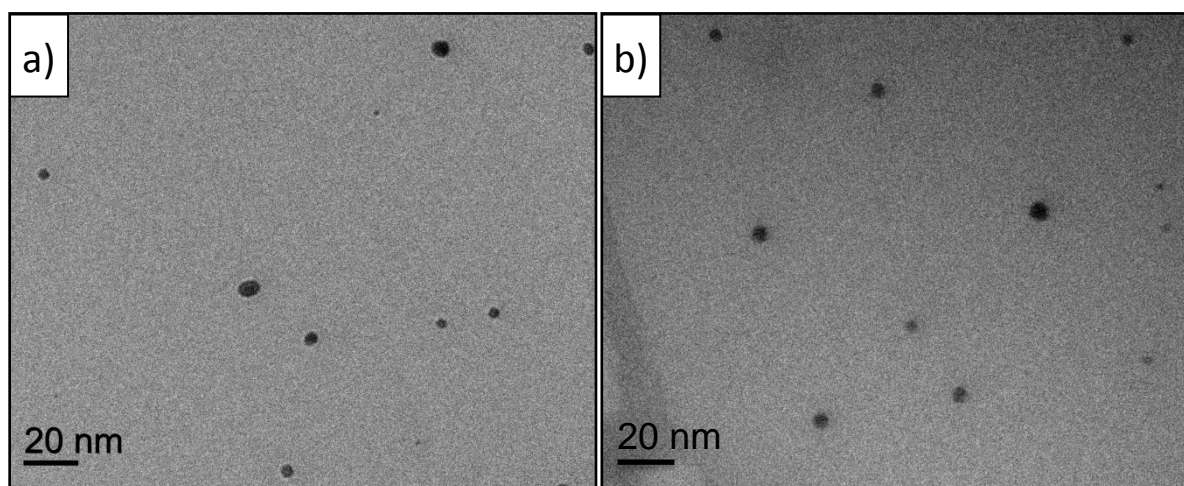


Figure IV.26 : Images cryo-TEM des NPs a) Au-PMAA-2 et b) Au-PHEMA-PMAA

Les échantillons observés ici ont une concentration de 5 mg/mL. Sur les clichés de microscopie ci-dessus, la concentration ne semble pas si élevée, on peut néanmoins

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères déterminer une taille du cœur métallique des NPs en analysant plusieurs clichés. Comme précédemment, les NPs sont bien séparées les unes des autres, sans agrégation. En cryo-TEM, on ne peut observer la couronne polymère dû à un manque de contraste.

Les clichés de microscopie montrent qu'il y a plusieurs familles de NPs sphériques. Sur la Figure IV.27, sont représentés les diagrammes de distribution en taille des NPs obtenus à l'aide du logiciel « ImageJ », de plusieurs clichés. Pour les deux systèmes, on peut voir que les NPs ont une taille inférieure à 10 nm. Pour les NPs Au-PMAA-2, il y a une majorité de NPs qui ont un diamètre entre 3 et 6 nm et les NPs Au-PHEMA-PMAA ont principalement des diamètres compris entre 4 et 6 nm.

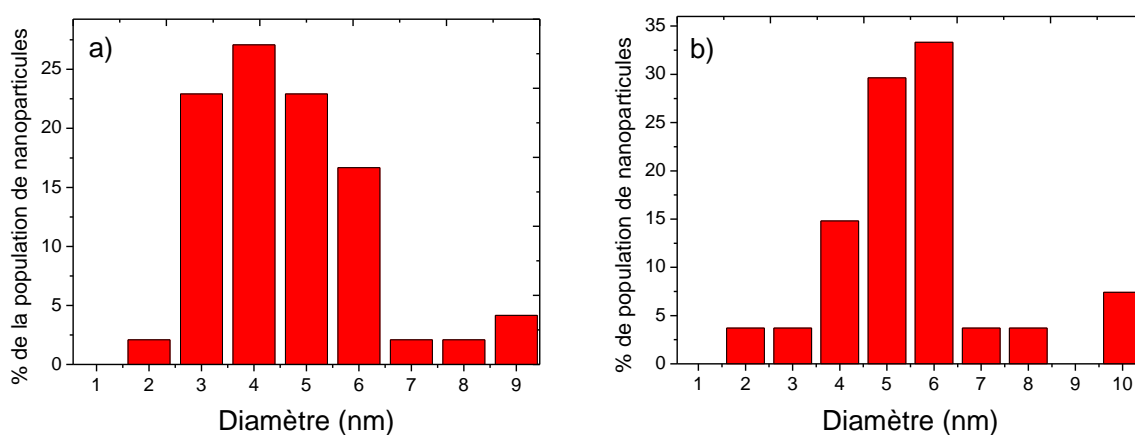


Figure IV.27 : Diagrammes de distribution de tailles des NPs a) Au-PMAA-2 et b) Au-PHEMA-PMAA

Il est difficile d'estimer une taille moyenne des NPs à partir des clichés de microscopie compte tenu de l'analyse par comptage. Pour déterminer cette valeur moyenne, une étude en diffusion de rayons X aux petits angles a été conduite.

IV.3.2.2 La diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)

Le SAXS permet de connaître la taille du cœur métallique des particules en solution. En SAXS, ce sont les électrons des éléments analysés qui vont interagir avec les rayons X. Or les polymères ont des densités électroniques beaucoup plus faibles que celle de l'or, c'est donc principalement ce dernier qui va diffuser.

Un faisceau de rayons X de longueur d'onde donnée est envoyé sur l'échantillon. L'intensité de diffusion $I(q)$ est mesurée en fonction du vecteur de diffusion q . Il est possible de regrouper sur une même courbe $I(q)$, des données acquises avec différentes valeurs de θ et de λ . Lors de nos mesures, la gamme de q choisie est comprise entre 0,03 et 3,0 \AA^{-1} . Les objets observables doivent avoir une taille comprise entre 0,3 et 30 \AA , $R \sim 1/q$. Afin d'obtenir

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

la courbe de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion, $I(q) = f(q)$, on procède à un regroupement radial des images 2D. Le signal est ensuite traité après soustraction de la contribution du solvant et de la contribution du « contenant », ici un capillaire en Kapton (film de polyimide). Pour des objets centrosymétriques, l'intensité diffusée peut s'exprimer sous la forme :

(IV-1)

$$I(q) = \Phi V_{\text{objet}} (\Delta\rho)^2 P(q) S(q)$$

L'intensité diffusée $I(q)$ est fonction de $\Delta\rho$ le facteur de contraste, de Φ la fraction volumique en objets diffusants, de V_{objet} le volume de l'objet diffusant, du facteur de forme $P(q)$ décrivant la forme de l'objet diffusant, et enfin du facteur de structure $S(q)$, décrivant les corrélations spatiales entre les centres des masses des objets. Ayant travaillé en solution suffisamment diluée (10 mg/mL), les interactions entre les objets peuvent être négligées donc le facteur de structure $S(q)$ est considéré comme égal à 1.

Pour pouvoir mesurer une intensité diffusée suffisamment significative, il est nécessaire d'avoir un contraste entre les objets diffusants et le solvant. La densité de longueur de diffusion, en SAXS, se calcule à partir de l'équation suivante :

(IV-2)

$$\rho_{\text{SAXS}} = \frac{n_e d \times N_A}{M} \times 28,2 \cdot 10^{-14}$$

où n_e le nombre d'électrons, d est la densité du composé en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, N_A le nombre d'Avogadro, M la masse molaire du composé en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et le facteur $28,2 \cdot 10^{-14}$ correspond à la longueur de diffusion de l'électron (en cm).

On peut ainsi calculer les densités de longueurs de diffusion du solvant et des objets considérés et donc le contraste :

Composé	$\rho_{\text{SAXS}} (10^{10} \text{ cm}^{-2})$
H ₂ O	9,4
Au	124,0
PMAA hydrogéné	9,2
PMAA-PHEMA hydrogéné	9,5

Tableau IV.7: Densités de longueur de diffusion ρ des composés utilisés

En se plaçant dans l'eau, le contraste du polymère par rapport au solvant est presque nul et le signal de diffusion vient principalement du cœur d'or.

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères
 En TEM, les NPs observées ont une forme sphérique. On utilise donc l'expression du facteur de forme d'une sphère pour ajuster les intensités de diffusion expérimentales :

(IV-3)

$$P(q) = \int f(r) V_{objet}^2(r) F^2(q, r) dr$$

(IV-4)

$$F^2_{sphère}(q, R) = \left[3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right]^2$$

Avec R le rayon de la sphère et f(R) la distribution gaussienne en rayon.

Les NPs Au-PMAA-2 sont solubilisées dans l'eau à une concentration de 10 mg/mL puis observées en SAXS. Le signal de l'intensité diffusée par les NPs en fonction du vecteur de diffusion q est représenté sur la Figure IV.28.

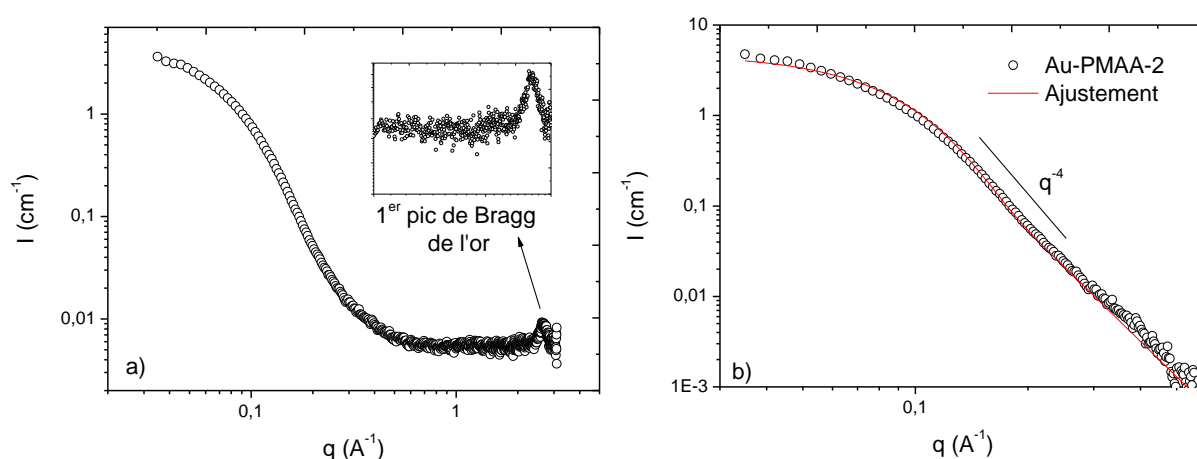


Figure IV.28 : Spectre SAXS des NPs Au-PMAA-2 à 10 mg/mL dans l'eau a) avant et b) après soustraction du bruit de fond et la courbe d'ajustement

Le spectre de l'intensité diffusée en fonction de q nous confirme que les objets ont bien une forme sphérique. En effet, la décroissance en q^{-4} de la courbe est typique d'une interface nette (comme dans le cas des objets sphériques). A $q = 2,66 \text{ \AA}^{-1}$, on trouve le pic de Bragg de l'or. L'absence d'oscillations caractéristiques du facteur de forme de sphères monodisperses aux moyens et grands q indique que les nanoparticules sont polydisperses. L'ajustement par un modèle de distribution gaussienne de sphères donne un rayon de $15 \pm 7 \text{ \AA}$. Si l'on compare cette taille avec celles des NPs Au-PMAA-2 du diagramme de la Figure IV.27.a

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères obtenues à partir des clichés de TEM, on retrouve le facteur de polydispersité mais il semble que la microscopie surestime la taille des NPs par rapport au SAXS.

De la même manière, les NPs Au-PHEMA-PMAA ont été observées en SAXS pour une concentration de 10 mg/mL dans l'eau. Le spectre obtenu est représenté sur la Figure IV.29. La courbe présente également une décroissance en q^{-4} sans oscillations aux moyens et grands q , signe d'une polydispersité. L'ajustement de la courbe d'intensité diffusée nous donne une valeur de rayon de $18 \pm 9 \text{ \AA}$.

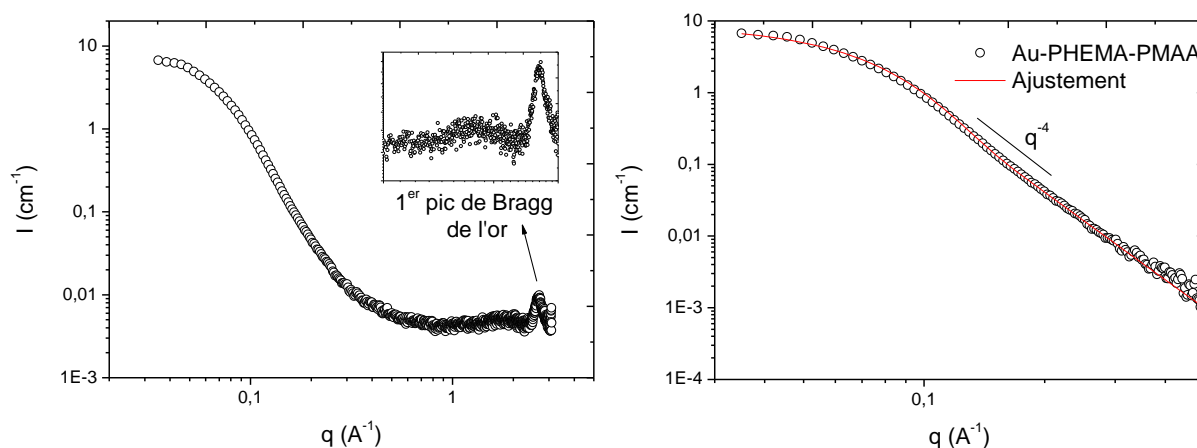


Figure IV.29 : Spectre SAXS de l'Au-PHEMA-PMAA à 10 mg/mL dans l'eau a) avant et b) après soustraction du bruit de fond et la courbe d'ajustement

Cette taille est également légèrement inférieure à la tendance trouvée sur les clichés de microscopie. En effet, la microscopie présente une majorité de NPs avec un rayon supérieur à celui trouvé en SAXS. Cette différence peut s'expliquer par l'incertitude liée à la détermination de la taille des NPs par comptage.

Les techniques de diffusion sont des outils puissants qui offrent l'avantage de pouvoir étudier les objets en solution. Par conséquent, la taille du cœur métallique d'or considéré par la suite sera celle déterminée en SAXS.

Néanmoins, pour vérifier la valeur obtenue par ajustement des courbes, un autre paramètre indépendant de la taille ou de la forme des objets a été déterminé : c'est la surface spécifique totale. Dans la région de Porod, on détermine la surface spécifique totale de toutes les NPs d'or par unité de volume.

Aux grandes valeurs de vecteurs de diffusion, il est possible d'observer l'interface des objets. Si le vecteur de diffusion est plus large que les courbures caractéristiques des interfaces, les

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères interfaces apparaissent plates et les intensités sont proportionnelles à la surface spécifique totale Σ , indépendamment de la forme des deux phases. La limite de Porod dit que pour une interface nette, l'intensité décroît en q^{-4} aux grands q :

$$\Sigma = \frac{1}{2\pi(\Delta\rho)^2} \lim_{q \rightarrow \infty} I(q)q^4 \quad (\text{IV-5})$$

Avec Σ la surface spécifique totale exprimée comme la surface d'une interface en cm^2/cm^3 .

En traçant $I(q)q^4$ en fonction de q , on détermine la limite aux grands q . On peut ainsi calculer la valeur de Σ pour chaque NP d'or greffée de polymères.

Pour les NPs Au-PMAA-2, la surface spécifique totale est de 1250 cm^2 par cm^3 de solution et pour les NPs Au-PHEMA-PMAA, elle, est de 813 cm^2 par cm^3 . On peut évaluer le rayon moyen d'une particule à partir de cette surface spécifique totale et du volume d'un gramme d'or dans un cm^3 de la solution. Ainsi, on trouve un rayon de 17 \AA pour les NPs Au-PMAA-2 et de 25 \AA pour les NPs Au-PHEMA-PMAA. Ces valeurs sont légèrement plus élevées que celles trouvées par l'ajustement avec un modèle de sphères dures polydisperses mais restent dans les barres d'erreurs.

Dans cette partie, le cœur des nano-objets a donc été caractérisé par différentes méthodes. Le TEM a mis en évidence la non-agrégation des NPs tandis que le SAXS, nous a permis de déterminer une taille de NPs plus précisément. Une taille de $15 \pm 7 \text{ \AA}$ a été déterminée pour les NPs Au-PMAA-2 et une taille de $18 \pm 9 \text{ \AA}$ pour les NPs Au-PHEMA-PMAA.

La technique de diffusion de neutron aux petits angles va nous permettre d'évaluer cette fois la taille et la forme de l'ensemble du nano-objet.

IV.3.3 Caractérisation des nano-objets hybrides par diffusion de neutron aux petits angles (DNPA)

De la diffusion dynamique de la lumière (DLS) peut être faite avec ces nano-objets, mais la présence de l'or dont les propriétés optiques sont particulières, conduit à des résultats peu fiables⁴⁶.

Une autre technique de diffusion a été utilisée pour connaître la taille et la structure des NPs greffées de polymères ainsi que la longueur et la densité de greffage des chaînes : la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA).

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères
 Les mesures ont été faites au Laboratoire Léon Brillouin (LLB) sur le spectromètre PACE.

Nous avons travaillé aux mêmes concentrations qu'en SAXS donc le facteur de structure $S(q)$ est toujours considéré égal à 1. Plusieurs facteurs de forme ont été utilisés pour décrire les objets étudiés.

Le polymère étant hydrogéné, pour avoir un contraste maximum, il faut travailler en solvant deutéré.

Composé	$P_{DNPA} (10^{10} \text{ cm}^{-2})$
D ₂ O	6,39
H ₂ O	-0,56
Au	4,50
PMAA hydrogéné	1,10
PMAA-PHEMA hydrogéné	1,37

Tableau IV.8 : Densités de longueur de diffusion ρ des composés utilisés

La contribution de l'or (très petit objet) va être négligeable dans 100 % de D₂O. Nous avons d'ailleurs vérifié que l'or ne diffusait pas en ajustant le contraste en solvant majoritairement hydrogéné (afin d'« éteindre » la contribution de la couronne). Aucun signal d'intensité n'a été détecté dans ces conditions.

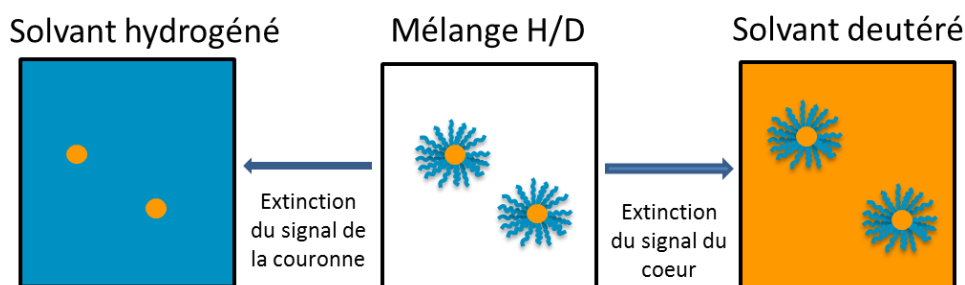


Figure IV.30 : Illustration de la technique de variation de contraste dans le cas de NPs greffées de polymère

Les NPs Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA sont solubilisées dans du D₂O à une concentration de 10 mg/mL puis observées en DNPA. Le signal de l'intensité diffusée de la couronne en fonction du vecteur de diffusion q est représenté sur la Figure IV.31.

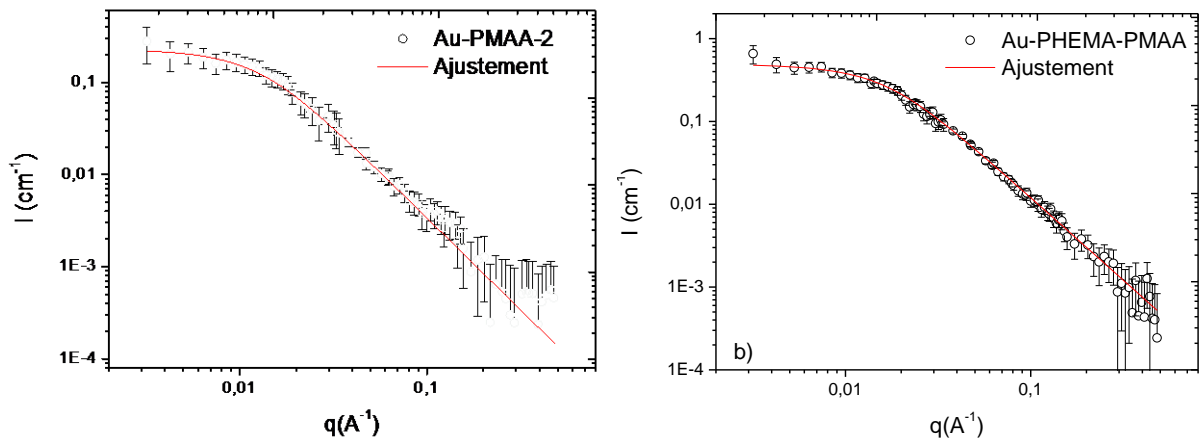


Figure IV.31 : Spectres DNPA a) de l'Au-PMAA-2 à 10 mg/mL dans 100 % de D₂O et b) de l'Au-PHEMA-PMAA à 10 mg/mL dans 100% de D₂O et leur courbe ajustée

Les signaux obtenus sont très similaires et présentent un plateau visible aux petites valeurs de q , ce qui signifie que les objets sont de taille finie.

Pour déterminer la taille de ces objets, on utilise d'abord l'approximation de Guinier. Lorsque $qR_g < 1$ c'est-à-dire lorsque q^{-1} est très grand par rapport à la taille de l'objet, le facteur de forme ne dépend plus de la forme de l'objet mais seulement de son rayon de giration : c'est le domaine de Guinier où le facteur de forme devient :

$$P(q) \approx e^{-\frac{q^2 R_g^2}{3}} \quad (\text{IV-6})$$

En traçant $\ln(I) = f(q^2)$, il est possible de déterminer le rayon de giration des objets diffusants qui est proportionnel à la pente à l'origine de la courbe (Figure IV.32). Le rayon de giration est égal à la racine carré de trois fois la pente.

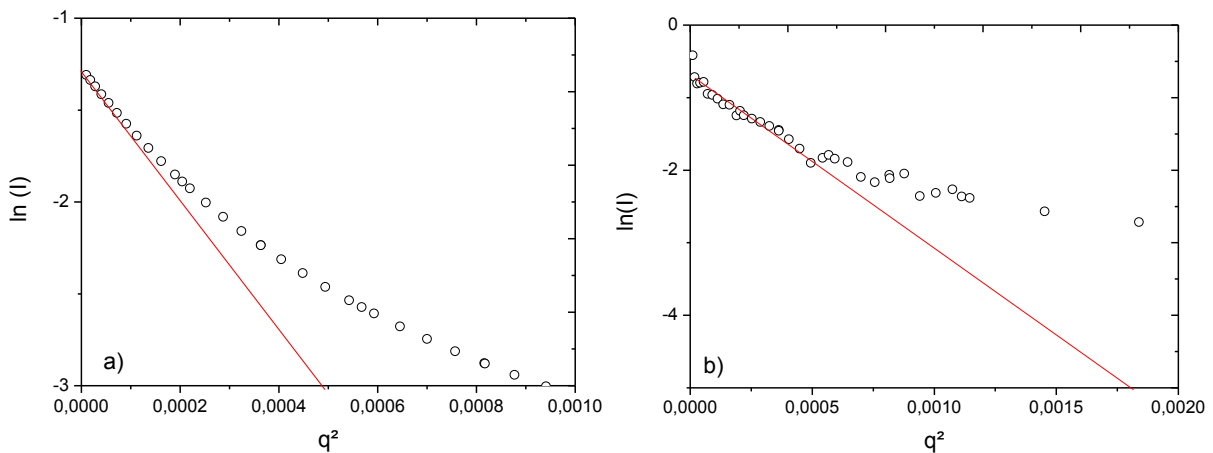


Figure IV.32 : Représentation de Guinier des NPs a) Au-PMAA-2 et b) Au-PHEMA-PMAA

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères
 Les valeurs calculées de R_g à partir de cette représentation sont de $102 \pm 2 \text{ \AA}$ pour les NPs Au-PMAA-2 et $84 \pm 1 \text{ \AA}$ pour les NPs Au-PHEMA-PMAA.

Dans le domaine des q intermédiaires, la valeur de l'exposant de q donne une indication sur la géométrie des objets. Si la décroissance est en q^{-4} , l'objet a une interface nette comme dans le cas d'une sphère alors que si la décroissance est en q^{-2} , comme dans le cas de nos spectres ici, il s'agit d'une chaîne gaussienne (chaîne de polymère en solution). Les signaux sont donc ajustés par un modèle de Debye dont le facteur de forme s'écrit :

$$P_{\text{chaîne}}(q, R_g) = \frac{2 (e^{-q^2 R_g^2} - 1 + q^2 R_g^2)}{(q^2 R_g^2)^2} \quad \text{(IV-7)}$$

où R_g représente le rayon de giration d'une chaîne gaussienne de polymère. Ce modèle de Debye est un modèle simplifié car il ne tient pas compte du greffage. Les signaux obtenus puis ajustés sont représentés sur la Figure IV.31. La valeur de R_g déterminée est de $120 \pm 3 \text{ \AA}$ pour les NPs Au-PMAA-2 et de $90 \pm 1 \text{ \AA}$ pour les NPs Au-PHEMA-PMAA. Ces valeurs sont proches de celles calculées par le modèle de Guinier et valident l'utilisation du modèle de Debye.

Des ajustements ont également été faits avec un modèle plus complexe, le modèle hairy-sphere (voir chapitre II), qui rend compte d'une sphère dure greffée de chaînes gaussiennes. Cependant, bien que la courbe d'ajustement se superpose très bien à la courbe expérimentale, les paramètres déterminés suite à cet ajustement (rayon du cœur, rayon de giration des chaînes et nombre de chaînes par particule) sont aberrants avec pour certains des valeurs négatives. Ce modèle est valable pour une nanoparticule dont le cœur est suffisamment gros. Un autre modèle dit d'étoile⁴⁷ où la taille du cœur est petite a également été utilisé. De nouveau, il est possible de faire des ajustements qui se superposent à la courbe expérimentale mais les valeurs obtenues sont aberrantes.

En DNPA, il est également possible de calculer la masse des objets diffusants M_w à partir d'études en concentration. Cette masse apparente se détermine par la mesure de l'intensité diffusée des objets à différentes concentrations. Comme précédemment, ces concentrations doivent être suffisamment faibles pour que le facteur de structure soit considéré égal à 1. Pour chaque concentration, la valeur de l'intensité diffusée à $q=0$ est extrapolée pour calculer la masse apparente à partir de l'expression suivante :

(IV-8)

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{I_0}{c} \right) = K^2 M (1 - 2MA_2c + \dots) \text{ avec } K^2 = \left(\frac{b_1 - b_0 \frac{v_1}{v_0}}{m_1} \right)$$

Avec I_0 l'intensité de diffusion à $q = 0$ de l'objet diffusant de masse M , de longueur de diffusion b , de volume spécifique v , à la concentration c dans un solvant de longueur de diffusion b_0 et de volume spécifique v_0 . L'objet diffusant est un polymère composée de N unités monomères de longueur de diffusion b_1 , de masse m_1 et de volume spécifique v_1 avec $M = Nm_1$, $v = v_1$ et $b = Nb_1$. A_2 est le second coefficient de viriel qui traduit les interactions entre objets.

Après avoir calculé K^2 pour chaque concentration, on peut déduire la valeur de la M_{app} à partir de l'équation (IV-8) :

(IV-9)

$$M_{app} = \frac{I_0}{K^2 c}$$

Pour les NPs Au-PMAA-2, la valeur trouvée pour la masse de la couronne de polymère est d'environ 21000 g/mol. Si on divise par la masse d'une chaîne de polymère, on détermine la densité de greffage de chaînes par NP. Ici, cette valeur est de 4,6 chaînes par NP. Pour les NPs Au-PHEMA-PMAA, la valeur trouvée pour la masse de la couronne de polymère est d'environ 21850 g/mol, ce qui équivaut à 4,4 chaînes par NP.

	I_0 (cm ⁻¹)	Rg (Å)	M_{app} (g/mol)	$M_{nchaîne}$ (g/mol)	$d_{greffage}$
Au-PMAA-2	0,53 ± 0,02	120 ± 3	21000 ± 800	4600	4,6 ± 0,2
Au-PHEMA-PMAA	0,49 ± 0,01	90 ± 1	21850 ± 450	5000	4,4 ± 0,1

Tableau IV.9 : Valeurs estimées d' I_0 , Rg, M_{app} et les $d_{greffage}$ déduites pour les NPs

Il est possible de déterminer une densité moyenne de greffage par nm² à partir du rayon estimée en SAXS et la densité de greffage par NP estimée en DNPA : 0,16 chaînes par nm² pour les NPs Au-PMAA-2 et 0,11 chaînes par nm² pour les NPs Au-PHEMA-PMAA. Ces densités sont bien dans l'ordre de grandeur des valeurs trouvées dans la littérature¹⁴⁻¹⁵ qui sont inférieures à 1 chaîne/nm².

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères
 Ces données sont comparées aux densités de greffage calculées à partir des valeurs mesurées en ATG. A partir du ratio or sur polymère (déterminé en ATG) et de la taille des NPs d'or, on peut estimer une densité de greffage.

Chaînes par nm ²	d _{greffage}	d _{greffage}
	ATG	DNPA
Au-PMAA-2	5,5	0,16
Au-PHEMA-PMAA	7,7	0,11

Tableau IV.10 : Densités de greffage estimées en ATG et en DNPA

Le Tableau IV.10 présente la non-concordance entre les valeurs d'ATG et celles de DNPA. Les valeurs calculées en ATG sont aberrantes car elles tiennent compte de tout le polymère présent dans la solution alors que la DNPA ne voit que le polymère greffé sur la NP. Ce calcul permet de mettre en évidence la présence de polymère libre en solution. Sa présence est un paramètre important dont il faudra tenir compte pour la suite des études.

Suite à l'analyse et la caractérisation fine des nano-objets en solution, nous avons aussi étudié leur toxicité vis-à-vis de cellules. Ces mesures sont indispensables pour des applications dans le domaine biomédical.

IV.4 Tests de cytotoxicité *in vitro*

La cytotoxicité des NPs greffées de polymères a été évaluée par des tests MTT. De même que précédemment (voir chapitres II et III), ces tests sont réalisés sur une lignée cellulaire d'une souris mâle de type fibroblastes (lignée L929). L'activité mitochondriale des cellules est suivie par spectrophotométrie à 570 nm.

La toxicité des NPs Au-PMAA-2 a été évaluée à différentes concentrations massiques (0 à 1000 µg/mL). La Figure IV.33 présente l'activité mitochondriale (indicateur indirect de la viabilité cellulaire) des cellules L929 incubées pendant 48 h avec ces différentes concentrations d'Au-PMAA-2.

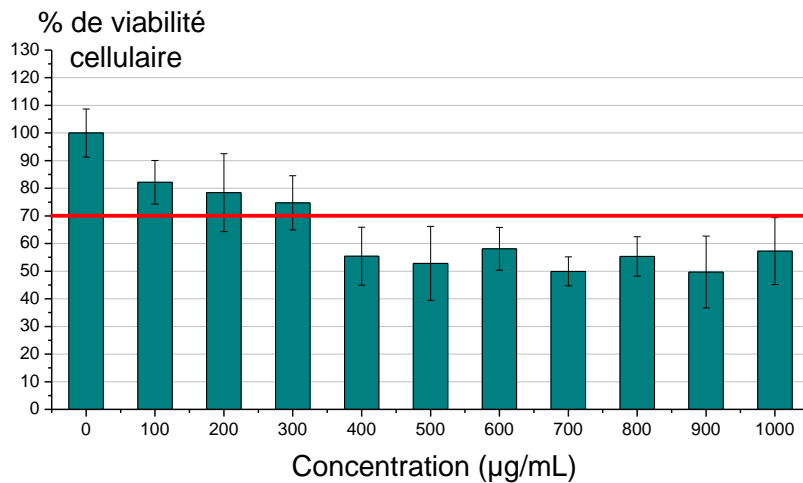


Figure IV.33 : Viabilité des cellules (en %) en fonction de la concentration de NPs Au-PMAA-2 (test MTT)

Les cellules incubées avec des concentrations en NPs égales ou supérieures à 400 µg/mL montrent une viabilité cellulaire à la limite du seuil de cytotoxicité (70 %) compte-tenu des barres d'erreurs. De plus, cette toxicité semble stagner à partir de cette concentration (entre 50 et 60 % de viabilité). Pour les concentrations inférieures à 400 µg/mL, la viabilité est supérieure à 70 %. Les NPs d' Au-PMAA-2 ne montrent de cytotoxicité qu'à partir de 400 µg/mL.

La toxicité des NPs Au-PHEMA-PMAA a également été évaluée à différentes concentrations massiques (0 à 1000 µg/mL).

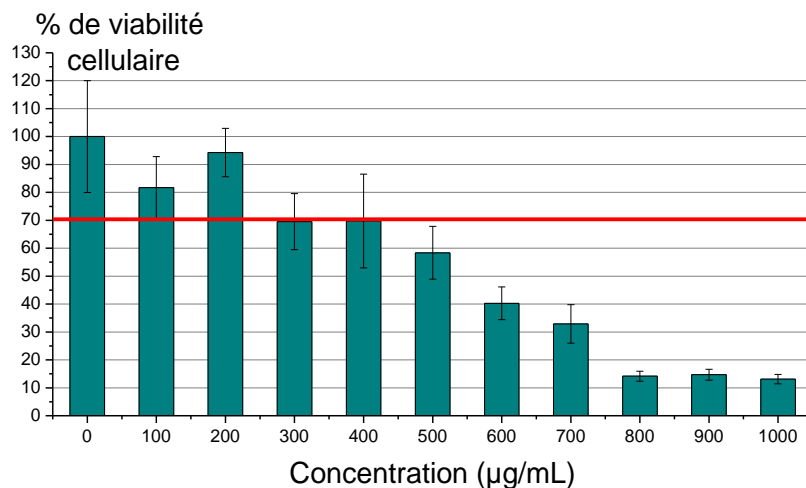


Figure IV.34 : Viabilité des cellules (en %) en fonction de la concentration de NPs Au-PHEMA-PMAA (test MTT)

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

La Figure IV.34 présente l'activité mitochondriale des cellules L929 incubées pendant 48h avec différentes concentrations d'Au-PHEMA-PMAA. Ici, la limite du seuil de cytotoxicité n'est atteinte qu'à partir de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mais la viabilité des cellules diminuent fortement ensuite avec l'augmentation de la concentration. En-dessous de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, on peut considérer que les NPs Au-PHEMA-PMAA ne sont pas cytotoxiques.

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, lors des études des tests de radiosensibilisation *in vitro* de NPs, la concentration utilisée est en unité molaire ou atomique. Nous avons choisi de comparer les résultats obtenus avec des études travaillant en concentration massique pour éviter toute erreur. Ces premières études préliminaires de cytotoxicité montrent que les NPs d'or greffées de polymères ne sont cytotoxiques qu'à partir de concentration de l'ordre de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dans la littérature, il n'y a pas d'essais faits dans les mêmes conditions (lignée cellulaire, coating, et gamme de concentration). Néanmoins, des NPs d'or coatées avec des molécules extraites de fruits ont été incubées avec les mêmes cellules et n'ont pas montré de cytotoxicité dans la gamme de concentration étudiée (0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)⁴⁸. Dans cette gamme de concentration, la présence de polymères n'induit pas de toxicité. Peu de travaux montrent la toxicité des NPs à des concentrations au-delà de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et nous n'avons pas trouvé de résultats impliquant la cytotoxicité de NPs d'or sur une lignée cellulaire L929⁴⁹. Kim et coll⁵⁰. ont étudié la cytotoxicité de NPs d'or greffées de PEG sur une lignée cellulaire HepG2 issue d'un hépatocarcinome d'origine humaine. Les résultats ont montré que les NPs n'étaient pas toxiques pour des concentrations allant jusqu'à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (90 % de viabilité cellulaire). Dans notre cas, à de telles concentrations, les NPs affichent une toxicité faible dans le cas des NPs Au-PMAA-2 (60 % de viabilité cellulaire) et une toxicité importante dans le cas des NPs Au-PHEMA-PMAA (15 % de viabilité cellulaire). Il est difficile de comparer ces résultats qui n'ont pas été faits sur la même lignée cellulaire, avec en outre l'utilisation de cellules cancéreuses dans l'un des deux cas. De plus, le PEG est connu pour sa biocompatibilité supérieure aux autres polymères.

Les NPs d'or greffées de polymère et de principe actif (Au-PMAA-DOX) ont également été mises en contact avec des cellules L929 pour évaluer leur cytotoxicité à différentes concentrations massiques (0 à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

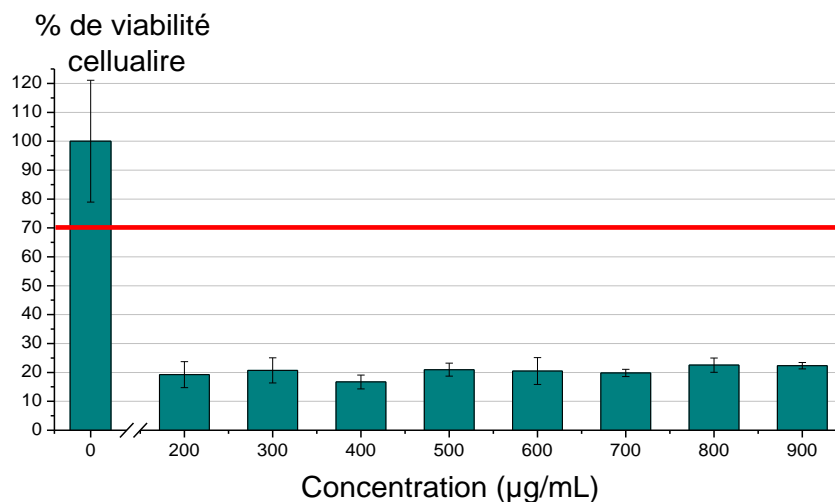


Figure IV.35 : Viabilité des cellules (en %) en fonction de la concentration de NPs Au-PMAA-DOX (test MTT)

Sur la Figure IV.35, on observe que de 200 à 900 µg/mL, le pourcentage de viabilité cellulaire n'excède pas 20 %. Ces NPs sont bien plus toxiques que les précédentes. Amjadi et coll⁵¹. ont étudié la cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules L929 avec des concentrations allant de 10 ng/mL à 1 mg/mL. Il s'avère que la doxorubicine est cytotoxique dès 10 ng/mL avec un pourcentage de viabilité cellulaire d'environ 65 %. Sur les NPs Au-PMAA-DOX, la doxorubicine est présente à 2,5 %. On estime donc que la gamme de concentration étudiée ramenée à celle de la DOX est comprise entre 5 et 22,5 µg/mL. Amjadi et coll. ont trouvé que pour 10 µg/mL, le pourcentage de viabilité cellulaire s'élève à environ 17 %. Dans le cas des NPs, Au-PMAA-DOX, pour cette concentration de DOX, celui-ci s'élève également à 20 %. En revanche, la cytotoxicité des NPs est la même pour des concentrations comprises entre 200 et 900 µg/mL, alors qu'avec la DOX seule, le pourcentage de viabilité cellulaire chute avec l'augmentation de la concentration (de 10 ng/mL à 1mg/mL).

Un second test a été fait sur ces NPs qui rend compte de l'intégrité membranaire et donc de la cytotoxicité des NPs directement : le test LDH (lactate déshydrogénase). La LDH est une enzyme cytosolique présente dans de nombreux types de cellules. Lorsque ces cellules sont endommagées, la LDH passe en milieu extracellulaire. Cette enzyme catalyse alors la conversion du lactate en pyruvate grâce à la présence de NAD⁺ (Nicotinamide adénine dinucléotide) qui est une coenzyme d'oxydoréduction présente dans toutes les cellules vivantes. Le NADH formé par réduction du NAD⁺ va à son tour réduire un sel de tétrazolium (chlorure de 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-phényl-2H-tétrazolium ou INT) en un produit formazan rouge qui peut être mesuré à 490 nm. La quantité de formazan formée est

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères directement proportionnelle à la quantité de LDH libérée dans le milieu. Une augmentation du niveau de LDH extracellulaire indique une perméabilisation de la membrane cellulaire, et donc une cytotoxicité.

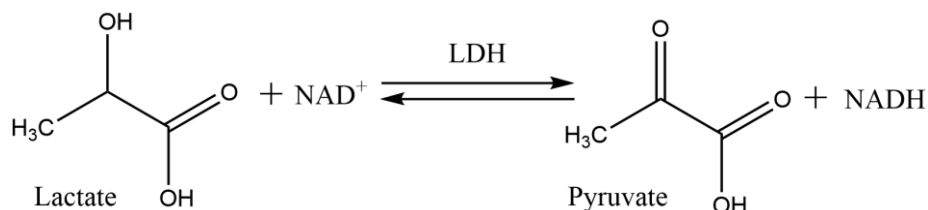


Figure IV.36 : Conversion du lactate en pyruvate par réduction de NAD^+ en NADH

Ce second test a été fait dans les mêmes conditions que le test MTT. Le protocole du test LDH est développé en Annexe 1.

La limite du seuil de cytotoxicité étant fixée à 70 % de viabilité cellulaire lors des tests MTT, on considérera, pour ces tests, les échantillons cytotoxiques lorsque le pourcentage de cytotoxicité sera supérieur à 30 %.

La cytotoxicité des NPs Au-PMAA-DOX a été évaluée à différentes concentrations massiques (0 à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) par ce test.

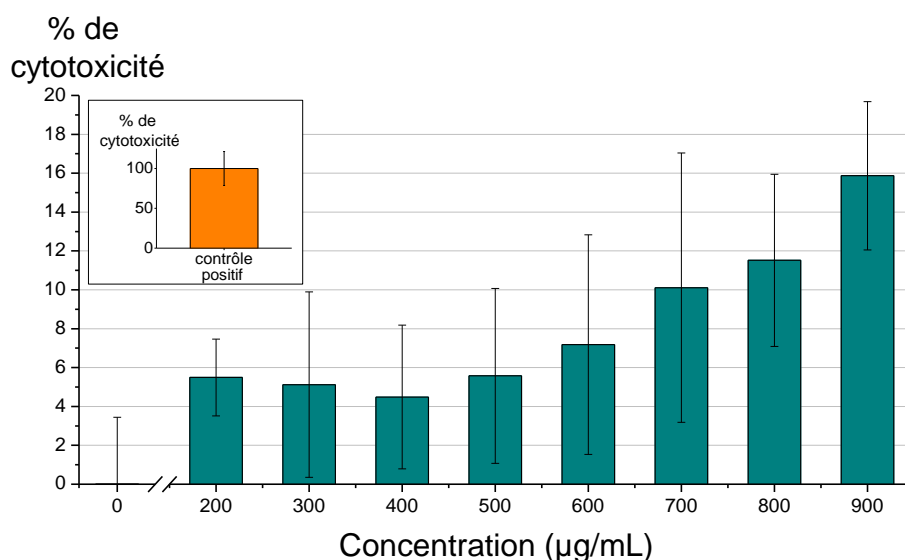


Figure IV.37 : Cytotoxicité (en %) en fonction de la concentration de NPs Au-PMAA-DOX (test LDH)

La toxicité des cellules L929 en présence de NPs Au-PMAA-DOX augmente progressivement avec la concentration. Néanmoins, ce pourcentage n'est pas très élevé. En effet, même à

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

900 µg/mL, le pourcentage de cytotoxicité est de 16 % donc en dessous du seuil fixé à 30 %. Ici, les tests LDH indiquent une cytotoxicité moins importante que celle indiquée par les tests MTT. Le test LDH est lié directement à la toxicité sur les cellules *via* la mesure de la destruction de la membrane de la cellule alors que le test MTT mesure l'activité mitochondriale qui n'est pas directement liée à la cytotoxicité. Cette différence de toxicité peut s'expliquer par le fait que la présence de DOX puisse altérer le bon fonctionnement des cellules (activité mitochondriale) sans pour autant entraîner sa mort cellulaire. Dans la littérature, les tests LDH sont réalisés en mesurant le relargage de LDH dans le milieu extracellulaire. Alyane et coll⁵². ont suivi le relargage de LDH lorsque des cellules H9c2, cellules cardiomyoblastes de rat, sont mises en contact avec différentes concentrations de DOX seules. Pour 10 µM en DOX, soit 5,8 µg/mL, il y a déjà 80 % de relargage de LDH (soit 80 % de cytotoxicité). Ce qui est beaucoup plus important que les taux que l'on observe avec les NPs Au-PMAA-DOX à la plus grande concentration (16 % à 22,5 µg/mL).

Les différents tests de cytotoxicité faits sur les différentes NPs d'or greffées de polymères ont montré que la toxicité des NPs était limitée jusqu'à une certaine concentration qui ne dépasse pas celle utilisée en général pour des applications *in vivo*.

IV.5 Conclusion

Au cours de ce chapitre, la synthèse de nano-objets de types NPs d'or greffées de polymère a été présentée. La méthode « grafting to » choisie ici consiste à polymériser différents types de ligands polymères et à les utiliser pour la synthèse des NPs d'or *in situ*. Les ligands polymères sont des polyméthacrylates obtenus par ATRP qui seront ensuite hydrolysés pour être soluble dans l'eau. Les NPs d'or greffées de polymères sont donc synthétisées par réaction de sels d'or en présence de ces ligands et d'un réducteur.

D'abord, la spectroscopie UV-Vis a confirmé la synthèse de NPs d'or sphériques, tandis que la RMN ^1H indique la présence de polymères à la surface de ces NPs. Différents types de nano-objets ont ainsi été obtenus par modification de la nature de la couronne polymère ou copolymère, en utilisant divers monomères (MAA, HEMA, PEGMA). On a également montré qu'un principe actif (la doxorubicine) pouvait être greffé sur ces objets.

Une caractérisation des nano-objets plus fine en trois étapes a ensuite été détaillée. La composition de la couronne de polymère a été analysée par XPS, ATG puis ICP-MS qui ont mis en évidence la présence de sodium et de polymère libre. Ensuite, la taille du cœur métallique a été étudiée par des méthodes de microscopie et de diffusion de rayons X. La microscopie a mis en évidence une non-agrégation du cœur métallique sphérique. Par SAXS, l'ajustement du signal par un modèle de sphère dure permet d'obtenir une taille moyenne. A partir de cette technique, il est également possible de déterminer la surface spécifique totale des NPs d'or en solution.

Enfin, la taille et la forme des nano-objets dans leur ensemble ont été caractérisées par diffusion de neutrons aux petits angles. Le signal obtenu est typique de celui de chaînes gaussiennes. Les rayons des objets estimés par l'approximation de Guinier et par un modèle de Debye (chaînes gaussiennes) sont d'environ 10 nm. Il est également possible d'estimer la masse apparente d'un nano-objet et ainsi de remonter au nombre de chaînes par NP. La densité de greffage par nm^2 calculée à partir des valeurs de SAXS et DNPA est de 0,16 chaînes/ nm^2 pour les NPs Au-PMAA-2 et de 0,11 chaînes/ nm^2 pour les NPs Au-PHEMA-PMAA. La taille et la structure de chaque NP sont représentées sur la Figure IV.38.

A partir de ces données et par comparaison à l'ATG, nous avons confirmé la présence de polymère libre en solution. Ce polymère en solution a certainement co-précipité avec les NPs durant les cycles de précipitation/centrifugation.

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

Enfin, des tests de cytotoxicités ont montré que les NPs ne présentent pas de toxicité envers les cellules pour des concentrations inférieures à 400 $\mu\text{g/mL}$. En présence de DOX, la toxicité augmente radicalement.

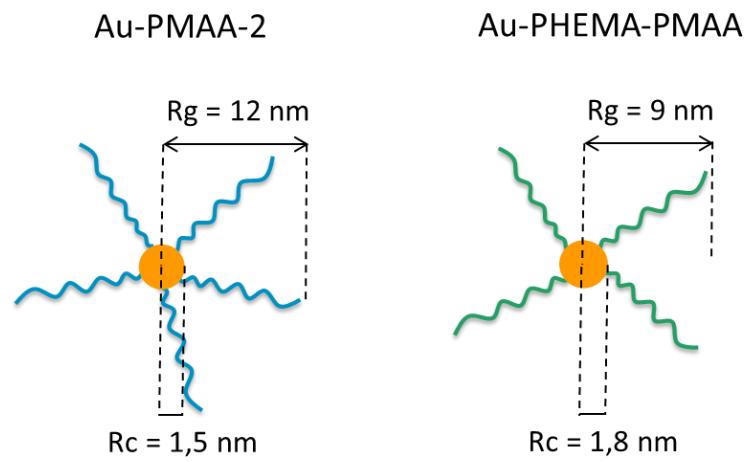


Figure IV.38 : Tailles et structures des NPs Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA

IV.6 Références

1. (a) Tao, P.; Li, Y.; Siegel, R. W.; Schadler, L. S., Transparent luminescent silicone nanocomposites filled with bimodal PDMS-brush-grafted CdSe quantum dots. *Journal of Materials Chemistry C* **2013**, *1* (1), 86-94; (b) Esteves, A. C. C.; Bombalski, L.; Trindade, T.; Matyjaszewski, K.; Barros-Timmons, A., Polymer Grafting from CdS Quantum Dots via AGET ATRP in Miniemulsion. *Small* **2007**, *3* (7), 1230-1236; (c) Trindade, T.; O'Brien, P.; Pickett, N. L., Nanocrystalline Semiconductors: Synthesis, Properties, and Perspectives. *Chemistry of Materials* **2001**, *13* (11), 3843-3858.
2. Daniel, M.-C.; Astruc, D., Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews* **2004**, *104* (1), 293-346.
3. (a) Gill, C. S.; Price, B. A.; Jones, C. W., Sulfonic acid-functionalized silica-coated magnetic nanoparticle catalysts. *Journal of Catalysis* **2007**, *251* (1), 145-152; (b) Wittmann, S.; Schätz, A.; Grass, R. N.; Stark, W. J.; Reiser, O., A Recyclable Nanoparticle-Supported Palladium Catalyst for the Hydroxycarbonylation of Aryl Halides in Water. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (10), 1867-1870.
4. Kir, O.; Binder, W. H., Living anionic surface initiated polymerization (LASIP) of isoprene from silica nano- and glass particles. *European Polymer Journal* **2013**, *49* (10), 3078-3088.
5. Ejaz, M.; Yamamoto, S.; Ohno, K.; Tsujii, Y.; Fukuda, T., Controlled Graft Polymerization of Methyl Methacrylate on Silicon Substrate by the Combined Use of the Langmuir-Blodgett and Atom Transfer Radical Polymerization Techniques. *Macromolecules* **1998**, *31* (17), 5934-5936.
6. (a) von Werne, T.; Patten, T. E., Preparation of Structurally Well-Defined Polymer-Nanoparticle Hybrids with Controlled/Living Radical Polymerizations. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (32), 7409-7410; (b) Huang, H.; Qu, J.; He, L., Amphiphilic silica/fluoropolymer nanoparticles: Synthesis, tem-responsive and surface properties as protein-resistance coatings. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2016**, *54* (3), 381-393.
7. Carrot, G.; Diamanti, S.; Manuszak, M.; Charleux, B.; Vairon, J. P., Atom transfer radical polymerization of n-butyl acrylate from silica nanoparticles. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2001**, *39* (24), 4294-4301.
8. (a) Krysiak, E.; Wypych-Puszkarcz, A.; Krysiak, K.; Nowaczyk, G.; Makrocka-Rydzys, M.; Jurga, S.; Ulanski, J., Core-shell system based on titanium dioxide with elevated value of dielectric permittivity: Synthesis and characterization. *Synthetic Metals* **2015**, *209*, 150-157; (b) Xiong, L.; Liang, H.; Wang, R.; Chen, L., A novel route for the synthesis of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) grafted titania nanoparticles via ATRP. *Journal of Polymer Research* **2010**, *18* (5), 1017-1021.
9. (a) Kanhakeaw, P.; Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Rutnakornpituk, M., Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization of Magnetite Nanoparticles with Statistical Poly(tert-butyl acrylate)-poly(poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate) Copolymers. *Journal of Nanomaterials* **2015**, *2015*, 10; (b) Ohno, K.; Mori, C.; Akashi, T.; Yoshida, S.; Tago, Y.; Tsujii, Y.; Tabata, Y., Fabrication of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging from Polymer-Brush-Afforded Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Prepared by Surface-Initiated Living Radical Polymerization. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (10), 3453-3462.
10. (a) Tan, L.; Liu, J.; Zhou, W.; Wei, J.; Peng, Z., A novel thermal and pH responsive drug delivery system based on ZnO@PNIPAM hybrid nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *45*,

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

524-529; (b) Jitaru, F.; Buruiana, T.; Hitruc, G.; Buruiana, E. C., Preparation and characterization of block copolymers containing cinnamate groups with end-capped ZnO. *Central European Journal of Chemistry* **2013**, *11* (9), 1492-1504.

11. (a) Gal, F.; Perez, H.; Noel, V.; Carrot, G., Water-soluble polymer-grafted platinum nanoparticles for the subsequent binding of enzymes. synthesis and SANS. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2012**, *50* (2), 289-296; (b) Carrot, G.; Gal, F.; Cremona, C.; Vinas, J.; Perez, H., Polymer-Grafted-Platinum Nanoparticles: From Three-Dimensional Small-Angle Neutron Scattering Study to Tunable Two-Dimensional Array Formation. *Langmuir* **2009**, *25* (1), 471-478.

12. Bach, L. G.; Islam, M. R.; Lee, D. C.; Lim, K. T., Poly(glycidyl methacrylate) grafted CdSe quantum dots by surface-initiated atom transfer radical polymerization: Novel synthesis, characterization, properties, and cytotoxicity studies. *Applied Surface Science* **2013**, *283*, 546-553.

13. Nuß, S.; Böttcher, H.; Wurm, H.; Hallensleben, M. L., Gold Nanoparticles with Covalently Attached Polymer Chains. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (21), 4016-4018.

14. Ohno, K.; Koh, K.-m.; Tsujii, Y.; Fukuda, T., Synthesis of Gold Nanoparticles Coated with Well-Defined, High-Density Polymer Brushes by Surface-Initiated Living Radical Polymerization. *Macromolecules* **2002**, *35* (24), 8989-8993.

15. Roth, P. J.; Theato, P., Versatile Synthesis of Functional Gold Nanoparticles: Grafting Polymers From and Onto. *Chemistry of Materials* **2008**, *20* (4), 1614-1621.

16. Kim, D. J.; Kang, S. M.; Kong, B.; Kim, W.-J.; Paik, H.-j.; Choi, H.; Choi, I. S., Formation of Thermoresponsive Gold Nanoparticle/PNIPAAm Hybrids by Surface-Initiated, Atom Transfer Radical Polymerization in Aqueous Media. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2005**, *206* (19), 1941-1946.

17. Li, D.; Cui, Y.; Wang, K.; He, Q.; Yan, X.; Li, J., Thermosensitive Nanostructures Comprising Gold Nanoparticles Grafted with Block Copolymers. *Advanced Functional Materials* **2007**, *17* (16), 3134-3140.

18. Mandal, T. K.; Fleming, M. S.; Walt, D. R., Preparation of Polymer Coated Gold Nanoparticles by Surface-Confined Living Radical Polymerization at Ambient Temperature. *Nano Letters* **2002**, *2* (1), 3-7.

19. Boyer, C.; Whittaker, M. R.; Luzon, M.; Davis, T. P., Design and Synthesis of Dual Thermoresponsive and Antifouling Hybrid Polymer/Gold Nanoparticles. *Macromolecules* **2009**, *42* (18), 6917-6926.

20. Jones, S. T.; Walsh-Korb, Z.; Barrow, S. J.; Henderson, S. L.; del Barrio, J.; Scherman, O. A., The Importance of Excess Poly(N-isopropylacrylamide) for the Aggregation of Poly(N-isopropylacrylamide)-Coated Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2016**, *10* (3), 3158-3165.

21. Zhu, M.-Q.; Wang, L.-Q.; Exarhos, G. J.; Li, A. D. Q., Thermosensitive Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (9), 2656-2657.

22. Yusa, S.-i.; Fukuda, K.; Yamamoto, T.; Iwasaki, Y.; Watanabe, A.; Akiyoshi, K.; Morishima, Y., Salt Effect on the Heat-Induced Association Behavior of Gold Nanoparticles Coated with Poly(N-isopropylacrylamide) Prepared via Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Radical Polymerization. *Langmuir* **2007**, *23* (26), 12842-12848.

23. Zhou, D.; Yang, L.; Yang, R.; Song, W.; Peng, S.; Wang, Y., Functionalized gold nanoparticles as additive to form polymer/metal composite matrix for improved DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Talanta* **2009**, *80* (1), 195-201.

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

24. Luo, S.; Xu, J.; Zhang, Y.; Liu, S.; Wu, C., Double Hydrophilic Block Copolymer Monolayer Protected Hybrid Gold Nanoparticles and Their Shell Cross-Linking. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (47), 22159-22166.
25. Han, D.-H.; Pan, C.-Y., Synthesis and characterization of water-soluble gold nanoparticles stabilized by comb-shaped copolymers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, *46* (1), 341-352.
26. Lowe, A. B.; Sumerlin, B. S.; Donovan, M. S.; McCormick, C. L., Facile Preparation of Transition Metal Nanoparticles Stabilized by Well-Defined (Co)polymers Synthesized via Aqueous Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (39), 11562-11563.
27. Shan, J.; Nuopponen, M.; Jiang, H.; Viitala, T.; Kauppinen, E.; Kontturi, K.; Tenhu, H., Amphiphilic Gold Nanoparticles Grafted with Poly(N-isopropylacrylamide) and Polystyrene. *Macromolecules* **2005**, *38* (7), 2918-2926.
28. Wang, Z.-L.; Xu, J.-T.; Du, B.-Y.; Fan, Z.-Q., Facile fabrication of amphiphilic gold nanoparticles with V-shaped brushes from block copolymers with a trithiocarbonate group as the junction. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, *360* (2), 350-354.
29. Li, J. B.; Zhang, S. J.; Liang, J.; Wu, W. L.; Guo, J. W.; Zhou, H. Y., One-dimensional assembly of polymeric ionic liquid capped gold nanoparticles driven by electrostatic dipole interaction. *RSC Advances* **2015**, *5* (11), 7994-8001.
30. Bach, L. G.; Islam, M. R.; Jeong, Y. T.; Gal, Y. S.; Lim, K. T., Synthesis and characterization of chemically anchored adenosine with PHEMA grafted gold nanoparticles. *Applied Surface Science* **2012**, *258* (7), 2816-2822.
31. Matsuura, K.; Ohno, K.; Kagaya, S.; Kitano, H., Carboxybetaine Polymer-Protected Gold Nanoparticles: High Dispersion Stability and Resistance against Non-Specific Adsorption of Proteins. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2007**, *208* (8), 862-873.
32. (a) Ibrahim, K.; Löfgren, B.; Seppälä, J., Synthesis of tertiary-butyl acrylate polymers and preparation of diblock copolymers using atom transfer radical polymerization. *European Polymer Journal* **2003**, *39* (10), 2005-2010; (b) Sundaram, H. S.; Raghavachari, D., Controlled radical polymerization of tert-butyl acrylate at ambient temperature: Effect of initiator structure and synthesis of amphiphilic block copolymers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2012**, *50* (5), 996-1007; (c) Haddleton, D. M.; Crossman, M. C.; Dana, B. H.; Duncalf, D. J.; Heming, A. M.; Kukulj, D.; Shooter, A. J., Atom Transfer Radical Polymerization of Methyl Methacrylate Mediated by Alkylpyridylmethanimine Type Ligands, Copper(I) Bromide, and Alkyl Halides in Hydrocarbon Solution. *Macromolecules* **1999**, *32* (7), 2110-2119.
33. Treat, N. D.; Ayres, N.; Boyes, S. G.; Brittain, W. J., A Facile Route to Poly(acrylic acid) Brushes Using Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2006**, *39* (1), 26-29.
34. Matyjaszewski, K.; Xia, J., Atom Transfer Radical Polymerization. *Chemical Reviews* **2001**, *101* (9), 2921-2990.
35. Beers, K. L.; Boo, S.; Gaynor, S. G.; Matyjaszewski, K., Atom Transfer Radical Polymerization of 2-Hydroxyethyl Methacrylate. *Macromolecules* **1999**, *32* (18), 5772-5776.
36. Montheard, J.-P.; Chatzopoulos, M.; Chappard, D., 2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA): Chemical Properties and Applications in Biomedical Fields. *Journal of Macromolecular Science, Part C* **1992**, *32* (1), 1-34.

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

37. Fischer, H., The Persistent Radical Effect: A Principle for Selective Radical Reactions and Living Radical Polymerizations. *Chemical Reviews* **2001**, *101* (12), 3581-3610.
38. LaPorte, R. J., *Hydrophilic Polymer Coatings for Medical Devices*. Taylor & Francis: **1997**.
39. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R., Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, (7), 801-802.
40. Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G., Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (11), 4215-4221.
41. Tacar, O.; Sriamornsak, P.; Dass, C. R., Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2013**, *65* (2), 157-170.
42. Majeed, M. I.; Lu, Q.; Yan, W.; Li, Z.; Hussain, I.; Tahir, M. N.; Tremel, W.; Tan, B., Highly water-soluble magnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles for drug delivery: enhanced in vitro therapeutic efficacy of doxorubicin and MION conjugates. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1* (22), 2874-2884.
43. Zhang, J.; Rana, S.; Srivastava, R. S.; Misra, R. D. K., On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated, polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles. *Acta Biomaterialia* **2008**, *4* (1), 40-48.
44. Wang, F.; Wang, Y.-C.; Dou, S.; Xiong, M.-H.; Sun, T.-M.; Wang, J., Doxorubicin-Tethered Responsive Gold Nanoparticles Facilitate Intracellular Drug Delivery for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells. *ACS Nano* **2011**, *5* (5), 3679-3692.
45. (a) Prabakaran, M.; Grailer, J. J.; Pilla, S.; Steeber, D. A.; Gong, S., Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials* **2009**, *30* (30), 6065-6075; (b) Zhang, Y.; Ang, C. Y.; Li, M.; Tan, S. Y.; Qu, Q.; Luo, Z.; Zhao, Y., Polymer-Coated Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles for Triple-Responsive Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (32), 18179-18187.
46. Khlebtsov, B. N.; Khlebtsov, N. G., On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. *Colloid Journal* **2011**, *73* (1), 118-127.
47. Benoit, H., On the effect of branching and polydispersity on the angular distribution of the light scattered by gaussian coils. *Journal of Polymer Science* **1953**, *11* (5), 507-510.
48. Arghya, S.; Manoj, G.; Pragya, S.; Manab, D.; Utpal, B., Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of *Dillenia indica*. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2016**, *7* (2), 025005.
49. Khlebtsov, N.; Dykman, L., Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (3), 1647-1671.
50. Kim, D.; Park, S.; Lee, J. H.; Jeong, Y. Y.; Jon, S., Antibiofouling Polymer-Coated Gold Nanoparticles as a Contrast Agent for in Vivo X-ray Computed Tomography Imaging. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (24), 7661-7665.
51. Amjadi, I.; Rabiee, M.; Hosseini, M.-S., Anticancer Activity of Nanoparticles Based on PLGA and its Co-polymer: In-vitro Evaluation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* **2013**, *12* (4), 623-634.

Chapitre IV : Synthèse de nano-objets hybrides : Nanoparticules d'or greffées de polymères

52. Alyane, M.; Barratt, G.; Lahouel, M., Remote loading of doxorubicin into liposomes by transmembrane pH gradient to reduce toxicity toward H9c2 cells. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2016**, *24* (2), 165-175.

CHAPITRE V

V Chapitre V: Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

Contenu

V	Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères	181
V.1	Preuve de radiosensibilisation.....	182
V.2	Etude des nanoparticules d'or greffées de polymères irradiées	184
V.2.1	Les difficultés rencontrées lors de la séparation	185
V.2.2	Etudes de la particule irradiée et du surnageant issu de la séparation.....	187
V.2.3	Mesure de la production de radicaux hydroxyles OH [•]	205
V.3	Etude des solutions irradiées par diffusion de rayonnement	208
V.3.1	La diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)	208
V.3.2	La diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA).....	208
V.4	Tests de cytotoxicité <i>in vitro</i>	211
V.5	Conclusion	214
V.6	Références	215

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

Dans ce dernier chapitre, nous allons nous intéresser au comportement sous irradiation des nanoparticules d'or greffées de polymères dont la synthèse et la caractérisation ont été détaillées dans le chapitre précédent. L'irradiation de ces systèmes est conduite dans le but d'identifier les mécanismes impliqués lors de la radiosensibilisation par des nanoparticules d'or. Pour évaluer l'effet des nanoparticules d'or sur l'amplification de l'effet des rayonnements dans un milieu, nous proposons d'étudier les dégradations qui ont lieu dans le périmètre proche des nanoparticules. Les nanoparticules d'or greffées de polymères entrent parfaitement dans les critères de cette étude. En effet, l'effet de l'irradiation sur les polymères peut être quantifié en termes d'efficacité de dégradation des chaînes polymères mais également en termes de localisation des sites de dégradation.

Toutefois, avant d'étudier ces phénomènes de dégradation, nous avons souhaité nous assurer que les nanoparticules d'or greffées de polymère avaient bien un effet radiosensibilisant.

V.1 Preuve de radiosensibilisation

Les tests de radiosensibilisation sur les nanoparticules ont été faits au CEA-INSERM de Nice par l'équipe de Béatrice CAMBIEN du Laboratoire TIRO (UMR E4320). Des cellules colorectales cancéreuses de rat exprimant le transporteur d'iode NIS ont été mis en contact avec des solutions de nanoparticules d'or greffées de poly(acide méthacrylique) (PMAA) dans l'eau à différentes concentrations. Ensuite ces cellules ont été irradiées en interne par de l'iode 131 radioactif (dont l'activité est de 10 μCi) déposé directement sous forme de solution sur les cellules. L'iode 131 radioactif est un émetteur de type β^- qui va s'accumuler dans les cellules grâce au transporteur NIS. Il émet des électrons de 961 keV donc des rayonnements proches des électrons Comptons issus des rayons gamma utilisés dans nos études. Les irradiations se font en présence ou en absence de perchlorate qui est un inhibiteur NIS et donc un inhibiteur de l'irradiation interne des cellules.

Les résultats préliminaires obtenus sont résumés dans le diagramme de la Figure V.1. A des concentrations de 0,2 mg/mL et 0,02 mg/mL, un effet radiosensibilisant des NPs est clairement observé avec une diminution significative de la survie cellulaire. La présence de perchlorate permet d'évaluer la toxicité intrinsèque des nanoparticules (NPs). Lorsque les

NPs sont absentes, le pourcentage de cellules viables est d'environ 60 % avec ou sans inhibiteur. Les cellules sont donc très radiorésistantes.

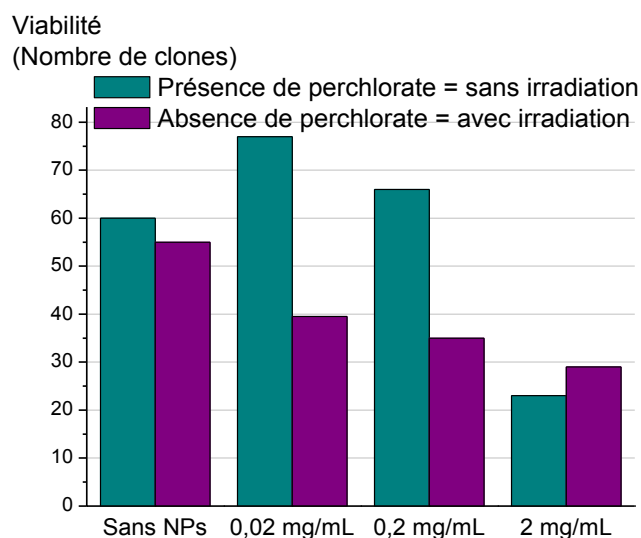


Figure V.1 : Viabilité des cellules (en %) en fonction de la concentration de nanoparticules Au-PMAA après irradiation par l'iode 131 et de l'absence ou la présence de perchlorate

En présence de NPs, on observe une toxicité uniquement à 2 mg/mL de NPs avec un pourcentage de cellules viables qui diminue jusqu'à 23 % en absence d'irradiation. Les NPs à des concentrations de 0,2 mg/mL et 0,02 mg/mL respectent le seuil de viabilité cellulaire. Ces données sont en accord avec les études de cytotoxicité présentées dans le chapitre précédent qui indiquaient une cytotoxicité à partir de 400 µg/mL sur des lignées non cancéreuses.

On peut déterminer un facteur d'augmentation de la dose d'irradiation (DEF) en comparant le pourcentage de viabilité cellulaire avec et sans irradiation. Ce facteur est de 1,9 aux deux concentrations de 0,2 mg/mL et 0,02 mg/mL. Cette valeur de DEF est comparable à celles trouvées dans les études de radiosensibilisation présentées en Annexe 5.

Maintenant que l'effet radiosensibilisant des NPs synthétisées a été prouvé, on peut s'intéresser à déterminer les différents mécanismes liés à ce phénomène et en particulier, la localisation et l'amplification éventuelle des phénomènes radiolytiques liés à la présence de NPs. Dans un premier temps, on s'intéresse à l'utilisation de l'action radiolytique sur les polymères greffés pour l'identification des exaltations de production de radicaux éventuels. Ensuite, la production de radicaux en présence d'or est caractérisée. Enfin, on va chercher à déterminer s'il y a la production éventuelle de composés toxiques stables après irradiation.

V.2 Etude des nanoparticules d'or greffées de polymères irradiées

Les solutions de NPs d'or greffées de polymères sont irradiées par des rayons gamma en milieu oxygéné. Ici, les irradiations n'ont pas été menées sous atmosphère inerte car le PMAA n'est pas connu pour se dégrader dans ces conditions¹. De plus, les irradiations ont été conduites à 4000 Gy et 20000 Gy afin d'amplifier les effets de l'irradiation.

Après la synthèse des Nps d'or greffées de polymères, nous avons rencontré des difficultés pour séparer les chaînes libres des objets greffés. La purification par centrifugation dans le MeOH n'avait pas permis complètement cette séparation. Après irradiation des solutions de NPs d'or greffées de polymères, il reste important de séparer les chaînes libres de polymères issues de la synthèse et de l'irradiation, des nano-objets irradiés. La nature des chaînes libres en solution et celle du polymère greffé sur la NP étant la même, nous avons continué à rencontrer des difficultés pour les séparer.

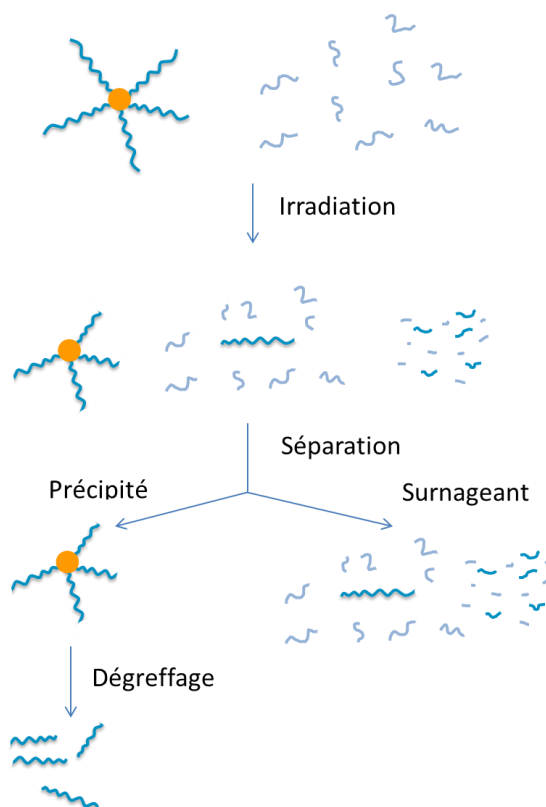


Figure V.2 : Séparation des NPs d'or greffées de polymère après irradiation

V.2.1 Les difficultés rencontrées lors de la séparation

Pour obtenir la séparation, après irradiation, nous avons essayé de faire précipiter les NPs d'or en gardant le polymère libre en solution avec un mauvais solvant des NPs mais pas du polymère libre. Le choix du solvant est très vite limité lorsqu'il doit respecter cette condition et en plus être miscible dans l'eau. Les solvants utilisés sont le tétrahydrofurane (THF), l'éthanol, l'acétonitrile, le méthanol, l'acétone...

La méthode a été optimisée sur les NPs d'or greffées de PMAA-1 car leur couronne de polymère est moins grande limitant l'effet stabilisant dans l'eau.

Après ajout de solvant dans la solution de NPs, une centrifugation à 4000 tours/min pendant au moins 5 min est effectuée. On choisit une vitesse de centrifugation modérée afin d'éviter la précipitation du polymère libre. Parmi les solvants utilisés, c'est le THF qui semble être le meilleur solvant de séparation/purification. La séparation n'est pas totale comme l'atteste une coloration légère du surnageant, particulièrement sur les témoins non irradiés.

Pour optimiser la séparation, nous avons séché partiellement les solutions pour évaporer le maximum d'eau. On joue sur des différences subtiles de solubilité du polymère libre et des

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

nano-objets plus lourds pour précipiter les NPs et garder le polymère libre en solution. La solution concentrée est précipitée dans du THF puis centrifugée à 4000 tours/min pendant 5 min. Le surnageant obtenu est incolore permettant d'analyser de manière précise en CES la présence de polymères.

Le précipité obtenu est analysé en ATG et montre un pourcentage de matière organique plus faible que les nanoparticules avant irradiation.

Malgré ces limites, ce protocole, s'est avéré meilleur que d'autres approches, en particulier la dialyse. En effet, un suivi UV-Visible du polymère libre a révélé qu'il ne traversait pas les membranes même à seuil de coupure en poids moléculaire élevé.

Le protocole de séparation détaillé ci-dessus a été appliqué aux NPs d'Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA irradiées. Dans les deux cas, un surnageant incolore est obtenu. Une analyse thermogravimétrique permet rapidement de déterminer si la séparation a bien eu lieu.

% de perte de masse	Avant irradiation	Après irradiation et précipitation
Au-PMAA-2	71	53
Au-PHEMA-PMAA	73	73

Tableau V.1 : Pourcentages de perte de masse des NPs Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA avant et après irradiation à 20000 Gy (et précipitation)

Pour les NPs Au-PMAA-2 irradiées à 20000 Gy, le protocole de séparation met en évidence une diminution de la perte de masse. On est donc capable de mettre en évidence que du polymère présent initialement sur les nanoparticules a été relargué dans le surnageant. Dans le cas des NPs Au-PHEMA-PMAA, le pourcentage de perte de masse ne change pas par rapport aux NPs non irradiées. Le PMAA est plus soluble dans l'eau que le PHEMA-PMAA, lui permettant d'être soluble même dans des quantités très faibles d'eau et ainsi passer dans le surnageant en présence de THF, alors que le PHEMA-PMAA n'est pas suffisamment soluble.

A ce stade, il est aussi important de garder en tête que juste après la synthèse des NPs, une quantité non négligeable de polymère libre n'est pas éliminée. La quantité de polymère issue de la précipitation ne provient donc pas seulement du polymère greffé irradié (voir Figure V.2). Il y a donc une possibilité de contamination par du polymère libre dont on doit tenir compte lorsque l'on conduit les analyses de la particule irradiée.

V.2.2 Etudes de la particule irradiée et du surnageant issu de la séparation

Dans cette partie, les différentes parties issues de l'irradiation et de la précipitation vont être étudiées : d'une part, la particule et sa couronne puis la couronne détachée des particules et comparée au polymère dans le surnageant.

V.2.2.1 Etude de la particule métallique et de sa couronne polymère

Suite à la purification, le précipité obtenu après centrifugation a été analysé par différentes méthodes. La RMN ^1H nous donne des informations sur la composition des ligands à la surface des NPs et l'XPS permet de quantifier les modifications de fonctionnalités chimiques.

V.2.2.1.1 Analyse RMN ^1H

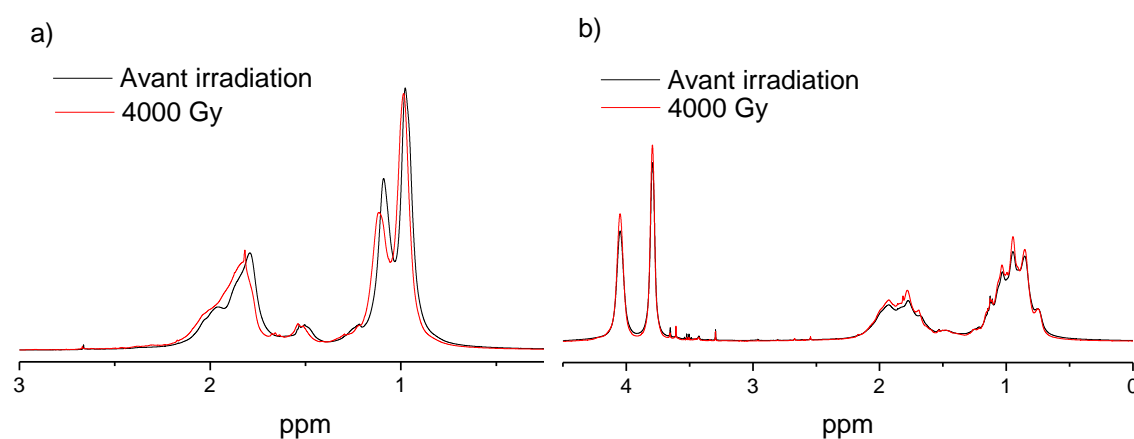


Figure V.3 : Spectres RMN ^1H avant et après irradiation des NPs a) Au-PMAA-2 et b) Au-PHEMA-PMAA

Les NPs d'Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA irradiées dans le D_2O à une concentration de 10 mg/mL ont été analysées en RMN ^1H puis comparées aux mêmes solutions non irradiées.

Les spectres RMN ^1H de la Figure V.3 montre que la structure des polymères à la surface des NPs n'a pas changé significativement pour les deux systèmes. Il n'y a pas de modification de largeur de pic pouvant suggérer des différences de solubilité. De légères différences sont observées pour les NPs Au-PMAA-2 à 1,2 et 2 ppm qui peuvent être dues à des variations de pH observées suite à l'irradiation des solutions de NPs (on passe d'un pH de 6,6 avant irradiation à un pH de 6,4).

V.2.2.1.2 Analyse XPS

La spectroscopie photoélectronique induite par rayons X a été utilisée ici pour quantifier les différences après irradiation sur les liaisons du carbone et de l'oxygène.

Le spectre XPS des NPs Au-PMAA-2 témoins (mises en solution puis précipitées) est représenté sur la Figure V.4. Le spectre global a la même allure que le spectre XPS des NPs non précipitées de la figure IV.23 avec la présence d'oxygène, de carbone, d'or et de sodium. De plus, on retrouve les mêmes déconvolutions des pics 1s de l'oxygène et du carbone.

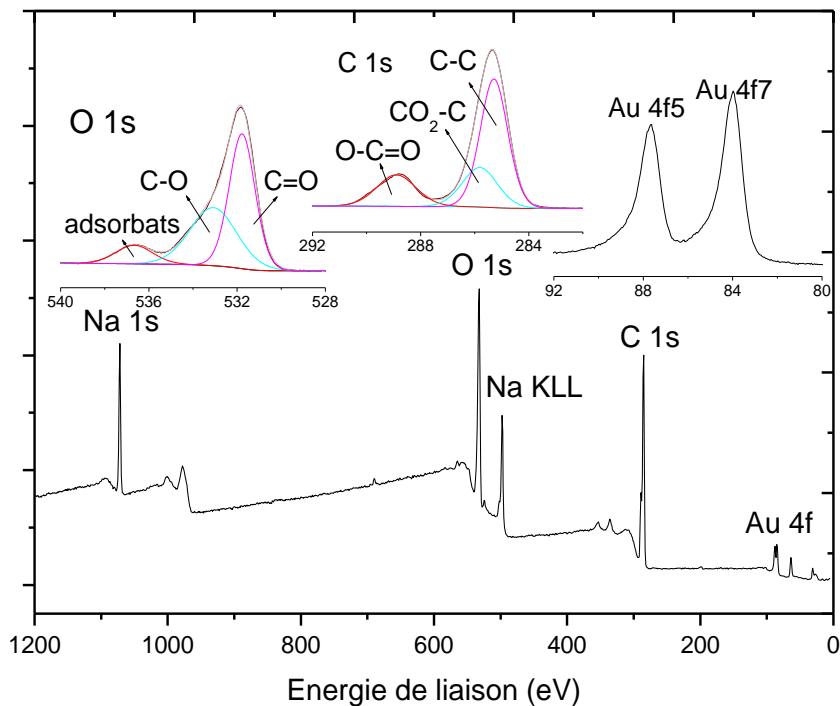


Figure V.4 : Spectre XPS des NPs Au-PMAA-2 issues de la précipitation

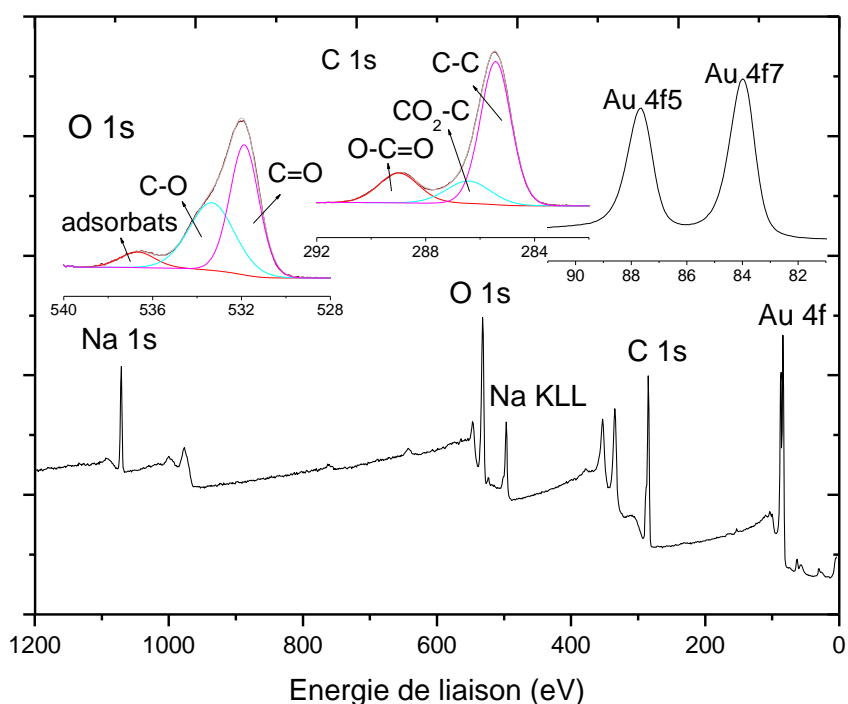


Figure V.5 : Spectre XPS des NPs Au-PMAA-2 irradiées à 20000 Gy issues de la précipitation

La Figure V.5 représente le spectre XPS des NPs Au-PMAA-2 irradiées à 20000 Gy dans l'eau puis précipitées. Le pic 4f de l'or est plus intense que précédemment atteignant même une intensité supérieure à celle des pics de l'oxygène et du carbone. Le même phénomène est observé pour les NPs Au-PHEMA-PMAA.

Il semblerait que la couche organique soit présente en quantité moins importante sur les NPs après irradiation. Il est possible de faire une quantification à partir de ces spectres.

% concentration atomique	Au	C	O	Na
Au-PMAA-2 témoin	1	68	28	3
Au-PMAA-2 irr. 20000 Gy	6	64	25	5

Tableau V.2 : Concentrations atomiques en % des différents éléments analysés en XPS pour les NPs Au-PMAA-2

Les pourcentages atomiques correspondants suggèrent des quantités d'or en surface beaucoup plus importantes. En termes purement analytiques, ces données ne sont pas compatibles avec les faibles variations observées en ATG (voir Tableau V.1). L'augmentation apparente du pourcentage d'or correspondrait donc plutôt à un changement de la

répartition or polymère dans l'échantillon séché et analysé, rendant l'or plus visible suite à l'irradiation.

Hormis, le changement d'intensité des pics, il n'y a pas de modification des types de liaisons ni pour les NPs Au-PMMA-2 ni pour les NPs Au-PHEMA-PMMA (voir Annexe 3) suite à l'irradiation. Le polymère ne subit pas de changement de type oxydation dans des proportions détectable par l'XPS.

Suite à l'analyse de la particule irradiée dans sa globalité, et en suivant le schéma de la Figure V.2, on s'est intéressés à détacher la couronne de polymère irradiée présente sur la NP.

V.2.2.2 Etude de la couronne détachée et sa comparaison avec le polymère libre

V.2.2.2.1 Détachement de la couronne de polymère à la surface des nanoparticules

Afin d'évaluer les phénomènes qui ont lieu sur les polymères, on va les dégreffer de la NP puis suivre leur évolution selon différentes techniques d'analyses.

Le dégreffage des NPs a été fait *via* la rupture de la liaison or-soufre par réaction avec de l'iode, suivant une adaptation de la méthode d'Ohno².

La solubilité de ces polymères étant différente de celle du poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) utilisé par Ohno et Kim, la réaction a été faite dans l'eau. La solution d'iode est en fait une solution dite de « gold etchant » disponible commercialement à 5 % en poids d'iode dans l'eau. Cette solution va rompre la liaison or-soufre mais également dissoudre la NP d'or³ comme le montre la Figure V.6. 10 mg de NPs sont solubilisés dans 2 mL de cette solution puis laissés sous agitation pendant une nuit à température ambiante. La solution noire obtenue est centrifugée pour éliminer toutes les impuretés insolubles.

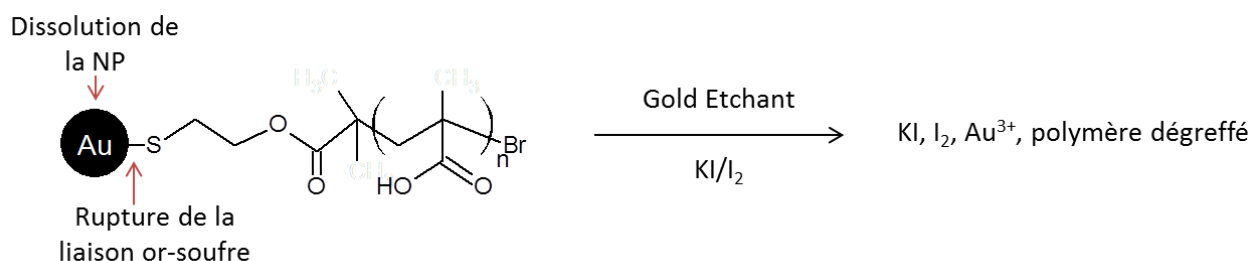


Figure V.6 : Dégreffage des chaînes polymères de la NP d'or

La dialyse a été utilisée comme technique de purification. Nous avons au préalable vérifié que nos conditions de dialyse ne permettaient pas au polymère de passer la membrane et que son indice de polymolécularité, I_p , n'était pas modifié après traitement. Cette technique simple est donc choisie pour éliminer les sels d'or solubles dans l'eau et la solution de gold etchant. On ne peut cependant pas ignorer le risque de perte de tous petits fragments par cette méthode. La solution incolore récupérée après la dialyse est concentrée puis analysée.

V.2.2.2.2 Analyse par spectroscopie infrarouge

- Couronne de PMAA dégreffée

La Figure V.7 présente les différents spectres infrarouge des couronnes polymères avant irradiation puis à 4000 Gy et 20000 Gy pour les NPs Au-PMAA-2.

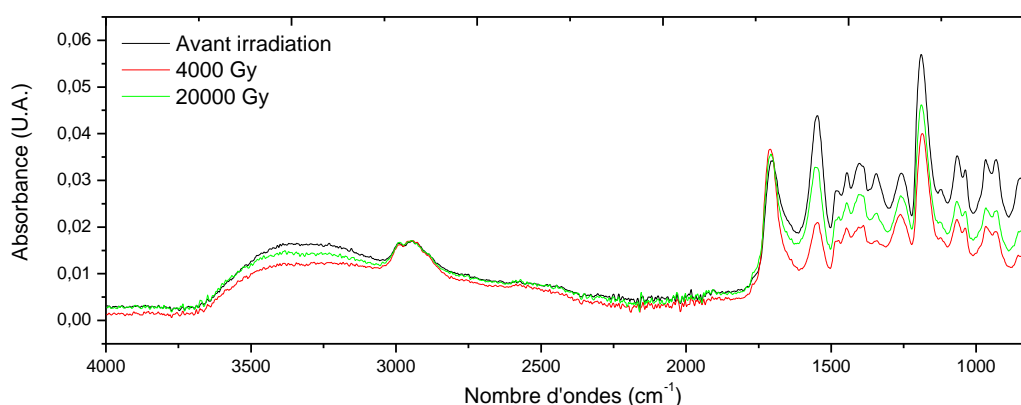


Figure V.7 : Spectres infrarouge des couronnes de polymères des NPs Au-PMAA-2 après irradiation

Les spectres infrarouges de la Figure V.7 présentent les pics caractéristiques du ligand PMAA-DS-2. Après normalisation des spectres par le pic correspondant aux vibrations d'élongation des liaisons C-H des groupements CH_3 , on n'observe pas de variation d'intensité de pics. Les spectres infrarouges avant et après irradiation des NPs Au-PHEMA-PMAA présentent aussi les pics caractéristiques du ligand PHEMA-PMAA-DS sans variation des intensités. Cela confirme la RMN et l'XPS faites sur la couronne avant détachement. Ces résultats sont comparés à ceux du polymère libre.

- Polymère libre

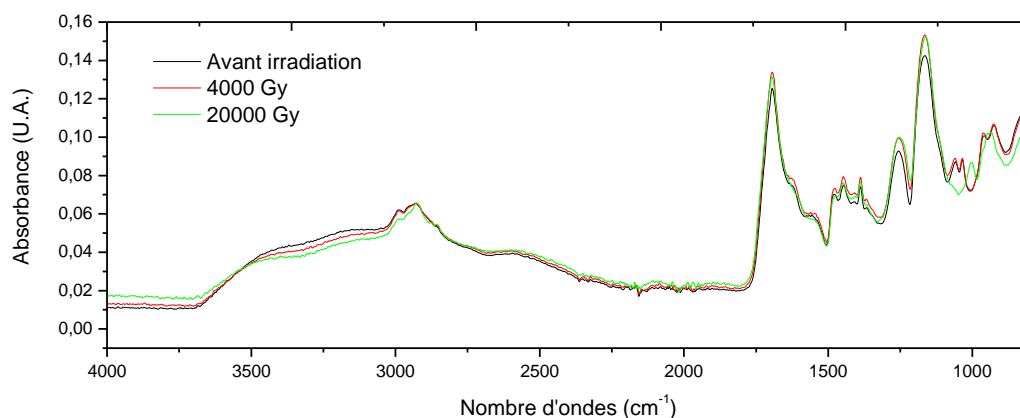


Figure V.8 : Spectres infrarouge des polymères libres des NPs Au-PMAA-2 après irradiation

La Figure V.8 montre les spectres FTIR des polymères libres pour les NPs Au-PMAA-2 sous l'effet de l'irradiation. Ces polymères libres sont issus de la séparation et sont représentés dans la Figure V.2 dans le surnageant. Les spectres ont tous les mêmes pics caractéristiques du ligand PMAA-DS-2. Les spectres ne présentent pas de grande différence les uns par rapport aux autres une fois normalisés. Seul le spectre des NPs irradiées à 20000 Gy montre quelques différences par rapport aux autres spectres avec une diminution de la bande de vibration des groupements CH_3 ainsi qu'un spectre légèrement différent à partir de 900 cm^{-1} . On n'a donc pas de signature de modifications chimiques des polymères de la couronne et libres : l'unité monomère reste la même suite à la dégradation par irradiation.

V.2.2.2.3 Analyse et comparaison du polymère dégreffé et du polymère libre par chromatographie d'exclusion stérique (CES)

Pour vérifier que le protocole de dégreffage n'a pas d'effet ni d'influence sur la masse molaire des chaînes de polymère, le même protocole a été appliqué sur le ligand polymère. Le PMAA-DS-2 qui a subi le traitement avec l'iode donne en CES un pic à 5200 g/mol avec une polymolécularité de 1,2. Le protocole ne semble pas avoir d'influence sur la distribution des masses molaires des chaînes.

- Couronne de PMAA dégreffée

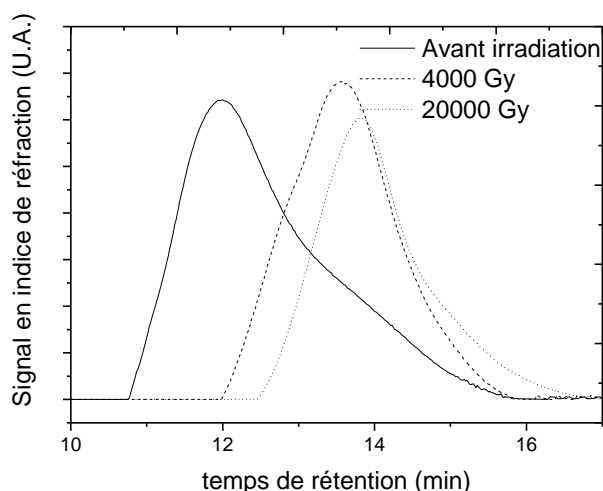


Figure V.9 : Chromatogrammes des couronnes de polymères des NPs Au-PMAA-2 après irradiation

Des solutions de NPs Au-PMAA-2 à 10 mg/mL dans l'eau avant et après irradiation sont précipitées puis leur couronne polymère est détachée et analysée en CES. Sur la Figure V.9, leurs chromatogrammes sont représentés. Après irradiation, les masses des polymères constituant les couronnes diminuent en fonction de la dose.

	M_n (g/mol)	I_p
0 Gy	4900	1,6
4000 Gy	2900	1,2
20000 Gy	2500	1,1

Tableau V.3 : M_n et I_p des couronnes de polymères des NPs Au-PMAA-2 après irradiation

La diminution de la masse molaire avec l'irradiation montre que le polymère subit des scissions majoritairement et non de la réticulation⁴. De fait, le poly(acide méthacrylique) est connu pour ne subir principalement que des scissions lors de l'irradiation par des rayons gamma contrairement au poly(acide acrylique) (PAA) plus connu pour se réticuler.⁵ Cette observation est en accord avec sa structure⁶.

Dans le cas du PMAA, l'arrachement d'hydrogène se produit soit sur la chaîne latérale (radical **2**) soit sur la chaîne principale (radical **1**). Le radical **2** se transforme en radical **1** par transfert intramoléculaire.

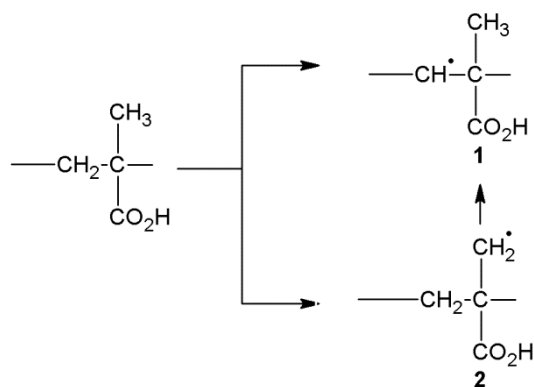


Figure V.10 : Arrachement d'hydrogène sur le PMAA

Le radical **1** subit une rupture de chaînes par une scission en β conduisant à la formation d'un radical en bout de chaînes (radical **3**) et une molécule insaturée terminale (**4**). Le radical **3** formé peut subir à son tour une scission β conduisant de nouveau à un radical **3** et au monomère MAA (**5**).

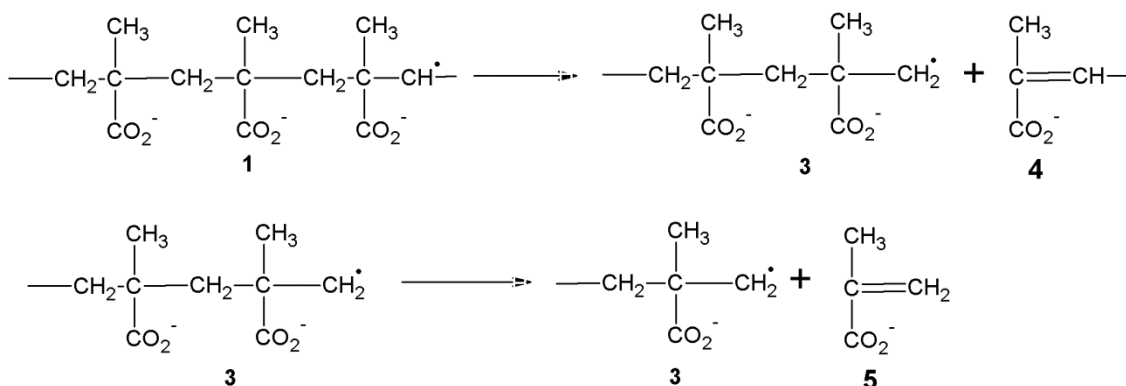


Figure V.11 : Scission de chaînes et dépolymérisation du PMAA

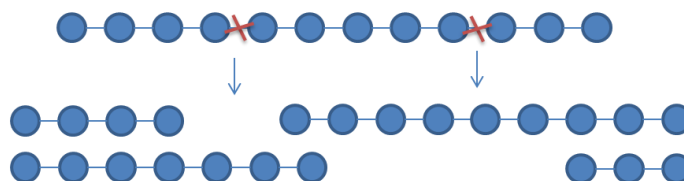
Dans notre cas, nous cherchons à quantifier et à localiser les scissions par rapport à la particule d'or.

Du point de vue de la localisation, il existe plusieurs types de scission ou coupure (Figure V.12). La coupure pourcentage et la coupure aléatoire génèrent deux fragments de polymères de tailles différentes avec une coupure qui peut se faire aux deux extrémités de la chaîne de polymère pour la coupure pourcentage ou n'importe où sur la chaîne pour une coupure aléatoire. La scission en milieu de chaîne, comme l'indique son nom, a lieu au centre de la chaîne de polymère, donnant deux fragments de tailles identiques. Les deux derniers types de coupures impliquent plusieurs scissions. On parle de « dézippage » lorsqu'une partie de la chaîne se fragmente en N monomères. Il peut également y avoir

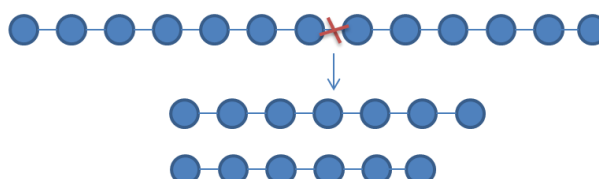
Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

plusieurs coupures à des intervalles fixes délimitées par une liaison faible permettant la scission ; cette coupure mène à des fragments d'oligomères de même taille.

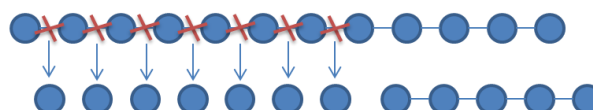
a) Coupure pourcentage et aléatoire



b) Coupure centrale



c) Coupure « zip » : « dézippage »



d) Coupure par liaison faible à des intervalles fixes

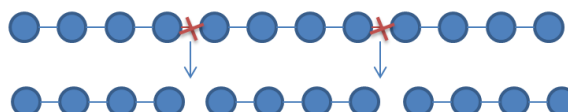


Figure V.12 : Schéma des différents types de coupure

La quantification des phénomènes de coupures et de réticulations à partir de la CES est quant à elle bien connue.

Les phénomènes de coupures et de réticulation sont quantifiés par les rendements radiolytiques notés $G(S)$ ou $G(X)$ respectivement.

Dans notre cas, le PMAA ne subit que des scissions. Un $G(S)$ de $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ est obtenu en tenant compte de la dose reçue directement par le polymère. C'est un rendement très important qui n'a que peu de rapport avec les valeurs connues à l'état solide pour cette famille de polymère. En effet, la valeur donnée par l'équipe de Hill⁵ est de $6,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ pour des PMAA irradiés à l'état solide.

Pour avoir une valeur de rendement calculé par rapport à la dose reçue par l'ensemble de la solution, et ainsi prendre en compte les effets indirects, on doit revenir au nombre de scissions par chaîne.

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

Comme dans le chapitre III, pour évaluer ce nombre de coupures par chaîne, nous avons utilisé l'équation (V-1)⁸ qui rend compte de la masse molaire en nombre après dégradation en fonction de la masse molaire en nombre initial et r le nombre de coupures :

(V-1)

$$\bar{M}_n(irr) = \frac{\bar{M}_n(0)}{1 + r}$$

A 4000 Gy, il y a en moyenne 0,68 coupures par chaîne contre 0,94 coupures par chaîne à 20000 Gy. Connaissant la concentration en polymère, on détermine ainsi l'équivalent d'une concentration en scission et enfin un rendement de scission moyen de $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1}$. Ce rendement est dans les ordres de grandeur classique des rendements radiolytiques. En solution, il n'y a pas de données actuellement sur les valeurs de rendements de ce type de polymère, mais l'équipe de Ulanski⁹ propose une valeur maximum de $6,2 \times 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1}$ en supposant que chaque radical issu de la radiolyse de l'eau peut induire une scission.

Le rendement mesuré ici, est donc cohérent avec un effet indirect dominant les processus de scission. La régio-sélectivité des coupures dans le polymère reflète donc les sites où sont produits les radicaux. Une analyse détaillée des sites d'attaques est donc faite en suivant l'évolution de la polymolécularité (voir Tableau V.3).

On fait dans un premier temps l'hypothèse de coupures aléatoires (voir paragraphe précédent sur les différents types de coupure).

Le modèle de Reed⁸ prévoit l'augmentation de la polymolécularité en fonction du nombre de coupures aléatoires (voir Annexe 4). Ce n'est pas le cas dans le système Au-PMAA, où plus r augmente et plus la polymolécularité diminue. Cependant, le modèle présenté par Reed sur des coupures aléatoires correspond à des polymères en solution sans hypothèse spécifique sur la forme des distributions en taille.

Dans le modèle d'Inokuti¹⁰, qui prend en compte explicitement cette distribution, la polymolécularité n'augmente pas systématiquement pour des coupures aléatoires, elle peut être constante, ou baisser. L'évolution dépend de la distribution en taille initiale.

Cependant, dans notre cas, la distribution initiale est considérée comme étroite (β de 1,6, cf. Annexe 4), ce qui doit encore amener à une augmentation de la polymolécularité avec l'augmentation du nombre de coupures.

Il semble donc que des processus de coupure aléatoire ne permettent jamais de rendre compte de l'évolution d' I_p dans notre cas.

Nous nous sommes donc intéressés aux autres types de coupures. Plutôt que de travailler uniquement avec deux paramètres, M_n et I_p , l'équipe de Bose¹¹ s'est intéressée à l'évolution des spectres théoriques des poids moléculaires des polymères (M) en fonction de la fraction en poids (ϕ_M) pour différents taux de coupure afin de discriminer les différents types de coupure et ce, pour une distribution en taille initiale de type gaussienne.

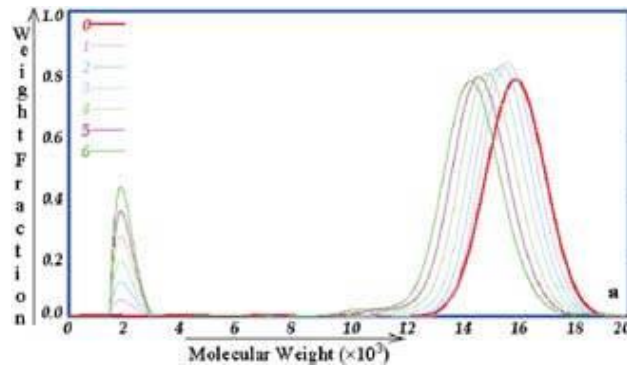


Figure V.13 : Evolution des spectres théoriques des masses molaires des polymères (M) en fonction de la fraction en poids (ϕ_M) pour des coupures aléatoires

Pour les coupures aléatoires (Figure V.13), le pic principal est décalé vers des masses molaires plus faibles et sa fraction massique reste constante. Un pic vers des masses plus faibles apparaît et sa fraction massique augmente.

Pour les coupures « dézip » (Figure V.14), La position du pic principal se décale progressivement vers les masses molaires plus faibles lorsque le taux de scission augmente. De même, la fraction massique des segments de polymères correspondants décroît. Lorsque les dégradations sont très significatives, un autre pic apparaît aux faibles masses.

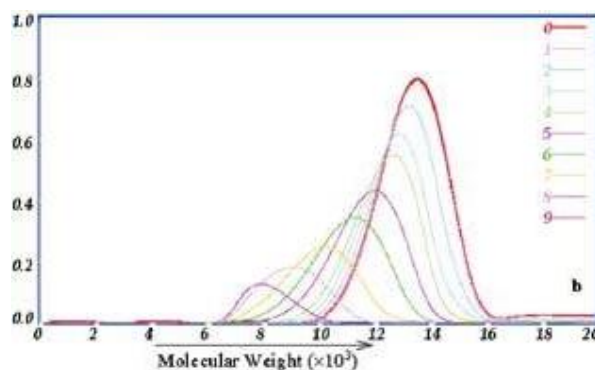


Figure V.14 : Evolution des spectres théoriques des masses molaires des polymères (M) en fonction de la fraction en poids (ϕ_M) pour des coupures « unzip »

Avec des coupures pourcentages, les résultats pour un polymère mais avec des pourcentages de coupures différents sont présentés. Lorsque les coupures se font sur la

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

chaîne entre 5 % à 30 % au niveau de ses extrémités (Figure V.15.a), le pic initial est décalé vers des masses molaires plus faibles avec une diminution de la fraction massique des segments de polymères correspondants au profit de l'apparition d'un pic avec une masse plus faible dont la quantité augmente avec les coupures. Sur la Figure V.15.b, le polymère qui subit des coupures sur sa chaîne entre 5 % à 10 % au niveau de ses extrémités, voit sa quantité diminuer très légèrement tandis que sa masse molaire diminue de manière plus importante et progressive.

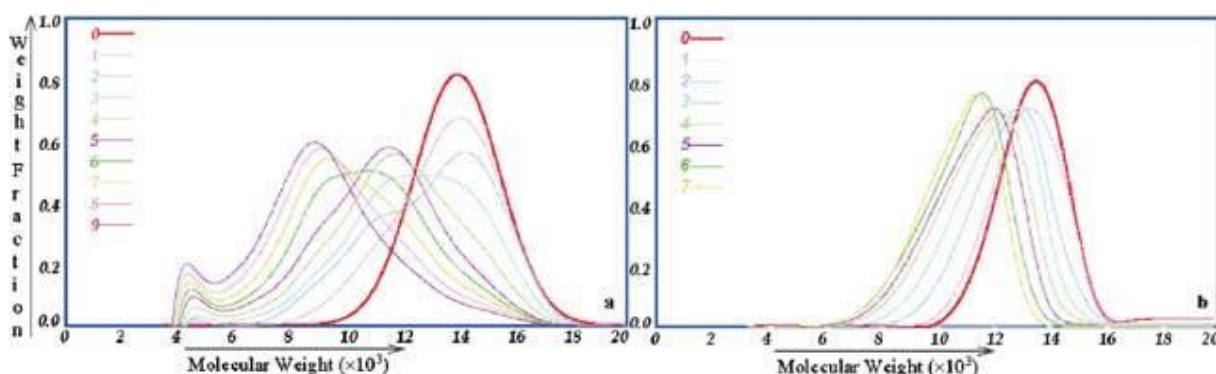


Figure V.15 : Evolution des spectres théoriques des masses molaires des polymères (M) en fonction de la fraction en poids (ϕ_M) avec une distribution normale en taille initiale pour des coupures pourcentages de 5 % à 30 % (a) et de 5 % à 10 % (b)

Si l'on observe de nouveau les chromatogrammes de la couronne de polymères des NPs Au-PMAA-2 (cf. Figure V.9), on voit qu'avec les coupures, la masse initiale diminue pour des masses plus faibles tout en conservant la même quantité de polymères après coupure. Ce cas de figure se rapproche des coupures pourcentages à 5-10 %. La masse du pic initial diminue sans qu'il s'élargisse de façon visible et sans que les intensités mesurées en CES soient significativement affectées. Ses bouts de chaînes ne sont pas visibles sur le chromatogramme car d'une part leur quantité est faible (moins de 10 %) et d'autre part ce sont des chaînes avec des masses trop faibles. Les coupures pourcentages (inférieures à 10 %) pourraient correspondre à des réactions de dépolymérisation en bout de chaîne.

Ces observations suggèrent que les dégradations subies par la couronne de polymère des NPs Au-PMAA-2 sont des coupures en bouts de chaînes greffées avec un rendement de $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1}$.

- Comparaison au PMAA initial

Afin d'évaluer l'effet de la présence de la NP d'or sur l'irradiation du ligand polymère greffé, des irradiations ont été faites sur ce ligand seul initial avec les mêmes doses. La Figure V.16 présente les chromatogrammes du ligand polymère sous l'effet de l'irradiation.

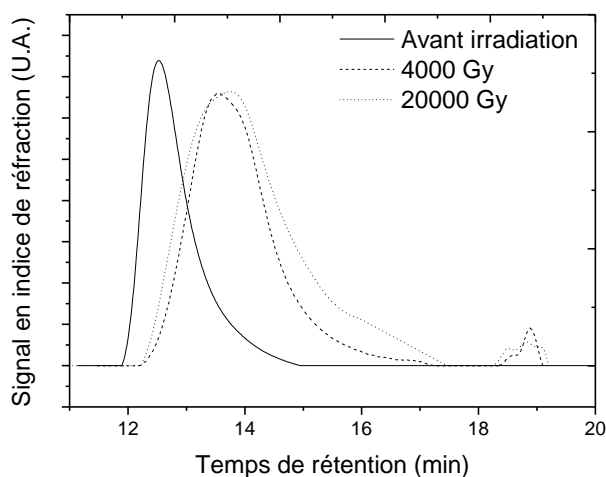


Figure V.16 : Chromatogrammes du ligand polymère PMAA-DS-2 après irradiation

La masse du ligand polymère diminue lorsque la dose augmente. De plus, une nouvelle masse apparaît à 130 g/mol qui équivaut à environ deux monomères. Comme sur les NPs, le ligand polymère semble subir majoritairement des scissions. Cependant, son I_p augmente avec la dose.

	M_n (g/mol)	I_p
0 Gy	4600	1,1
4000 Gy	2500 et 130	1,2 et 1,0
20000 Gy	2200 et 130	1,2 et 1,0

Tableau V.4 : M_n et I_p des couronnes de polymères des NPs PMAA-DS-2 après irradiation

En utilisant l'équation (V-1), on détermine un rendement de scission moyen de $2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ soit équivalent à celui déterminé en présence des NPs. De nouveau, ce sont les radicaux produits en solution qui sont à l'origine des coupures et l'effet indirect de l'irradiation domine.

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

Les chromatogrammes comparés avec les modèles de chromatogrammes théoriques de Bose et l'augmentation d' I_p (cf. Annexe 4) suggèrent tous deux des coupures de chaînes aléatoires du ligand polymère.

La présence de NPs d'or semble changer le phénomène de coupures pour le ligand polymère PMAA-DS-2. En effet, sans celles-ci, les scissions se font préférentiellement de manière aléatoire sur la chaîne. Une fois greffées à la surface des NPs, les scissions ne se font plus qu'en bouts de chaînes. Cette localisation préférentielle peut être liée à un problème d'accessibilité des radicaux produits dans l'eau au cœur de la particule greffée. Il se peut aussi que les radicaux soient produits préférentiellement à distance de la surface de la particule, suivant un processus d'amplification physique de type APT2 (cf. chapitre I).

Cependant, la NP d'or ne semble pas augmenter le phénomène de scission. En effet, les rendements de scission du polymère seul et du polymère sur la NP sont similaires. Pour confirmer que l'effet radiosensibilisant n'est pas observé ici, nous avons utilisé le polymère libre dans les solutions de NP comme témoin interne.

- Comparaison au polymère libre issu du surnageant

Les surnageants récupérés après centrifugation sont dans du THF, solvant utilisé en CES. On a pu ainsi analyser directement les surnageants.

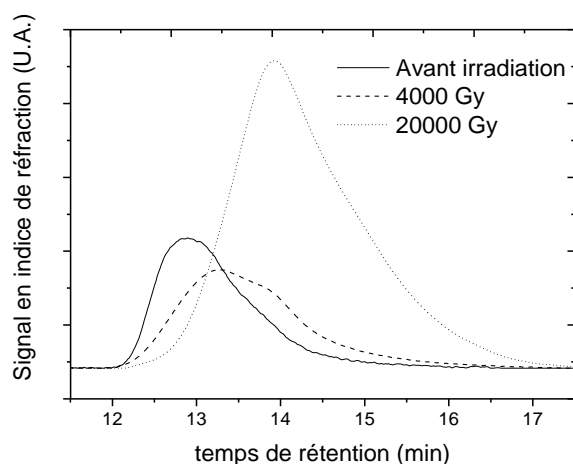


Figure V.17 : Chromatogrammes des polymères libres des NPs Au-PMAA-2 après irradiation

Le polymère libre récupéré à partir des NPs Au-PMAA-2 avant irradiation a une masse molaire en nombre de 3800 g/mol avec une polymolécularité de 1,1. Il faut noter que cette

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

masse est inférieure à la M_n d'une chaîne polymère greffée qui est de 4900 g/mol. Cela peut venir d'une sélection *via* la centrifugation (les M_n plus élevées précipitent).

	M_n (g/mol)	I_p
0 Gy	3800	1,1
4000 Gy	2600	1,3
20000 Gy	1900	1,2

Tableau V.5 : M_n et I_p du polymère libre après irradiation

Cependant, ce qui est intéressant de voir ici, c'est l'effet de l'irradiation sur ce polymère libre. On peut très nettement voir le décalage des masses molaires vers les plus petites masses. Cependant, après irradiation, d'après la Figure V.18, la question se pose de savoir si ceux-ci sont issus du polymère libre en solution avant irradiation (bleu clair sur la figure) et/ou de fragments de polymères greffés détachés des NPs (bleu foncé sur la figure).

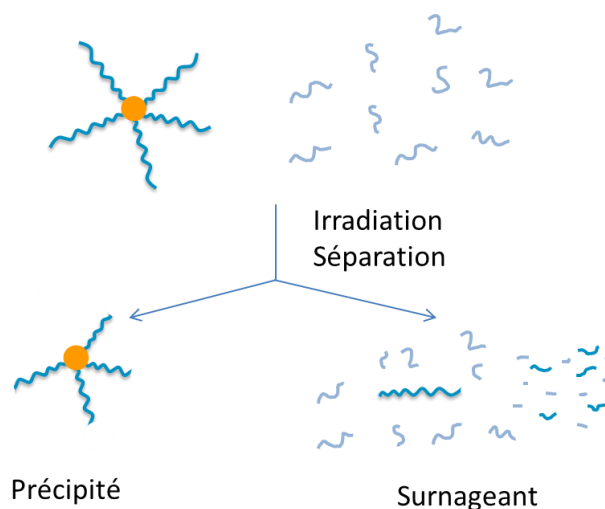


Figure V.18 : Séparation des NPs d'or greffées de polymère après irradiation

La masse par pesée des polymères libres séchés sur les coupelles n'augmente pas à 4000 Gy mais augmente à 20000 Gy, signe que la coupelle contient un mélange de polymères libres issus de la synthèse et de polymères provenant de la couronne suite à l'irradiation. Seul le polymère libre à 4000 Gy peut nous servir de témoin interne de l'effet de l'irradiation

De ce fait, pour les calculs de rendements, seule la masse molaire à 4000 Gy est considérée. Le $G(S)$ calculé par rapport à la dose reçue directement par le polymère est de $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.J}^{-1}$

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

¹. L'irradiation étant faite en solution, on recalcule ce rendement en fonction de la dose totale reçue par la solution à $1,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$, soit le même que celui de la couronne de PMAA.

La régio-sélectivité d'attaque n'est pas claire, mais la polymolécularité qui augmente à 4000 Gy pointe vers des coupures aléatoires alors que la comparaison avec les courbes de Bose suggère des coupures à des pourcentages importants (5-30%). La coupure en bout de chaîne semble en tous cas moins prononcé que dans la couronne.

L'effet de l'irradiation sur le PMAA a donc été étudié à la fois lorsqu'il est à des distances nanométriques des NP (couronne), mais également à des distances beaucoup plus importantes (polymère libre).

Dans tous les cas, l'effet indirect est dominant et il n'y a pas de signature d'une surproduction particulière de radicaux à proximité des NPs. Par contre, le type de coupure produit lors de l'irradiation est différent pour les polymères près des NPs de ceux qui en sont éloignés ou qui n'ont jamais été en contact avec elles. Cela est sûrement dû à la perte d'accessibilité des chaînes polymères en surfaces des NPs.

	$G(S)_{\text{dose totale}} \text{ (mol} \cdot \text{J}^{-1})$	Types de coupure
PMAA dégreffé	$1,6 \cdot 10^{-7}$	bouts de chaînes
PMAA libre	$1,6 \cdot 10^{-7}$	aléatoire?
PMAA initial	$2,0 \cdot 10^{-7}$	aléatoire

Tableau V.6 : Valeurs de $G(S)_{\text{dose totale}}$ et du type de coupure pour les différents PMAA

- Couronne de PHEMA-PMAA dégreffée

Les chaînes de copolymère ont été dégreffées des NPs d'or avant et après irradiation selon le même protocole décrit précédemment. Le phénomène de scissions a ensuite été étudié.

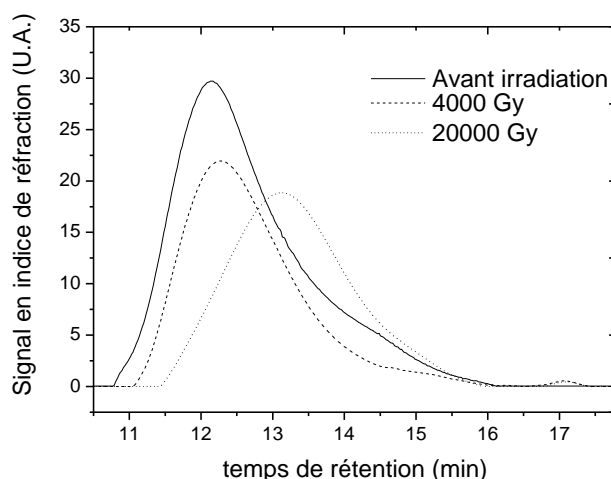


Figure V.19 : Chromatogrammes des couronnes de polymères des NPs Au-PHEMA-PMAA après irradiation

Sur la Figure V.19 sont représentés les chromatogrammes des différentes couronnes de polymères des NPs Au-PHEMA-PMAA sous l'effet de l'irradiation. Deux masses sont observées après irradiation.

Sur le Tableau V.7, à 4000 Gy, le pic initial a la même masse. C'est à 20000 Gy que cette masse diminue. Cependant, à la différence du PMAA, il y a l'apparition d'un nouveau pic avec une masse de 470 g/mol, soit deux monomères, avec une polymolécularité de 1,0. La présence de petites masses peut être la signature de coupures se produisant à proximité immédiate de la nanoparticule.

	M_n (g/mol)	I_p
0 Gy	5500	1,4
4000 Gy	5600 et 470	1,3 et 1,0
20000 Gy	3100 et 470	1,3 et 1,0

Tableau V.7 : M_n et I_p des couronnes de polymères des NPs Au-PHEMA-PMAA après irradiation

Pour le PHEMA qui est un polyméthacrylate comme le PMAA, il n'y a pas de H en α du groupe pendant ce qui devrait favoriser des scissions de chaînes. Hill et son équipe¹² ont montré que l'irradiation gamma du PHEMA entraîne principalement des scissions de chaînes mais également, de manière minoritaire, de la réticulation. Diego et coll.¹³ ont étudié l'effet de l'irradiation sur un copolymère à base de PHEMA et de poly(acétate d'éthyle) (PEA). Ils constatent que le PHEMA subit des scissions de chaînes alors que le PEA est réticulé.

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

On calcule un $G(S)$ de $2,6 \times 10^{-6} \text{ mol.J}^{-1}$ en tenant compte de la dose reçue directement par le polymère. Là encore, le rendement mesuré suggère une contribution indirecte majoritaire.

En reprenant le raisonnement fait pour les NPs Au-PMAA-2, nous avons calculé dans un premier temps, le nombre de coupures par chaîne selon la dose d'irradiation. A partir de l'équation (V-1) déterminée par Reed, on trouve un nombre de coupures par chaîne nul à 4000 Gy et de 0,61 à 20000 Gy. Bien qu'il y ait l'apparition d'un nouveau pic qui traduit la coupure du copolymère en petites tailles, celui-ci est trop faible pour être pris en compte dans le calcul du r . Un rendement moyen de scission est déterminé à $2,7 \times 10^{-8} \text{ mol.J}^{-1}$. Ce rendement est inférieur à celui calculé pour la couronne de PMAA ($1,6 \times 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1}$).

Nous n'avons pas trouvé de rendements de scission pour le PHEMA seul dans la littérature, ni à l'état solide, ni à l'état liquide. On peut néanmoins constater que le rendement de scission déterminé pour le copolymère PHEMA-PMAA est plus faible que ceux trouvés généralement dans la littérature ($\sim 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1}$). Les coupures sont moins efficaces, probablement en raison de la possibilité d'attaques préférentielles sur la chaîne latérale hydroxyéthyle.

Concernant la localisation des coupures, on peut constater que la polymolécularité du PHEMA-PMAA diminue avec l'irradiation.

Comme dans le cas du PMAA, la distribution en taille est étroite. Une diminution d' I_p est donc là encore incompatible avec des coupures aléatoires.

Si l'on compare l'évolution des chromatogrammes avec les modèles étudiés par Bose, on peut associer cette tendance aux coupures « dézip » ou scission en bouts de chaînes. Ce genre de coupure est similaire aux coupures pourcentages où seule la fraction massique du pic initial est différente. En effet, avec des coupures pourcentages, la quantité de polymère reste la même alors qu'avec les coupures « dézip » la quantité de polymère diminue.

Sur les chromatogrammes de la Figure V.19, l'apparition d'un pic de masse 470 g/mol est également visible pour les deux doses d'irradiation. Ce pic garde la même intensité sur les deux chromatogrammes signe que sa concentration ne change pas. L'irradiation sur ce copolymère semble détacher également une fraction de la chaîne de masse 470 g/mol de manière constante et minoritaire.

Ces différentes observations suggèrent que les dégradations subies par la couronne de polymère des NPs Au-PHEMA-PMAA sont des coupures « dézip » en bouts de chaînes avec un rendement de $2,7 \times 10^{-8}$ mol.J⁻¹ et de façon minoritaire, des coupures en proximité de la surface.

Il n'a pas été possible de comparer ces résultats avec le ligand polymère initial afin d'évaluer l'effet des NPs d'or car le ligand polymère n'est pas soluble dans l'eau.

En conclusion, l'étude CES de la masse des couronnes pour les deux systèmes après irradiation a permis de mettre en évidence un phénomène de scissions de chaînes qui se produit lors de l'irradiation gamma de ces objets et de proposer une localisation en bout de chaîne pour ces coupures. Néanmoins, ces études ont été faites à partir de travaux publiés sur des polymères souvent à l'état solide. Or, les polymères sur lesquels nous travaillons sont en solution, leur concentration est donc beaucoup plus faible.

La présence de NPs d'or ne semble pas augmenter l'effet de l'irradiation de manière significative comme il est décrit dans la littérature (voir chapitre I). Pourtant, nous avons montré que ces NPs greffées étaient bien radiosensibles dans le cas de l'étude montrée dans la partie V.1. La radiosensibilisation des NPs métalliques passe par la production d'électrons secondaires qui vont réagir avec l'eau pour produire entre autre des radicaux OH[•]. Une étude a été faite pour quantifier cette production de radicaux hydroxyles OH[•] par les NPs d'or greffées de polymères.

V.2.3 Mesure de la production de radicaux hydroxyles OH[•]

Les radicaux OH[•] sont des espèces oxydantes connues pour être à l'origine de l'apoptose des cellules¹⁴. La mesure de leur production est directement liée à la mesure de l'efficacité des NPs en termes de radiosensibilisation. Néanmoins, leur courte durée de vie empêche une détection directe de leur production.

Il est donc nécessaire de les piéger par l'introduction d'une molécule dans le milieu capable de réagir avec les radicaux OH[•] et de former une espèce stable qui pourra être quantifiée sur des échelles de temps plus longs. Une des méthodes les plus sensibles est basée sur des systèmes qui forment des espèces fluorescentes détectables par spectrofluorimétrie¹⁵.

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

L'utilisation de la coumarine¹⁶ comme molécule de piégeage est largement décrite dans la littérature. Bien qu'elle soit plus sensible que le benzoate de sodium¹⁷ utilisé dans notre étude, elle ne peut être utilisée à forte concentration, et donc décrire les phénomènes se produisant à temps court. Nous lui avons préféré le benzoate de sodium.

Les produits majoritaires de la réaction des radicaux OH^\bullet avec le benzoate de sodium sont les dérivés monohydroxylés¹⁸ tandis que les dérivés dihydroxylés sont des produits secondaires¹⁹. Les produits monohydroxylés sont le 2-hydroxybenzoate (2-HB), le 3-hydroxybenzoate (3-HB) et le 4-hydroxybenzoate (4-HB) dont les concentrations sont mesurables individuellement. En effet, ces produits sont fortement fluorescents contrairement au benzoate de sodium.

Lors de mesures par fluorimétrie, le 3-HB présente un pic dans son spectre d'émission à $\lambda = 420$ nm pour une excitation à $\lambda = 300$ nm. Ce pic est constant à pH basique. Le 2-HB présente les mêmes caractéristiques mais avec un pic beaucoup moins intense²⁰. Tandis que le 4-HB se distingue plus facilement de ses isomères par une $\lambda_{\text{émission}} = 336$ nm lorsqu'il est excité à $\lambda = 291$ nm²⁰⁻²¹. Ainsi, il est décidé dans notre étude de suivre la production de 3-HB proportionnelle à la production de radicaux OH^\bullet .

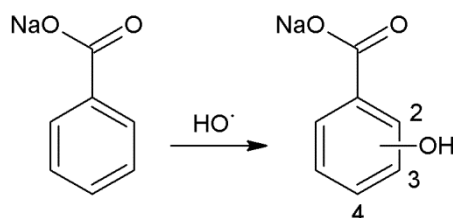


Figure V.20 : Réaction d'hydroxylation du benzoate de sodium

Afin de quantifier cette production dans les solutions de NPs d'or, il est au préalable nécessaire de réaliser des courbes de calibration. L'intensité du pic d'émission du 3-HB à $\lambda = 420$ nm pour une excitation à $\lambda = 300$ nm en fonction de différentes concentrations en 3-HB est tracée, en prenant en compte la présence dans la solution de NPs d'or qui peuvent écranter l'excitation UV.

La production de radicaux OH^\bullet dans les solutions de NPs d'or sous irradiation (environ 720 Gy) a été évaluée dans différentes conditions. D'abord en diluant, la concentration initiale en NPs d'or puis en faisant varier la concentration en benzoate de sodium. Ce dernier paramètre permet d'évaluer les effets aux temps courts. En effet, en augmentant la concentration en benzoate, les radicaux OH^\bullet sont capturés plus vite. Pour avoir une

référence, la production de radicaux OH^\bullet a été déterminée dans l'eau dans les mêmes conditions en absence de NPs d'or. Ainsi, un ratio $G(\text{OH}^\bullet)/G(\text{OH}^\bullet)_{\text{libre}}$ a pu être déterminé.

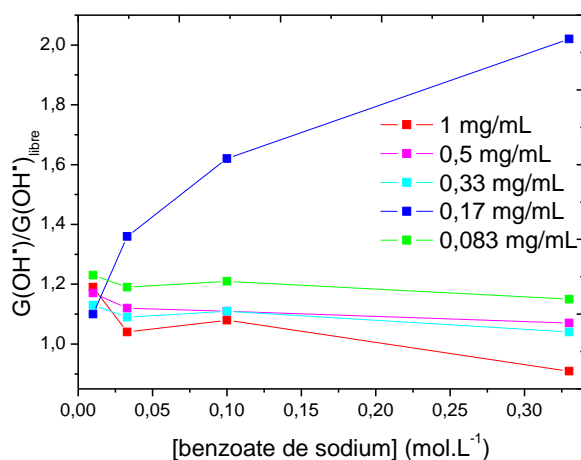


Figure V.21 : Evolution du ratio $G(\text{OH}^\bullet)/G(\text{OH}^\bullet)_{\text{libre}}$ en fonction de la concentration en benzoate de sodium pour différentes concentrations en NPs Au-PMAA-2

Dans la majorité des conditions expérimentales, aucune surproduction significative de OH^\bullet n'est observée. Ceci confirme les résultats des parties précédentes, qui montraient des rendements de scissions indépendants de la présence d'or.

En observant la Figure V.21, une courbe se distingue des autres, celle de la concentration à 0,17 mg/mL de NPs Au-PMAA-2 soit une dilution par 60 de la solution initiale à 10 mg/mL. Cette courbe présente une augmentation de la valeur du ratio $G(\text{OH}^\bullet)/G(\text{OH}^\bullet)_{\text{libre}}$ lorsque la concentration de benzoate de sodium augmente. De plus, ce ratio atteint un maximum de 2 pour une concentration de benzoate de sodium élevée. Cela signifie que, dans ces conditions très particulières de concentration, la production de radicaux OH^\bullet est plus importante aux temps courts. Une telle dépendance à la concentration en NPs n'a jamais été proposée, et peut être due à des interactions entre NPs, qu'il serait intéressant d'étudier par des méthodes de diffusion. Cependant, cet effet d'amplification est transitoire et limité. De plus il n'est pas observé à des concentrations où l'effet radiosensibilisant sur des cellules est encore actif (voir Figure V.1).

Nous allons maintenant, nous attacher à regarder l'influence de l'irradiation sur la taille et la forme des objets en diffusion.

V.3 Etude des solutions irradiées par diffusion de rayonnement

Les NPs Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA sont solubilisées dans de l'eau ou du D₂O puis irradiées à différentes doses. Ces solutions ont été étudiées directement par des techniques de diffusion (SAXS, DNPA). En effet, il n'est pas nécessaire de séparer les chaînes libres de polymères des NPs irradiées car les polymères en solution diffusent très peu sous rayons X et neutrons. Ainsi, on peut analyser les nano-objets (NPs greffées de polymères) préférentiellement.

V.3.1 La diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)

Le SAXS va nous permettre d'évaluer l'effet éventuel de l'irradiation sur la taille du cœur métallique.

Les solutions de NPs Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA à 10 mg/mL dans l'eau irradiées à 4000 Gy et 20000 Gy sont analysées. Après traitement des spectres, les courbes avant irradiation, à 4000 Gy et à 20000 Gy se superposent pour les deux systèmes. L'ajustement des courbes avec un modèle de distribution gaussienne de sphères donne la même valeur de rayon avant et après irradiation. L'irradiation n'a donc pas d'effet sur le cœur métallique des NPs.

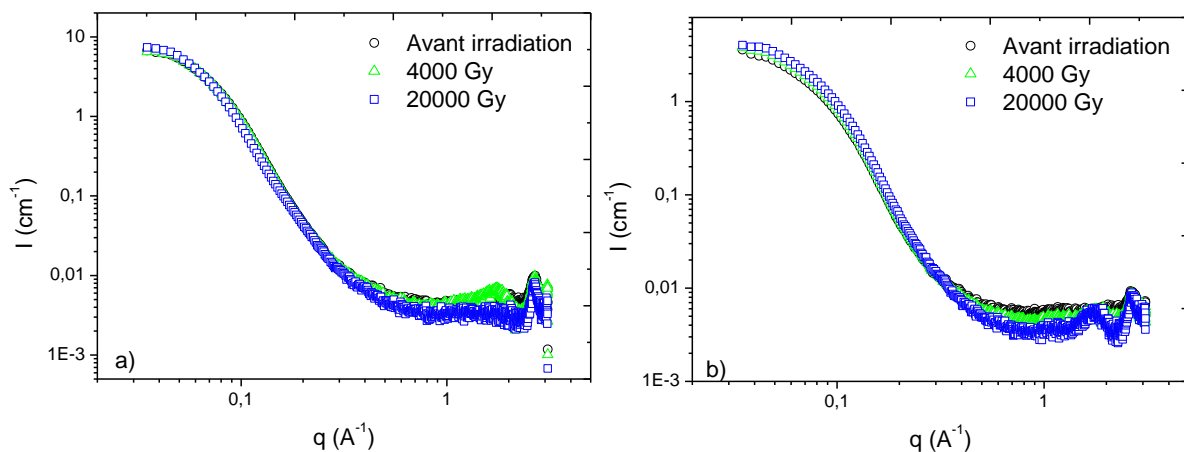


Figure V.22 : Spectres SAXS des NPs a) Au-PMAA-2 et b) Au-PHEMA-PMAA après irradiation

V.3.2 La diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)

Les solutions de NPs Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA irradiées à 10 mg/mL dans l'eau sont ensuite analysées en DNPA. Les mesures ont été faites dans les mêmes configurations que le chapitre précédent. Les différents signaux d'intensité diffusée de la couronne en fonction du

vecteur de diffusion q , sont représentés sur la Figure V.23 pour les NPs a) Au-PMAA-2 et b) Au-PHEMA-PMAA sous l'effet de l'irradiation.

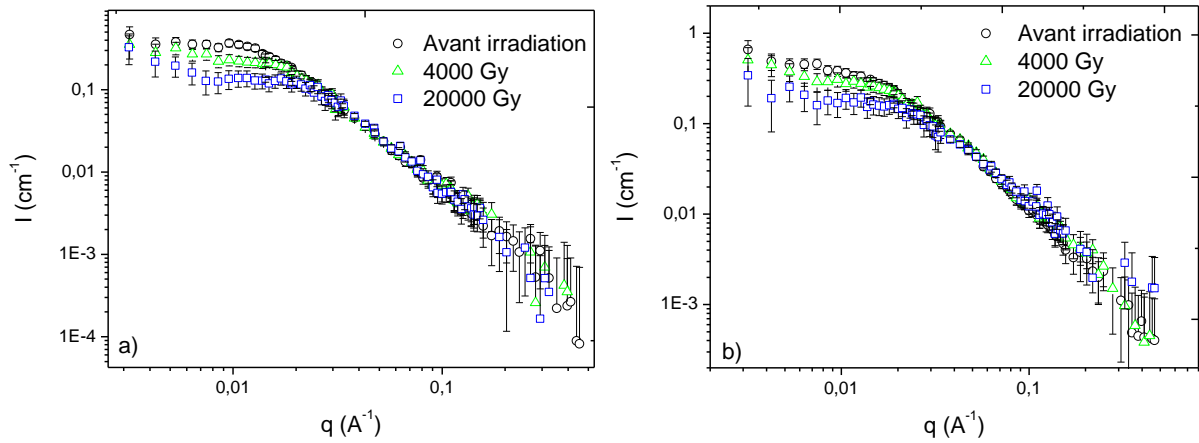


Figure V.23 : Spectres DNPA des NPs a) Au-PMAA-2 et b) Au-PHEMA-PMAA après irradiation

Les courbes présentent toutes la même décroissance en q^{-2} , leur facteur de forme n'a donc pas changé. Le modèle de Debye peut être utilisé sur les courbes après irradiation pour l'ajustement. Néanmoins, la diminution de l'intensité à $q = 0$ (I_0) est visible ainsi que le décalage vers les grands vecteurs de diffusion q , du point d'inflexion des courbes avec l'irradiation. La diminution d' I_0 indique la diminution de la masse apparente, M_{app} , de la couronne. Le décalage du point d'inflexion de la courbe indique la diminution en taille des objets. Les spectres d'intensité diffusée ainsi que leur courbe d'ajustement selon le modèle de Debye, sont représentés sur la Figure V.24 pour les NPs a) Au-PMAA-2 et b) Au-PHEMA-PMAA.

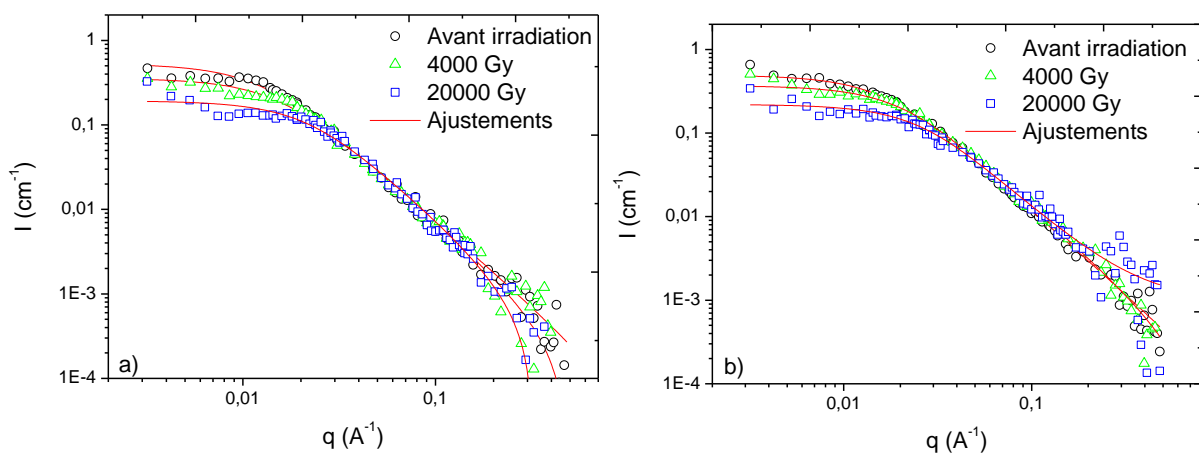


Figure V.24 : Spectres DNPA des NPs a) Au-PMAA-2 et b) Au-PHEMA-PMAA après irradiation ainsi que leur courbe d'ajustement

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

En ajustant les courbes avec le modèle de Debye on estime la valeur d' I_0 ainsi que la taille des objets.

	Au-PMAA-2		Au-PHEMA-PMAA	
	I_0 (cm ⁻¹)	Rg (Å)	I_0 (cm ⁻¹)	Rg (Å)
0 Gy	0,53 ± 0,02	120 ± 3	0,49 ± 0,01	90 ± 1
4000 Gy	0,35 ± 0,01	98 ± 3	0,37 ± 0,01	74 ± 1
20000 Gy	0,19 ± 0,01	69 ± 2	0,22 ± 0,01	58 ± 1

Tableau V.8 : Valeurs d' I_0 et Rg pour les NPs Au-PMAA-2 et Au-PHEMA-PMAA

La diminution en taille des objets avec l'irradiation est confirmée avec les valeurs obtenues par le modèle de Debye. A 4000 Gy d'irradiation, la taille des NPs Au-PMAA-2 passe de 120 Å à 98 Å puis à 69 Å à 20000 Gy. De même, les NPs Au-PHEMA-PMAA ont une taille initiale de 90 Å, lors de leur irradiation à 4000 Gy, la taille diminue à 74 Å puis à 58 Å à 20000 Gy.

L'estimation de I_0 avec ce modèle permet aussi de calculer la M_{app} de la couronne de polymère des objets (à partir de l'équation IV-9) et d'en déduire une densité de greffage en tenant compte des M_n trouvées en CES pour les couronnes d'homopolymères et copolymères. La diminution des M_n explique la variation du rayon des couronnes avec l'irradiation. Ces résultats confirment les mesures de CES.

	Au-PMAA-2			
	I_0 (cm ⁻¹)	M_{app} (g/mol)	$M_{nchaîne}$ (g/mol)	$d_{greffage}$
0 Gy	0,53 ± 0,02	21000 ± 800	4900	4,3 ± 0,2
4000 Gy	0,35 ± 0,01	14250 ± 350	2900	4,9 ± 0,1
20000 Gy	0,19 ± 0,01	7525 ± 395	2500	3,0 ± 0,2

Tableau V.9 : Valeurs d' I_0 , des M_{app} et des $d_{greffage}$ pour les NPs Au-PMAA-2

Au-PHEMA-PMAA				
	I_0 (cm^{-1})	M_{app} (g/mol)	$M_{\text{nchaîne}}$ (g/mol)	d_{greffage}
0 Gy	$0,49 \pm 0,01$	21850 ± 450	5500	$4,0 \pm 0,1$
4000 Gy	$0,37 \pm 0,01$	16550 ± 450	5600	$2,9 \pm 0,1$
20000 Gy	$0,22 \pm 0,01$	9840 ± 460	3100	$3,1 \pm 0,2$

Tableau V.10: Valeurs d' I_0 , des M_{app} et des d_{greffage} pour les NPs Au-PHEMA-PMAA

Le calcul des masses apparentes, M_{app} , montre qu'il y a une diminution de la masse totale de la couronne de polymère après irradiation. Si on recalcule les densités de greffage à partir des M_n trouvées en CES après irradiation, globalement les densités de greffage diminuent avec l'irradiation. Il y a donc dégreffage de chaînes à la surface des NPs après irradiation. On peut estimer un rendement de dégreffage à partir du nombre de chaînes dégreffées par NP en fonction de la dose. Pour les NPs Au-PMAA-2, ce rendement est de $1,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ calculé par rapport à la dose reçue par l'eau. Il y a donc dix fois plus de coupures ($1,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$) que de dégreffage de chaînes. Pour les NPs Au-PHEMA-PMAA, ce rendement est de $4,8 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$. Ici, il y a environ deux fois plus de dégreffage que de coupures en bouts de chaînes.

La DNPA montre donc un effet de l'irradiation sur la taille des couronnes polymères des NPs avec un dégreffage des chaînes, qui pourrait se produire par rupture de la liaison or soufre, ou coupure dans la chaîne polymère près de l'or.

Nous n'avons pas d'indication sur la nature directe ou indirecte de ce dégreffage, ou sur son mécanisme. Les valeurs de rendement suggèrent plutôt un effet indirect. Cependant, les études de CES ont montré que les radicaux issus de la radiolyse de l'eau attaquent surtout l'extérieur du nano-objet. On ne peut donc exclure qu'on mette ici en évidence un effet catalytique de la NP, qui créerait une seconde source d'espèces réactives à sa surface (cf. chapitre I).

V.4 Tests de cytotoxicité *in vitro*

L'objectif de cette partie est de déterminer si des produits toxiques persistants, qui pourraient expliquer la radiosensibilisation, sont formés après irradiation.

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

De même que dans le chapitre IV, la cytotoxicité des NPs irradiées a été évaluée par un test MTT.

La toxicité des NPs Au-PMAA-2 irradiées à 4000 Gy a été mesurée à différentes concentrations (0 à 1000 µg/mL).

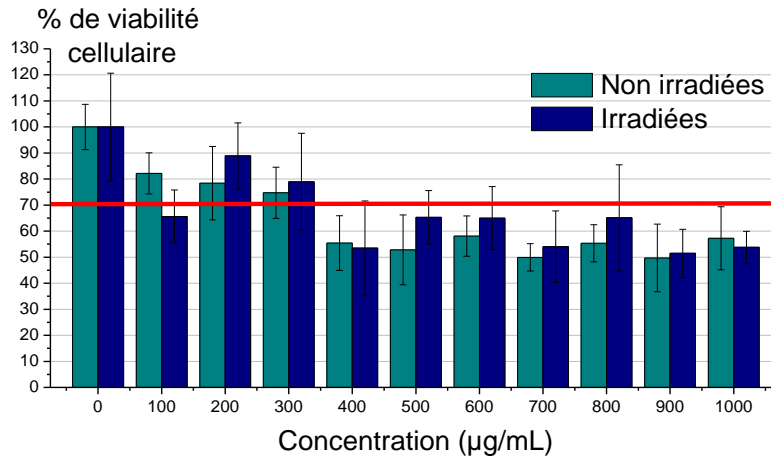


Figure V.25 : Viabilité des cellules (en %) en fonction de la concentration de NPs Au-PMAA-2 non irradiées et irradiées à 4000 Gy (test MTT)

Le comportement des NPs Au-PMAA-2 irradiées à 4000 Gy est très proche de celui des NPs non irradiées. Lorsque l'on considère les barres d'erreurs, les NPs irradiées sont légèrement moins toxiques que les non irradiées. Il est clair que l'irradiation ne produit pas de composés toxiques qui pourraient expliquer la radiosensibilisation.

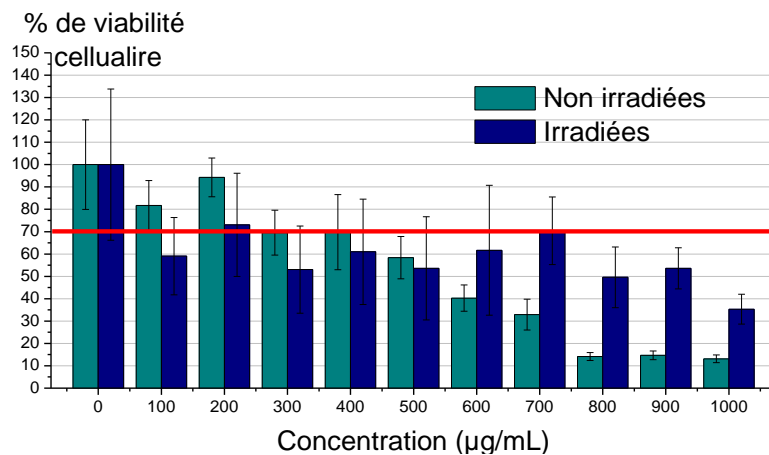


Figure V.26 : Viabilité des cellules (en %) en fonction de la concentration de NPs Au-PHEMA-PMAA non irradiées et irradiées à 4000 Gy (test MTT)

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

La Figure V.26 représente le pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de différentes concentrations de NPs Au-PHEMA-PMAA irradiées à 4000 Gy. Ici, les NPs après irradiation sont nettement moins toxiques qu'avant irradiation. L'irradiation semble avoir éliminée des composés toxiques ou avoir rendue les NPs plus biocompatibles.

Enfin, la cytotoxicité des NPs greffées de principes actifs (Doxorubicine) a été mesurée par un test MTT et un test LDH. Pour le test MTT, la gamme de concentration étudiée n'est pas adaptée pour les NPs irradiées, comme on l'avait déjà constaté pour les nanoparticules non irradiées. On va mesurer directement l'effet cytotoxique *via* un test LDH.

Le test LDH est représenté sur la Figure V.27. Jusqu'à 800 µg/mL, les nanoparticules irradiées sont aussi toxiques que celles non irradiées puis elles le deviennent un peu plus. L'effet escompté par l'irradiation des nanoparticules Au-PMAA-DOX, est le détachement de la DOX des nanoparticules et ainsi l'augmentation de la mort cellulaire. Or, ici, la toxicité n'augmente pas de manière considérable. La DOX ne semble pas s'être détachée des nanoparticules.

Néanmoins, l'activité biologique de la doxorubicine est conservée même après irradiation. Nous n'avons malheureusement pas encore pu tester en radiosensibilisation ces composés.

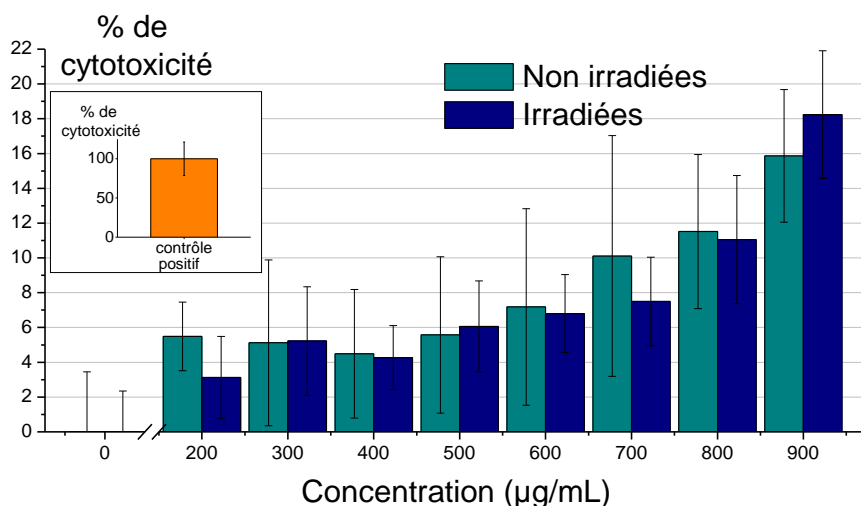


Figure V.27 : Cytotoxicité (en %) en fonction de la concentration de NPs Au-PMAA-DOX non irradiées et irradiées à 4000 Gy (test LDH)

L'irradiation des NPs greffées de doxorubicine n'apporte donc pas de toxicité supplémentaire, entraînant même dans certains cas une augmentation de la viabilité cellulaire.

V.5 Conclusion

L'irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères *in vitro* a prouvé son efficacité en termes de radiosensibilisation avec une diminution de la viabilité de cellules. Cette radiosensibilisation n'est pas liée à la création de produits toxiques stables, puisque la cytotoxicité des nanoparticules pré-irradiées n'augmente pas. Afin d'identifier les sites de production d'espèces toxiques transitoires autour de ces nanoparticules, la dégradation des chaînes polymères ainsi que l'évolution de la taille et la forme des objets ont été étudiées en fonction de l'irradiation. En DNPA, la taille des objets diminue avec la dose d'irradiation mais également la masse apparente de la couronne. L'irradiation entraîne le dégreffage des chaînes polymères à la surface des nanoparticules. Par chromatographie, il a été montré que les effets de l'irradiation sont principalement des coupures en bouts de chaînes. De ces analyses, deux sites d'attaques ont été identifiés, en périphérie des objets et à leur surface (Figure V.28). Cependant, au-delà de ces effets spatiaux, il a été difficile de mettre en évidence des exaltations des scissions radiolytiques. De fait, la mesure de la production de radicaux OH^\bullet en présence de nanoparticules d'or greffées de polymères irradiées dans l'eau, n'est pas augmentée, hormis dans des conditions très particulières qui restent à explorer. Il reste donc à savoir si les espèces réactives produites dans l'un ou l'autre des deux types de sites auraient une action biologique spécifique.

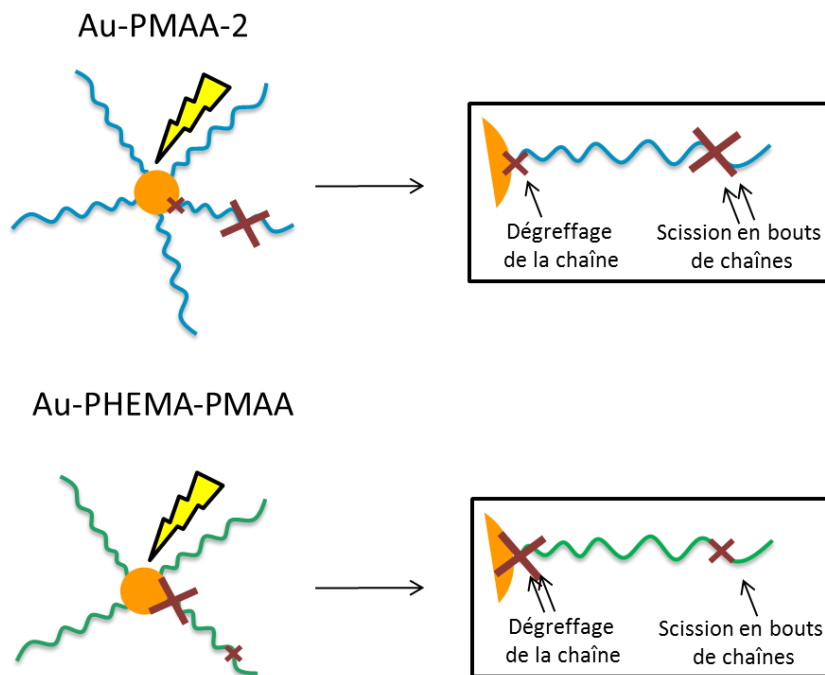


Figure V.28 : Schéma des sites d'irradiation des nanoparticules

V.6 Références

1. Alexander, P.; Fox, M., The degradation of polymethacrylic acid by X-rays. *Transactions of the Faraday Society* **1954**, *50* (0), 605-612.
2. Ohno, K.; Koh, K.-m.; Tsujii, Y.; Fukuda, T., Synthesis of Gold Nanoparticles Coated with Well-Defined, High-Density Polymer Brushes by Surface-Initiated Living Radical Polymerization. *Macromolecules* **2002**, *35* (24), 8989-8993.
3. Green, T. A., Gold etching for microfabrication. *Gold Bulletin* **2014**, *47* (3), 205-216.
4. Hill, D. J. T.; Whittaker, A. K., Radiation Chemistry of Polymers. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.: **2002**.
5. Hill, D. J. T.; O'Donnell, J. H.; Winzor, C. L.; Winzor, D. J., Evaluation of scission and crosslinking yields in γ -irradiated poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) from weight- and Z-average molecular weights determined by sedimentation equilibrium. *Polymer* **1990**, *31* (3), 538-542.
6. Miller, A. A.; Lawton, E. J.; Balwit, J. S., Effect of chemical structure of vinyl polymers on crosslinking and degradation by ionizing radiation. *Journal of Polymer Science* **1954**, *14* (77), 503-504.
7. Saito, *Statistical theories of cross-linking*. Academic Press: New-York, **1972**.
8. Reed, C. E.; Reed, W. F., Light scattering power of randomly cut random coils with application to the determination of depolymerization rates. *The Journal of Chemical Physics* **1989**, *91* (11), 7193-7199.
9. Ulanski, P.; Bothe, E.; Hildenbrand, K.; von Sonntag, C., Free-Radical-Induced Chain Breakage and Depolymerization of Poly(methacrylic acid): Equilibrium Polymerization in Aqueous Solution at Room Temperature. *Chemistry – A European Journal* **2000**, *6* (21), 3922-3934.
10. Inokuti, M., Weight-Average and z-Average Degree of Polymerization for Polymers Undergoing Random Scission. *The Journal of Chemical Physics* **1963**, *38* (5), 1174-1178.
11. Bose, S. M.; Git, Y., Mathematical Modelling and Computer Simulation of Linear Polymer Degradation: Simple Scissions. *Macromolecular Theory and Simulations* **2004**, *13* (5), 453-473.
12. Hill, D. J. T.; O'Donnell, J. H.; Pomery, P. J.; Saadat, G., Degradation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* **1996**, *48* (5), 605-612.
13. Brígido Diego, R.; Salmerón Sánchez, M.; Gómez Ribelles, J. L.; Monleón Pradas, M., Effect of γ -irradiation on the structure of poly(ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymer networks for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2007**, *18* (5), 693-698.
14. Paunesku, T.; Gutiontov, S.; Brown, K.; Woloschak, G. E., Radiosensitization and Nanoparticles. In *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer*, Mirkin, A. C.; Meade, J. T.; Petrosko, H. S.; Stegh, H. A., Eds. Springer International Publishing: Cham, **2015**; pp 151-171.
15. (a) Armstrong, W. A.; Grant, D. W., A Highly Sensitive Chemical Dosimeter for Ionizing Radiation. *Nature* **1958**, *182* (4637), 747-747; (b) Armstrong, W. A.; Facey, R. A.; Grant, D. W.; Humphreys, W. G., A Tissue-equivalent chemical dosimeter sensitive to 1 rad. *Canadian Journal of Chemistry* **1963**, *41* (6), 1575-1577; (c) Matthews, R. W., The Radiation Chemistry of the Terephthalate Dosimeter. *Radiation Research* **1980**, *83* (1), 27-41; (d) Gopakumar, K.; Kini, U. R.;

Chapitre V : Irradiation de nanoparticules d'or greffées de polymères

Ashawa, S. C.; Bhandari, N. S.; Krishnan, G. U.; Krishnan, D., Gamma irradiation of coumarin in aqueous solution. *Radiation Effects* **1977**, *32* (3-4), 199-203.

16. (a) Foley, S.; Rotureau, P.; Pin, S.; Baldacchino, G.; Renault, J.-P.; Mialocq, J.-C., Radiolysis of Confined Water: Production and Reactivity of Hydroxyl Radicals. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (1), 110-112; (b) Collins, A. K.; Makrigiorgos, G. M.; Svensson, G. K., Coumarin chemical dosimeter for radiation therapy. *Medical Physics* **1994**, *21* (11), 1741-1747; (c) Mead, J. A. R.; Smith, J. N.; Williams, R. T., Studies in detoxication. 71. The metabolism of hydroxycoumarins. *Biochemical Journal* **1958**, *68* (1), 61-67; (d) Manevich, Y.; Held, K. D.; Biaglow, J. E., Coumarin-3-Carboxylic Acid as a Detector for Hydroxyl Radicals Generated Chemically and by Gamma Radiation. *Radiation Research* **1997**, *148* (6), 580-591.

17. Armstrong, W. A.; Black, B. A.; Grant, D. W., The radiolysis of aqueous calcium benzoate and benzoic acid solutions¹. *The Journal of Physical Chemistry* **1960**, *64* (10), 1415-1419.

18. Gutteridge, J. M. C., Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. *Biochemical Journal* **1987**, *243* (3), 709-714.

19. Loeff, I.; Swallow, A. J., On the radiation chemistry of concentrated aqueous solutions of sodium benzoate. *The Journal of Physical Chemistry* **1964**, *68* (9), 2470-2475.

20. Armstrong, W. A.; Grant, D. W., The aqueous benzoate system as a sensitive dosimeter for ionizing radiations. *Canadian Journal of Chemistry* **1960**, *38* (6), 845-850.

21. Baker, M. S.; Gebicki, J. M., The effect of pH on the conversion of superoxide to hydroxyl free radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1984**, *234* (1), 258-264.

Conclusion générale

Au cours de cette étude, nous avons étudié l'interaction entre les rayonnements et des systèmes de taille nanométrique dans l'eau. Deux nanostructures modèles ont été développées et caractérisées afin d'évaluer en détails l'effet du rayonnement sur la structure des nano-objets.

La première étape de notre étude se focalise sur les systèmes à base de copolymères à blocs amphiphiles s'organisant sous forme de micelles dans l'eau. Deux systèmes ont été développés qui diffèrent par leur sensibilité aux rayonnements ionisants. La synthèse d'un poly(éthylène glycol)-*b*-poly(méthacrylate de *tert*-butyle) (PEG-*b*-PMA*t*Bu) a été réalisée par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP) à partir d'un PEG fonctionnalisé amorceur. Une caractérisation fine a confirmé la présence des deux blocs dans le copolymère permettant l'auto-assemblage par nanopréciipitation de ces objets dans l'eau. Des micelles de type « crew-cut » avec un rayon de giration de 12 nm ont été obtenues et étudiées par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et diffusion de neutron aux petits angles (DNPA).

La synthèse du second copolymère à base de PEG-*b*-polysulfone (PEG-*b*-PSu) a été faite en plusieurs étapes. Un précurseur de polysulfone (polythioether) a été synthétisé puis assemblé par chimie click à un PEG fonctionnalisé avant d'être oxydé pour générer la partie PSu. L'auto-assemblage de ce copolymère par nanopréciipitation donne des nanoparticules dont le rayon hydrodynamique est de 55 nm.

Les micelles PEG-*b*-PMA*t*Bu présentent une légère cytotoxicité pour les concentrations les plus importantes de la gamme choisie, alors que les nanoparticules PEG-*b*-PSu ne présentent aucune cytotoxicité envers les cellules dans cette même gamme.

Le comportement sous irradiation de ces micelles a été étudié en présence ou en absence d'oxygène. Les polyméthacrylates et polysulfones sont connus pour se dégrader par coupures de chaînes, alors que le PEG se dégrade plutôt par réticulation. Ces phénomènes ont été vérifiés dans notre cas. Le comportement du PEG est particulièrement intéressant dans la mesure où il est largement utilisé dans le domaine du biomédical (« drug delivery », radiostérilisation et radiosensibilisation dans le cadre de cette étude). Ici, la formation de gels observée suite à l'irradiation des micelles contenant du PEG doit être explorée, car elle pourrait permettre un nouveau type d'encapsulation de principes actifs.

L'impact de l'irradiation sur la structure des micelles qui restent en solution est plus ambigu. Elles semblent croître en taille dans la plupart des cas, parfois avec des effets de seuils en dose. Ces objets de plus grande taille pourraient être des précurseurs des gels issus de l'interaction des nano-objets par leur chevelure PEG, ou être formés suite à la déstabilisation du cœur des structures par des coupures dans la partie hydrophobe. Cependant, des modifications chimiques plus limitées de la structure du copolymère (oxydations) pourraient induire un changement de structure du nano-objet. De fait, la stabilité des micelles irradiées est certainement un point à approfondir.

Les copolymères PEG-*b*-PSu sont plus radiosensibles que les copolymères PEG-*b*-PMA_tBu. De fait, si nous attendions des rendements de coupures plus élevés dans les systèmes polysulfones, ceux que nous avons pu mesurer sont effectivement très importants et ce, malgré leur faible solubilité. Cette observation pose la question d'un effet indirect par la diffusion des espèces réactives produites en solution dans les nanostructures. Ce point mériterait d'être approfondi mais la faible solubilité des polysulfones, qui fait aussi leur intérêt, limite nos capacités d'étude. L'optimisation de cette synthèse, comme nous avons commencé à le faire en ajoutant des groupements alkoxy dans la chaîne, pourrait permettre d'obtenir des polymères plus faciles à manipuler afin de mieux caractériser l'effet de l'irradiation.

Le cas des polysulfones indique que le cœur de la micelle contrôle aussi son comportement sous irradiation. *Via* le chargement des micelles PEG-*b*-PMA_tBu, nous avons observé un effet radiosensibilisateur avec le diphényliodonium sous atmosphère inerte. Il est ainsi possible de moduler la radiosensibilité soit en chargeant, soit en jouant sur la chimie du polymère. On peut envisager de travailler avec des groupements radioprotecteurs ajoutés directement sur le squelette du polymère ou au contraire utiliser des radiosensibilisateurs pour maximiser l'effet de l'irradiation. On peut espérer aller jusqu'à des nouveaux concepts de « drug delivery » déclenchés par irradiation. Ainsi, il serait intéressant de développer des micelles avec un cœur hydrophobe polysulfone sensibles aux coupures et une couronne hydrophile de poly(acide méthacrylique) permettant de greffer un principe actif .

Il a été également montré que l'irradiation n'augmentait pas la toxicité de ces objets, voire la diminuait même dans le cas du PEG-*b*-PMA_tBu. Il serait donc intéressant de comprendre quelles modifications chimiques induites par l'irradiation conduisent à cette baisse de

toxicité, pour pouvoir optimiser la construction des nanomédicaments en y introduisant ces briques modifiées.

La seconde partie de ce manuscrit a consisté à élaborer des nanoparticules d'or greffées de polymères. Un protocole de synthèse a été développé pour synthétiser ces nanoparticules. A partir d'un ligand polymère synthétisé au préalable par ATRP, les nanoparticules d'or sont formées en présence de sels d'or et d'un réducteur *via* une voie « grafting to ». Plusieurs nanoparticules avec différentes couronnes de polymères ont ainsi été synthétisées. Celles avec une couronne présentant du poly(acide méthacrylique) ont été choisies pour être greffées avec de la doxorubicine *via* un couplage peptidique. Les nano-objets obtenus ont été caractérisés de manière précise à travers, d'abord, la couronne polymère, puis le cœur métallique et enfin l'objet global. L'analyse de la couronne, *via* l'ATG et l'ICP-MS, a mis en évidence la présence de polymère libre autour des nanoparticules greffées. Par SAXS et TEM, on détermine une taille du cœur d'or d'environ 3 nm. La diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) permet de déterminer une taille des nanoparticules d'or greffées de polymère d'environ 10 nm avec 3 à 4 chaînes greffées par nanoparticules. Ces valeurs correspondent à des densités de greffage d'environ 0,14 chaînes par nm². Des tests de cytotoxicité ont été conduits à partir des nano-objets synthétisés. Ceux-ci restent non-toxiques pour des concentrations inférieures à 400 µg/mL. Par contre, la cytotoxicité augmente quand les nano-objets sont greffés de doxorubicine.

Après avoir caractérisé de manière précise les nanoparticules greffées, leur effet radiosensibilisant a été établi. Afin de comprendre l'origine de ce mécanisme, on a cherché à étudier le comportement sous irradiation des nanoparticules greffées. La DNPA a mis en évidence le dégreffage de chaînes polymères et une diminution de la taille des objets lors de l'irradiation. De plus, la dégradation des chaînes polymères par coupures en bouts de chaînes a été montrée par chromatographie d'exclusion stérique (CES). Les sites d'action de l'irradiation sur les nanoparticules sont donc les extrémités de la chaîne polymère greffée. Selon le type de nano-objet hybride étudié (nature de la couronne polymère), le rendement de dégreffage par rapport au rendement de coupure n'est pas le même. Afin de compléter ces résultats, nous avons effectué des mesures de production de radicaux OH[•] en présence de nanoparticules d'or greffées irradiées dans l'eau. Enfin, l'influence de l'irradiation sur la cytotoxicité des nanoparticules a été évaluée.

De ces différents éléments, on peut conclure que :

- Il n'y pas d'indication claire d'exaltation globale des phénomènes radiolytiques, aussi bien du point de vue des rendements de coupure des polymères, que de ceux de production des radicaux HO[•].
- Il semble qu'il y ait une double localisation des phénomènes radiolytiques, les uns dans la solution, et les autres en surface de la nanoparticule. Ce dernier point suggère une réactivité particulière à l'extrême surface de la nanoparticule, qu'il conviendrait de mieux explorer, en particulier en combinant les caractérisations développées dans ce travail et les méthodes de capture spécifique de radicaux.

Les méthodologies développées peuvent également être appliquées à d'autres types de rayonnement, en particulier aux irradiations X et aux ions.

Mais au-delà de ces aspects mécanistiques, nous avons construit des objets très stables radiosensibilisants qu'il faut exploiter. Nous avons montré que nous pouvions en modifier la chimie de surface et y incorporer des composés bioactifs. Ces deux paramètres doivent donc être systématiquement explorés pour en optimiser le potentiel radiosensibilisant.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié les effets des rayonnements sur différents nano-objets afin de répondre aux questions que la nano-structuration de ces systèmes posait. Selon le nano-objet étudié, les réponses sont très différentes. A l'échelle nanométrique, on constate une modification des processus radiolytiques (en terme de localisation) pour les nanoparticules greffées de polymères alors que pour les micelles polymères, nous n'avons pas été en mesure de les identifier. La présence de nanoparticules métalliques ne modifie pas les rendements de scission des polymères à leur surface. Pour les copolymères, nous n'avons pas pu calculer de rendements absolus mais leur comportement sous irradiation suggère des phénomènes plus importants dans le cas du PEG et du polysulfone et moins importants dans le cas du polyméthacrylate. Les mécanismes de dégradation des polymères, à cette échelle, restent globalement les mêmes qu'à l'état solide. Nous avons pu mettre en évidence que l'irradiation de ces nano-objets dans l'eau induit une contribution importante de l'effet indirect sur leur partie extérieure, mais que le rôle de cet effet sur l'intérieur des nano-objets reste à caractériser. Enfin, il est maintenant clair que l'irradiation peut altérer de façon significative la structure des nano-objets organiques avec une diminution de la taille

des nanoparticules greffées de polymères et une augmentation/agrégation dans le cas des micelles de copolymères.

Les analyses faites dans ce travail ne permettent pas d'évaluer précisément les mécanismes en jeu. Il faut donc réfléchir à utiliser d'autres techniques pour les déterminer. La Résonance Paramagnétique Electronique ou la Spectrométrie de Masse pourraient être des analyses complémentaires permettant d'identifier les radicaux issus de l'irradiation.

ANNEXES

Annexe 1 : Partie expérimentale

A. Protocoles de synthèses

Synthèses de copolymères à blocs amphiphiles

1. PEG-*b*-poly(méthacrylate de *tert*-butyle)

Synthèse d'un macro-amorceur PEGylé (PEG-Br)

8 g (1,6 mmol) de méthoxy polyéthylène glycol (m-PEG) préalablement lyophilisés pour éliminer toutes traces d'eau sont introduits dans un tricol conditionné à chaud puis mis sous argon. 120 mL de tétrahydrofurane (THF) anhydre sont ajoutés et la solution est agitée jusqu'à dissolution complète du m-PEG. 1,1 mL (8,1 mmol) de triéthylamine sont alors ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation 30 min avant d'introduire goutte à goutte 1 mL (8,1 mmol) de bromure de bromo-isobutyrate. Un précipité blanc est observé dès les premiers ajouts. La solution est laissée sous agitation pendant 2 jours.

Le précipité obtenu est filtré sur Büchner et le volume du filtrat est réduit à 30 mL environ avec un évaporateur rotatif à 50°C. La solution obtenue est précipitée dans 300 mL d'éther. Les différents précipités obtenus sont dissouts dans 100 mL de dichlorométhane. La solution jaune-orange obtenue est lavée à 3 reprises avec une solution aqueuse d'hydrogencarbonate de sodium saturée. Une solution transparente est alors séchée avec du sulfate de sodium avant d'être réduite à un volume de 30 mL avec un évaporateur rotatif à 30°C. La solution précipitée dans 300 mL d'éther donne une poudre blanche après séchage. Rendement = 72 %

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 4.20 (t, 2H, COOCH₂), 3.50-3.35 (m, 360H, OCH₂CH₂), 3.20 (s, 3H, OCH₃), 1.85 (s, 6H, CCH₃).

Copolymérisation du méthacrylate de *tert*-butyle (MAtBu)

800 mg (0,16 mmol) de m-PEG amorçants sont dissouts dans un ballon de 25 mL contenant 2 ml de diméthylformamide (DMF). La solution de PEG-Br ainsi que les solutions de monomère, de DMF et de pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA) sont dégazées à l'argon pendant 30 min. 25 mg (0,17 mmol) de bromure de cuivre (CuBr) sont introduits dans un tricol muni d'un réfrigérant, préalablement conditionné sous argon. 2 mL de DMF et 50 µL (0,24 mmol) de PMDETA dégazés sont alors ajoutés et la solution est agitée jusqu'à dissolution complète du cuivre. La solution de PEG-Br est ensuite ajoutée. Les réactifs sont

introduits dans des proportions Cu/ligand/amorceur de 1,1/1,5/1. 4 mL (24,6 mmol) de méthacrylate de *tert*-butyle sont ajoutés ($M_n^{\text{théorique}} = 21\,875 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) avant que le milieu réactionnel ne soit plongé dans un bain à 60°C. La réaction est arrêtée au bout de 3h et le milieu réactionnel est dilué dans du THF puis purifié par passage sur alumine pour extraire le cuivre. Le liquide visqueux obtenu est laissé sécher à l'air. Rendement = 51 %

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 3.75-3.60 (m, 472H, OCH_2CH_2), 3.35 (s, 3H, OCH_3), 2.05-1.80 (m, 90H, CH_2), 1.40-1.25 (m, 314H, CCH_3), 1.10-1.05 (m, 96H, CH_3).

Détermination du taux de conversion par mesures gravimétriques

Les taux de conversion ont été calculés par gravimétrie. Au cours d'une polymérisation, plusieurs prélèvements sont effectués dans une coupelle en aluminium dont la masse à vide est connue. La coupelle est pesée avant et après séchage du prélèvement. A $t=0$, le premier prélèvement permet de calculer le taux de solide (sels métalliques). Le taux de conversion p est défini par l'expression suivante :

(1)

$$p = \frac{[M]_0 - [M]}{[M]_0}$$

Avec $[M]$ la concentration en monomère dans le milieu et $[M]_0$ la concentration initiale.

Lors d'une polymérisation, le taux de conversion peut être calculé à partir des prélèvements effectués au cours de la réaction selon l'expression suivante :

(2)

$$p = \frac{\frac{m_{\text{sec}}}{m_{\text{liq}}} - \Phi_{\text{sel}}}{\Phi_{\text{monomère}}}$$

Avec m_{sec} la masse sèche du prélèvement, m_{liq} sa masse initiale, Φ_{sel} la fraction massique de sel et $\Phi_{\text{monomère}}$, la fraction massique en monomère.

1. PEG-*b*-polysulfone

Procédure générale pour les réactions photochimiques

Dans un ballon, le ou les monomères (ou polymères) (1 éq) et 0.1 éq de 2.2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA) sont solubilisés dans du THF puis le ballon est fermé à l'aide d'un septum et la solution est purgée sous argon pendant 5-10 minutes. Le milieu

réactionnel a été irradié avec une lampe UV (365 nm, 15 W) avec des temps d'irradiation variant selon la réaction.

Synthèse d'un monomère avec une double liaison et un thiol

2 g (11,3 mmol) de bromoheptène sont introduits dans un tricol de 100 mL surmonté d'un réfrigérant. Le montage est mis sous argon. 20 mL de DMF sont ajoutés suivie de 1.2 g (15,7 mmol) de thiourée. Le mélange réactionnel est mis sous agitation et chauffé à 100°C pendant 3h. 15 mL (37,5 mmol) d'une solution aqueuse de NaOH à 2.5 M sont ajoutés au milieu réactionnel à température ambiante puis le chauffage est repris pendant 2h. Le milieu réactionnel est ensuite extrait avec 30 mL de dichlorométhane. La phase aqueuse est lavée avec 10 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M puis extraite avec 15 mL de dichlorométhane. Les différentes phases organiques sont lavées avec 3 fois 45 mL d'eau puis séchées avec du Na₂SO₄. Le solvant est évaporé sous pression réduite et un liquide jaune est obtenu. Rendement = 37 %

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm): 5.75-5.70 (m, 1H, HC=CH₂), 4.95-4.85 (m, 2H, HC=CH₂), 2.45-2.40 (m, 2H, CH₂SH), 2.00-1.95 (m, 2H, HC=CH₂CH₂), 1.53-1.51 (m, 2H, HSCH₂CH₂), 1.31-1.30 (m, 5H, HC=CH₂CH₂CH₂, HS CH₂CH₂CH₂ et SH).

Synthèse d'un polythioether

1 g (12 mmol) d'1.5-hexadiène sont mis sous agitation avec 3.5 mL de THF dans un ballon de 25 mL. 2.22 g (12 mmol) d'2.2-(éthylènedioxy)diéthanethiol sont ajoutés suivie de 312 mg (0,12 mmol) de DMPA. La réaction est amorcée par la lampe. Au bout de 3h, la réaction est arrêtée. Le milieu réactionnel est précipité dans un excès de méthanol puis filtré et séché sous vide à température ambiante. Rendement = 70 %

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm): 5.80-5.75 (m, 1H, C=CH), 5.00-4.95 (m, 2H, C=CH₂), 3.65-3.60 (m, 8H, SCH₂CH₂O et OCH₂CH₂O), 2.70 (t, 4H, SCH₂CH₂O), 2.50 (t, 4H, SCH₂), 1.57-1.56 (m, 4H, SCH₂CH₂), 1.39-1.38 (m, 4H, SCH₂CH₂CH₂).

Synthèse d'un PEG-alcyne

2 g (1 mmol) de m-PEG préalablement lyophilisés sont ajoutés dans un tricol de 50 mL sous vide et sous argon et solubilisés dans 20 mL de dichlorométhane. Une solution de 350 mg (1,7 mmol) de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans 2 mL de dichlorométhane est ajoutée goutte à goutte suivie de 40 mg (0,3 mmol) de 4-diméthylaminopyridine (DMAP). Enfin 220 mg (2.2 mmol) d'acide 4-pentynoïque sont ajoutés. La réaction se poursuit durant 24h puis le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est évaporé. Le produit brut est précipité trois fois dans de l'éther froid pour obtenir une poudre blanche. Rendement = 81 %

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4.25 (t, 2H, COOCH₂), 3.7 (t, 2H, COOCH₂CH₂), 3.65-3.60 (m, 190H, OCH₂CH₂), 3.59 (t, 2H, CH₃OCH₂CH₂), 3.48-3.47 (m, 2H, CH₃OCH₂), 3.35 (s, 3H, OCH₃), 2.65-2.60 (m, 2H, OCOCH₂), 2.55-2.50 (m, 2H, OCOCH₂CH₂), 1.97 (m, 1H, C≡CH).

Synthèse d'un copolymère par couplage thiol-yne

100 mg (0,013 mmol) de polythioether sont dissouts dans 2 mL de THF. 130 mg (0,058 mmol) de PEG fonctionnalisé avec une extrémité alcyne sont ajoutés suivi de 6 mg (0,003 mmol) de DMPA. Le milieu réactionnel est dégazé sous argon pendant 10 min. La réaction est amorcée par irradiation UV et poursuivie durant une nuit. Le copolymère est précipité dans un excès de diéthyléther puis filtré et séché sous vide à température ambiante. Rendement = 77 %

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm): 3.70-3.60 (m, 228H, OCH₂CH₂, SCH₂CH₂O et OCH₂CH₂O), 3.35 (s, 3H, OCH₃), 2.85-2.84 (m, 2H, COOCH₂CH₂), 2.75-2.65 (m, 20H, SCH₂CH₂O), 2.60-2.50 (m, 20H, SCH₂), 2.55-2.45 (m, 2H, COOCH₂) , 1.65-1.5 (m, 20H, SCH₂CH₂), 1.45-1.30 (m, 4H, SCH₂CH₂CH₂).

Oxydation du copolymère

100 mg de copolymère polythioether-PEG sont dissouts dans 10 mL de chloroforme. Le milieu réactionnel est chauffé à 64°C. 500 µL d'acide acétique sont ajoutés suivi de 100 µL d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après une nuit de réaction à 64°C, le polymère est précipité dans un excès de diéthyléther puis filtré et séché sous vide à température ambiante. Rendement = 54 %

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4.00-3.85 (SO₂CH₂CH₂O), 3.80-3.50 (m, 157H, OCH₂CH₂ et OCH₂CH₂O), 3.35 (s, 3H, OCH₃), 3.25-3.15 (m, 15H, SO₂CH₂CH₂O), 3.15-3.05 (m, 15H, SO₂CH₂), 1.90-1.75 (m, 15H, SO₂CH₂CH₂), 1.55-1.45 (m, 4H, SO₂CH₂CH₂CH₂).

Synthèses de nanoparticules d'or greffées de polymères

Synthèse d'un amorceur à pont disulfure et dibromé

3.40 g (22 mmol) de 2,2-dithioethanol ainsi que 4.2 g (53 mmol) de pyridine sont dissouts sous agitation dans un tricol de 250 mL contenant 30 mL de THF sous atmosphère d'argon à 0°C. 12.2 g (53 mmol) de bromure de 2-bromoisobutyryle sont ajoutés goutte à goutte suivi par 30 mL de THF. La solution est agitée à 0°C durant une heure puis la réaction est poursuivie à température ambiante pendant 24h. Pour éliminer le sel de pyridinium, deux filtrations sont effectuées. La solution obtenue est dissoute dans le chloroforme et lavée avec une solution d'acide chlorhydrique à 2M puis deux fois avec de l'eau. Après séchage sur

Na₂SO₄, le solvant est évaporé sous pression réduite et une huile incolore est obtenue.
Rendement = 85 %

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4.44 (t, OCH₂, 4H), 2.98 (t, SCH₂, 4H), 1.94 (s, CH₃, 12H).

Synthèse des ligands polymères par ATRP

Le protocole présenté ci-dessous correspond à la synthèse du ligand PMA_tBu-DS avec $M_n^{\text{théorique}} = 10000 \text{ g.mol}^{-1}$.

Les solutions de monomères, de diméthylformamide (DMF), de PMDETA ainsi que la solution d'amorceur précédemment synthétisée sont dégazées à l'argon pendant 30 min. Un tricol de 50 mL surmonté d'un réfrigérant est conditionné sous argon. 250 mg (1,75 mmol) de bromure de cuivre (CuBr) sont introduits suivi de 9 mL de DMF et 400 µL (1,93 mmol) de PMDETA sous agitation jusqu'à dissolution complète du cuivre. 20 mL (123 mmol) de méthacrylate de *tert*-butyle (MA_tBu) sont ensuite ajoutés au tricol et le milieu réactionnel est agité pendant 10 min. 0.26 mL (0,87 mmol) de solution amorçante sont ajoutés et le milieu réactionnel est chauffé à 60°C. Les réactifs sont introduits dans des proportions Cu/PMDETA/amorceur 2/2/1. La solution est laissée sous agitation pendant 5h sous atmosphère inerte. Le polymère est précipité dans un mélange méthanol/eau (90 :10) et isolé par filtration. Des échantillons sont prélevés tout au long de la réaction *via* des seringues purgées pour déterminer le taux de conversion par gravimétrie. Rendement = 70%

Ligand polymère	Cu/PMDETA/ amorceur	Solvant de précipitation	$M_n^{\text{théorique}}$	Temps de réaction	Taux de conversion
PMA_tBu-DS	2/2/1	MeOH/eau	10000	5h	61%
PMA_tBu-DS	2/2/1	MeOH/eau	20800	5h	70%
PHEMA-PMA_tBu-DS	2/2/1	Toluène	7600	3h20	45%
PEG-PMA_tBu-DS	2/2/1	-	10200	5h	-
PEG-PHEMA-DS	2/2/1	Toluène	10600	3h20	-
PHEMA-DS	2/2/1	THF	10000	30min	58%

Tableau 1 : Résumé des conditions de polymérisation des ligands polymères

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm): PMA_tBu-DS : 1.81-2.06 (m, CCH₂, 2H), 1.41 (s, CH₃, 9H), 1.11-1.02 (m, CCH₃, 3H) ; PHEMA-PMA_tBu-DS : 4.10-4.25 (m, CH₂-OH, 2H), 3.75-3.90 (m, CH₂-O, 2H), 1.70-2.10 (m, CCH₂, 3H), 1.30-1.50 (m, CH₃, 8H), 0.75-1.25 (m, CCH₃, 6H) ; PEG-PMA_tBu-DS : 3.60-3.75 (m, CH₂-CH₂-O, 15H), 3.30-3.40 (m, CH₃-O, 3H), 1.75-2.00 (m, CCH₂, 3H), 1.40-1.50 (m, CH₃, 8H), 0.75-1.25 (m, CCH₃, 7H) ; PEG-PHEMA-DS : 4.00-4.20 (m, CH₂-OH, 2H), 3.75-

3.90 (m, CH₂-O, 2H), 3.50-3.75 (m, CH₂-CH₂-O, 15H), 1.60-2.20 (m, CH₂, 5H), 0.70-1.20 (m, CCH₃, 6H) ; PHEMA-DS : 4.00-4.20 (m, CH₂-OH, 2H), 3.70-3.90 (m, CH₂-O, 2H), 1.80-2.20 (m, CH₂, 2H), 0.80-1.20 (m, CCH₃, 3H).

FTIR (ATR): ν (cm⁻¹) : PMAtBu-DS : 2975 (C-H, CH₃), 2930 (C-H, CH₂), 1715 (C=O, ester) cm⁻¹ ; PHEMA-PMAtBu-DS : 2970 (C-H, CH₃), 2935 (C-H, CH₂), 1715 (C=O, ester) cm⁻¹ ; PEG-PMAtBu-DS : 2920 (C-H, CH₃), 2880 (C-H, CH₂), 1720 (C=O, ester) cm⁻¹.

Hydrolyse des ligands polymères

Le protocole présenté ci-dessous convient à l'hydrolyse de tous les ligands contenant du PMAtBu.

1 g de PMAtBu-DS sont solubilisés dans 10 mL de chloroforme. 2.7 mL d'acide trifluoroacétique sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 5 jours afin d'obtenir une précipitation complète. Le polymère hydrolysé est lavé avec du chloroforme puis précipité. Rendement = 90 %

RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm): PMAA-DS : 1.80-2.20 (m, CCH₂, 2H), 1.00-1.20 (m, CCH₃, 3H) ; PHEMA-PMAA-DS : 4.00-4.10 (m, CH₂-OH, 2H), 3.70-3.80 (m, CH₂-O, 2H), 1.80-2.20 (m, CCH₂, 3H), 0.80-1.25 (m, CCH₃, 6H) ; PEG-PMAA-DS : 3.60-3.75 (m, CH₂-CH₂-O, 14H), 3.30-3.40 (m, CH₃-O, 3H), 1.75-2.00 (m, CCH₂, 3H), 0.75-1.25 (m, CCH₃, 6H).

FTIR (ATR): ν (cm⁻¹) : PMAA-DS : 2975 (C-H, CH₃), 2930 (C-H, CH₂), 1690 (C=O, acide) cm⁻¹ ; PHEMA-PMAA-DS : 2970 (C-H, CH₃), 2935 (C-H, CH₂), 1700 (C=O, acide) cm⁻¹ ; PEG-PMAA-DS : 2920 (C-H, CH₃), 2880 (C-H, CH₂), 1720 (C=O, acide) cm⁻¹.

Synthèse des nanoparticules d'or greffées de polymères par voie « grafting to »

Le protocole de synthèse des nanoparticules d'or s'applique à tous les ligands polymères présentés ci-dessus excepté le PEG-PHEMA-DS.

220 mg (0,2 mmol) d'HAuCl₄ (à 30 % en masse dans HCl dilué) sont dissouts sous agitation dans 8 mL de méthanol puis ajoutés à une solution de ligands polymères dans le méthanol (119 mg (0,02 mmol) de ligands dans 8 mL de méthanol). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante. 75.6 mg (2 mmol) de borohydrure de sodium (NaBH₄) sont dissouts dans 4 mL de méthanol puis ajoutés rapidement à la solution dans le tricol sous agitation vigoureuse. Après 24 heures d'agitation à température ambiante, la solution rouge foncée est centrifugée pour obtenir un précipité noir. Ce dernier est lavé avec une solution méthanol/éther (25 mL/15 mL). Le précipité final est séché sous un flux d'argon.

Echantillon	M _n (g/mol)	Au : polymère	Au : NaBH ₄	Temps de réaction	MeOH /éther
PMAA-DS	4800	10 : 1	1 : 10	24h	25/15
PMAA-DS	11100	10 : 1	1 : 10	24h	25/15
PHEMA-PMAA-DS	10100	10 : 1	1 : 10	24h	25/15
PEG-PMAA-DS	3700	10 : 1	1 : 10	24h	10/15
PHEMA-DS	6080	10 : 1	1 : 10	24h	0/100

Tableau 2 : Conditions de synthèse des nanoparticules d'or

Greffage d'un principe actif

25 mg de nanoparticules Au-PMAA-2 sont solubilisés dans 5 mL de tampon phosphate à pH=7,8. 3,6 µL d'EDC suivie de 5 mg de NHS sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité 2h à température ambiante puis 300 µL d'une solution aqueuse de DOX à 10 mg/mL sont ajoutés. La réaction est laissée sous agitation pendant 24h. La solution est purifiée par une dialyse contre l'eau.

B. Techniques de caractérisations

Spectroscopie Infrarouge

Les spectres Infrarouge sont enregistrés sur un spectromètre FTIR Bruker Tensor 27 équipé d'un dispositif ATR (réflexion totale atténuée). Les spectres sont enregistrés entre 4000 et 800 cm⁻¹ avec une résolution de 10 cm⁻¹ après 120 scans.

Microscopie électronique à transmission (TEM)

Le microscope utilisé pour observer les images de microscopie électronique à transmission est un JEOL-1400 (cathode LaB₆) équipé d'une caméra ORIUS SC1000 à une tension variant de 80 à 120 kV dans le cadre de la plateforme de microscopie électronique en transmission Imagif du CNRS. Les nanoparticules d'or greffées de polymères ont d'abord été analysées en TEM à une concentration de 0,33 mg/mL. 3 µL de la solution est déposée sur une grille carbone-Cu mesh 400. La grille a été préalablement oxydée sous plasma d'air pour rendre le carbone hydrophile et permettre un bon mouillage de la grille lors du dépôt de la goutte. L'excès de liquide est récupéré avec un papier absorbant. Puis la grille est transférée sur le porte échantillon. Les nanoparticules à une concentration de 5 mg/mL dans l'eau ont également été analysées en cryo-TEM. 3 µL de cette solution sont déposées sur une grille

Lacey Cryo (grille en cuivre recouverte d'un film de carbone comportant des trous de tailles différentes) préalablement traitée. L'excès de liquide est récupéré avec un papier absorbant. La grille est ensuite plongée dans un bain d'éthane liquide refroidi par de l'azote liquide. Toutes ces étapes délicates sont faites par un robot automatisé. La grille est maintenue dans l'azote liquide jusqu'à son transfert rapide dans le porte échantillon.

Pour les micelles de copolymères, la solution utilisée est celle obtenue après nanopréciipitation. 3 µL de cette solution sont déposés sur une grille carbone-Cu mesh 400 préalablement ionisées sous plasma. Au bout de 5 min, l'excès de liquide est récupéré avec un papier absorbant puis 3 µl d'acétate d'uranyle sont ajoutés puis absorbés par du papier. La grille est ensuite transférée sur le porte échantillon.

Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les analyses thermogravimétriques ont été faites sur un appareil Mettler-Toledo TGA/DSC. Pour effectuer la mesure, les nanoparticules sont introduites dans un four *via* une coupelle en oxyde d'aluminium. La température est progressivement augmentée de 25°C à 100 °C avec une rampe de température de 20°C/min. La température reste à 100°C pendant 10 minutes pour éliminer toute trace de solvants résiduels. Ensuite la température est augmentée de 20°C/min jusqu'à 800°C afin d'éliminer toute la partie organique présente sur les nanoparticules. Les expériences sont conduites sous air.

Chromatographie d'exclusion stérique (CES)

Un système PL-GPC 220 (Polymer Laboratories, UK) a été utilisé pour les analyses CES. Les composés sont séparés à l'aide de deux colonnes (Polymer Laboratories) Mixed-E. Ces colonnes ont une taille de particules de 3 µm, une longueur de 300 mm et un diamètre de 7,5 mm. Le domaine de masses analysées est de 200-30000 g/mol. Les colonnes sont thermostatées à 35°C et l'éluant utilisé est du THF à un débit de 1 mL/min. La détection est assurée par un réfractomètre (DRI, Polymer Laboratories, UK). Le système est contrôlée par un logiciel PL-GPC 220 Control®. Les masses molaires sont déterminées à partir d'étalons de PEG ou PS linéaires.

Tests de cytotoxicité : Culture cellulaire, test LDH et test MTT

Les cellules cultivées sont des cellules de type fibroblastes murine (lignée L929) dérivées du tissu sous-cutané et adipeux d'une souris mâle C3H/An. Les cellules L929 sont cultivées dans un milieu de culture cellulaire DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplémenté avec du sérum fœtal de veau et des antibiotiques à 37°C sous une atmosphère humide

contenant 5 % de CO₂. Elles sont cultivées dans des flasques de culture de 75 cm² ou 25 cm² de surface, en polystyrène traité pour la culture cellulaire.

Le passage cellulaire a lieu lorsque les cellules occupent plus de 80-90% de la surface du flasque (soit 80-90% de confluence). Il consiste à changer le milieu cellulaire. Avant de commencer, il faut préchauffer le milieu, le PBS (tampon phosphate) et la trypsine (enzyme) dans le bain marie à 37°C, 10-15min avant leur utilisation. Sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique), le milieu est tout d'abord enlevé à l'aide d'une pipette. Ensuite, les cellules sont lavées deux fois avec 10 mL de PBS afin d'enlever le sérum et les cellules mortes.

1 mL de trypsine est déposé par la suite pour décrocher les cellules adhérentes. L'incubation des cellules avec la trypsine se fait pendant 2-5min dans l'incubateur à 37°C et 5 % de CO₂. Ensuite, 11 mL de milieu propre sont ajoutés afin de désactiver la trypsine. 1/10^{ème} du contenu de la flasque est mise dans une nouvelle flasque et complété avec 11 mL de milieu propre.

Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits à une densité de 2500 cellules/puits pendant 24 heures. Les suspensions de nanoparticules dans l'eau ont été d'abord diluées dans le milieu (degré de dilution dépendant de chaque type de nanoparticules). Au bout de 24 heures, le milieu a été écarté et les cellules ont été lavées avec du PBS. Ensuite les solutions diluées sont déposées dans chaque puits. Les cellules du "blanc" ont été incubées avec le milieu qui ne contient pas de nanoparticules et est dilué à la même proportion que les échantillons. 48 heures après incubation des cellules, nous avons procédé au test MTT et au test LDH :

Test LDH : Le test est réalisé sur les mêmes plaques utilisées pour le test MTT. Chaque dilution est testée dans 4 puits. (Pour ces tests, deux contrôles sont réalisés. Le premier dit négatif réalisé dans 4 nouveaux puits : 10 µl d'eau ultra pure stérile (fourni dans le kit appelé « Spontaneous LDH activity ») sont ajoutés aux cellules. Le second dit positif réalisé également dans 4 puits : 10 µL de tampon de lyse 10X (appelé « Maximum LDH activity ») sont ajoutés aux cellules.) Après incubation, 50 µL de chaque échantillon sont transférés dans une nouvelle plaque de 96 puits et 50 µL d'une solution aqueuse composée de « LDH Substrate Mix contenant l'INT » et de tampon essai LDH sont ajoutés dans chaque puits d'échantillon de la nouvelle plaque. Au bout de 30 min d'incubation à température ambiante, 50 µL d'une solution dite d'arrêt sont ajoutés à chaque puits d'échantillon. L'absorbance à 490 nm a été mesurée afin de déterminer la cytotoxicité.

Test MTT : Chaque dilution est testée dans 8 puits par soucis de reproductibilité. Reprendre la plaque 96 après avoir prélever les 50 µl dans chaque puits pour le test LDH puis compléter les puits avec 50 µL de milieu propre. Ensuite, Il faut ajouter 25 µL de solution MTT à une concentration de 5 mg/mL dilué dans le PBS et incuber 2h à 37°C et 5 % CO₂. Puis, pour dissoudre les cristaux violets de formazan formés, on ajoute 200 µL de DMSO dans chaque puits. L'absorbance du formazan qui est corrélée à la viabilité des cellules dans l'ensemble des puits est alors mesurée à 570 nm par le lecteur de plaques et les données sont traitées de façon à obtenir un pourcentage de viabilité cellulaire pour chaque concentration par rapport aux cellules non traitées.

C. Irradiation

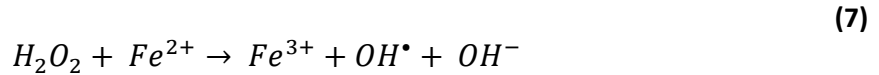
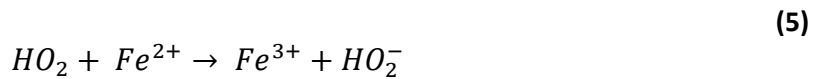
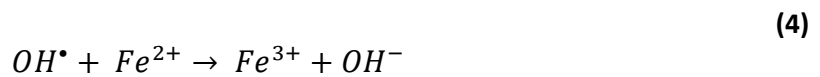
Les nanoparticules d'or greffées de polymère sont dissoutes dans l'eau par agitation mécanique durant une nuit pour obtenir des solutions à 10 mg/mL.

Les nanoparticules de copolymères amphiphiles sont obtenues par une méthode de nanopréciptation. Classiquement, pour le copolymère PEG-*b*-PMA_tBu, 2 mg de copolymère sont dissouts dans 2 mL de THF puis précipité goutte à goutte dans 4 mL d'eau sous une agitation de 300 rpm. L'agitation est poursuivie durant 10 min. Le solvant est ensuite éliminé par dialyse (3 x 500 mL). Pour le copolymère PEG-*b*-PSu, ce sont 5 mg de copolymère qui sont dissouts dans 2 mL de DMSO puis le protocole est le même que précédemment.

Les solutions ainsi obtenues sont ensuite irradiées par une Gammacell. La GammaCell 3000 Elan irradiator est équipé d'une source de ¹³⁷Cs qui émet des rayons gamma d'une énergie de 660 keV. Les solutions déposées dans une enceinte close sont irradiées de manière uniforme et continue. La dose moyenne reçue a été déterminée par une dosimétrie de Fricke et est de 5,5 Gy/min. Le Gray étant l'unité du système internationale et correspond à une dose absorbée d'un Joule par kg.

Une solution de Fricke a été préparée en diluant 22 mL d'acide sulfurique à 99% dans 250 mL d'eau déionisée puis 0,06 g de chlorure de sodium suivi de 0,392 g de sulfate de fer (II) sont ajoutés. La solution est ajoutée à une fiole jaugée d'1 L puis complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déionisée. La fiole est bouchée et conservée à l'abri de la lumière durant 24h avant toute utilisation.

Après irradiation de la solution de Fricke, des produits issus de la radiolyse de l'eau sont en solution : H[•], OH[•], H₂ et H₂O₂. De ce fait plusieurs réactions ont ensuite lieu :



On a ainsi :

$$G(Fe^{3+}) = 2G(H_2O_2) + 3G(H^{\bullet}) + G(OH^{\bullet}) = 15.6 \text{ molécules}/100 \text{ eV à } 25^{\circ}\text{C}.$$

L'irradiation convertit les ions Fe^{2+} en ions Fe^{3+} avec un rendement radiolytique connu. La production d'ions Fe^{3+} est suivie avec un spectromètre UV-Visible. Puis la dose absorbée par la solution de Fricke, DF, est donné par l'équation :

$$DF = \frac{DO}{\varepsilon \times G(Fe^{3+}) \times \rho \times l} \quad (8)$$

Avec DO, l'augmentation de la densité optique à 303 nm et ε le coefficient d'extinction molaire de Fe^{3+} à 303 nm moins le coefficient d'extinction molaire de Fe^{2+} à la même longueur d'onde. La valeur de ε utilisée est de $20205 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. $G(Fe^{3+})$ est le rendement radiolytique de Fe^{3+} , ρ est la densité de la solution de Fricke et l est la longueur parcourue par la lumière dans la cellule.

Dans notre étude, les doses étudiées vont de 40 Gy à 20000 Gy soit environ 10 min jusqu'à plus de 75h d'irradiation avec ou l'absence d'oxygène. L'irradiation de 75h (20000 Gy) n'a pas été faite sans oxygène car le septum utilisé pour maintenir une atmosphère inerte finit par se détériorer et n'est plus étanche sur une période aussi longue. De plus, ces irradiations n'ont pas été faites sous ampoule scellée, car la mise sous pression de ces solutions de micelles n'est pas possible (bullage important).

Annexe 2 : Diffusion de rayonnements

A. Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet de mesurer la taille des particules en solution. Elle repose sur l'étude du mouvement brownien de ces particules. En mesurant les temps de relaxation des particules, on peut remonter à leur coefficient de diffusion. La taille des particules est calculée à partir de ce coefficient de diffusion issu de l'équation de Stokes-Einstein :

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (9)$$

où $d(H)$ est le diamètre hydrodynamique, D est le coefficient de diffusion, k est la constante de Boltzmann, T est la température absolue et η la viscosité du milieu. En DLS, la valeur mesurée correspond donc au diamètre hydrodynamique, le diamètre d'une sphère qui a le même coefficient de diffusion que les particules. Expérimentalement, on mesure l'intensité diffusée, mesurée à un angle donné θ , à partir de laquelle on construit la fonction d'auto-corrélation $G^{(2)}(\tau)$ avec τ le temps de relaxation en fonction du temps. Pour une solution diluée de particules monodisperses en mouvement Brownien, le facteur de forme $F(q, \tau)$ s'écrit :

$$F(q, \tau) = e^{-q^2 D \tau} \quad (10)$$

q est le vecteur d'onde qui est relié à l'angle de diffusion θ et à la longueur d'onde λ du faisceau incident :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (11)$$

La taille des particules, dans notre étude, est obtenue à partir de la méthode des cumulants. Cette méthode consiste à ajuster la fonction de corrélation comme une seule exponentielle permettant d'obtenir une taille moyenne (diamètre moyen) et une estimation de la largeur de la distribution.

Pour déterminer la taille des particules, il faut éviter les interactions entre ces particules. Pour ce fait, il faut travailler à de faibles concentrations.

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière ont été effectuées sur un appareil Malvern Zetasizer ZS. La source de rayonnement est un laser de 4 mW avec une longueur d'onde de 633 nm. Les mesures ont été réalisées à 25 °C. Avant chaque mesure, les solutions aqueuses sont filtrées avec un filtre 0,45 µm afin d'éliminer toutes les impuretés. Les mesures ont été effectuées à 173° et chaque mesure dure environ 10 minutes.

B. Diffusion de rayons X et de neutron aux petits angles

Mesure

Pour les expériences de diffusion aux petits angles, nous avons envoyé un faisceau de rayons X ou neutrons monochromatique de longueur d'onde λ sur l'échantillon. Les rayons X ou neutrons interagissent avec l'échantillon puis sont ensuite diffusés et arrivent sur un détecteur où ils sont comptés en fonction de leur position par rapport au centre du détecteur.

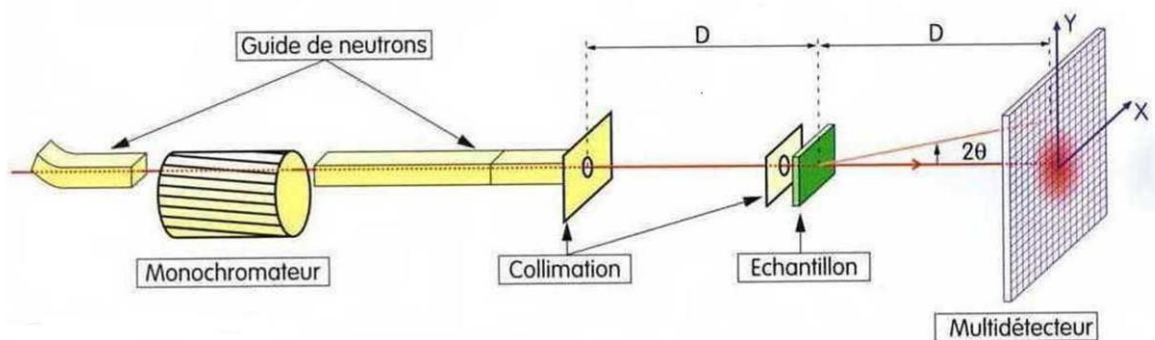


Figure 1 : Spectromètre de diffusion de neutron aux petits angles

La Figure 1 représente le chemin suivi par un faisceau de neutrons dans un spectromètre de DNPA mais il s'applique aussi dans le cas des rayons X.

Pour un échantillon isotrope, l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde q est obtenue en regroupant ensemble les intensités diffusées à même distance du centre du détecteur. Cette courbe $I(q)$ permet d'obtenir toutes les informations sur l'échantillon. Il est important de choisir une gamme de q qui soit adaptée aux distances caractéristiques de l'échantillon ($R \sim 1/q$). Deux paramètres peuvent être réglés pour avoir une gamme de q : la distance échantillon détecteur (D) et la longueur d'onde (λ). Ces deux paramètres sont fixes lors d'une mesure et correspondent à une configuration. Il faut en général deux ou trois configurations pour pouvoir caractériser entièrement un objet.

Les différentes mesures de diffusion de neutron ont été effectuées sur deux spectromètres du Laboratoire Léon Brillouin (LLB) au CEA Saclay. Sur le spectromètre PACE, nous avons travaillé sur trois configurations. La première ($D = 1 \text{ m}$, $\lambda = 4,6 \text{ \AA}$) pour la configuration « grands angles », la deuxième ($D = 3 \text{ m}$, $\lambda = 4,6 \text{ \AA}$) pour la configuration « moyens angles », enfin la troisième ($D = 4,7 \text{ m}$, $\lambda = 13 \text{ \AA}$) pour la configuration « petits angles ». Ces trois configurations ont permis de travailler avec une gamme de q comprise entre $0,005 \text{ \AA}^{-1}$ et $0,3 \text{ \AA}^{-1}$. Sur le spectromètre PA20, nous avons travaillé sur deux configurations. La première ($D = 2 \text{ m}$, $\lambda = 4,6 \text{ \AA}$) pour la configuration « grands angles », la deuxième ($D = 8 \text{ m}$, $\lambda = 4,6 \text{ \AA}$) pour la configuration « moyens angles ». Ces deux configurations ont permis de travailler avec une gamme de q comprise entre $0,006 \text{ \AA}^{-1}$ et $0,25 \text{ \AA}^{-1}$.

Les mesures de diffusion de rayons X ont été effectuées sur un diffractomètre commun au LIONS et au LPS à Orsay équipé d'une source basée sur une anode tournante Rigaku au molybdène ($\lambda_{K\alpha}(\text{Mo}) = 0.711 \text{ \AA}$). On a travaillé avec une gamme de q comprise entre 0.03 \AA^{-1} et 3.15 \AA^{-1} .

Par la suite, on développe le traitement et l'analyse dans le cas de mesures de diffusion de neutron mais ceux en diffusion de rayons X sont très similaires. Avant cela, la notion de contraste dans les cas des neutrons est développée.

Contraste

En DNPA, pour mesurer une intensité diffuse significative, l'objet doit présenter un contraste suffisant avec le milieu dans lequel il se trouve. Ce contraste se calcule à partir de la différence entre les densités de longueur de diffusion ρ de l'objet et du milieu. La densité de longueur de diffusion d'un objet se calcule à partir des longueurs de diffusion cohérente b_i des atomes composant cet objet :

$$\rho_{DNPA} = \frac{d \times N_A}{M} \sum_i a_i b_i \quad (12)$$

où d est la densité du composé en g.cm^{-3} , N_A le nombre d'Avogadro, M la masse molaire du composé en g.mol^{-1} et a_i le nombre d'atomes de longueur de diffusion b_i dans l'objet.

Le contraste se définit comme le carré de la différence entre densités de longueurs de diffusion de l'objet et du milieu ($(\Delta\rho)^2$). Il intervient dans l'expression de l'intensité diffusée (équation (14)).

Traitement

Le traitement des données expérimentales a été fait à partir du logiciel PasiNet développé au LLB. Il est important de traiter les données brutes obtenues après les mesures pour avoir une intensité absolue. En effet, le signal brut tient compte de la diffusion de la cellule (contenant la solution) utilisée (cellule vide), il faut donc la soustraire. Il faut également normaliser le signal par rapport à l'épaisseur de l'échantillon (e) et par la transmission (T) de l'échantillon qui correspond à l'atténuation du faisceau direct lorsque celui-ci le traverse, sans oublier de soustraire l'intensité due au bruit de fond. La valeur absolue de l'intensité diffusée (en cm^{-1}) a pour expression :

$$I_{abs} \propto \frac{\frac{I_{éch} - I_{bdf}}{T_{éch}e_{éch}} - \frac{I_{cv} - I_{bdf}}{T_{cv}e_{cv}}}{\frac{I_{H_2O} - I_{bdf}}{T_{H_2O}e_{H_2O}} - \frac{I_{cv} - I_{bdf}}{T_{cv}e_{cv}}} \quad (13)$$

Enfin lorsque tout ce traitement a été fait, il faut soustraire la partie incohérente du signal qui correspond au signal du solvant. En pratique, on peut utiliser la méthode dite du « point loin » qui consiste à soustraire au signal de l'échantillon à tous les q, la valeur de ce signal à la limite des grands q.

Intensité diffusée

Une fois que les données brutes ont été traitées, le signal obtenu provient exclusivement de la diffusion cohérente. Cette intensité absolue diffusée en fonction du vecteur d'onde q va permettre d'obtenir des informations sur la forme et l'organisation des objets en solution. L'expression de l'intensité diffusée pour des objets centrosymétriques en régime concentré peut s'écrire ainsi :

$$I(q) = \Phi V_{objet} (\Delta\rho)^2 P(q) S(q) \quad (14)$$

Cette expression fait intervenir un facteur de forme P(q) qui décrit la taille et la géométrie des objets et un facteur de structure S(q) qui décrit les corrélations entre objets dans le système.

Facteur de structure

Le facteur de structure donne une information sur la corrélation entre les objets. Il détermine si le système est attractif ou répulsif et d'observer l'intensité de ces interactions. Pour les expériences effectuées, les solutions préparées sont considérées comme être suffisamment diluée pour négliger les corrélations inter-objets ainsi $S(q) = 1$.

Facteur de forme

Le facteur de forme donne une information sur la forme d'un objet individuel. En solution suffisamment diluée, le facteur de structure est égal à 1. Le signal obtenu après traitement est alors seulement dépendant du facteur de forme. Pour des objets sphériques, ce facteur peut être calculé analytiquement. La forme et les dimensions caractéristiques d'un objet diffusant peuvent être déterminées selon des modèles.

Annexe 3 : Spectres XPS

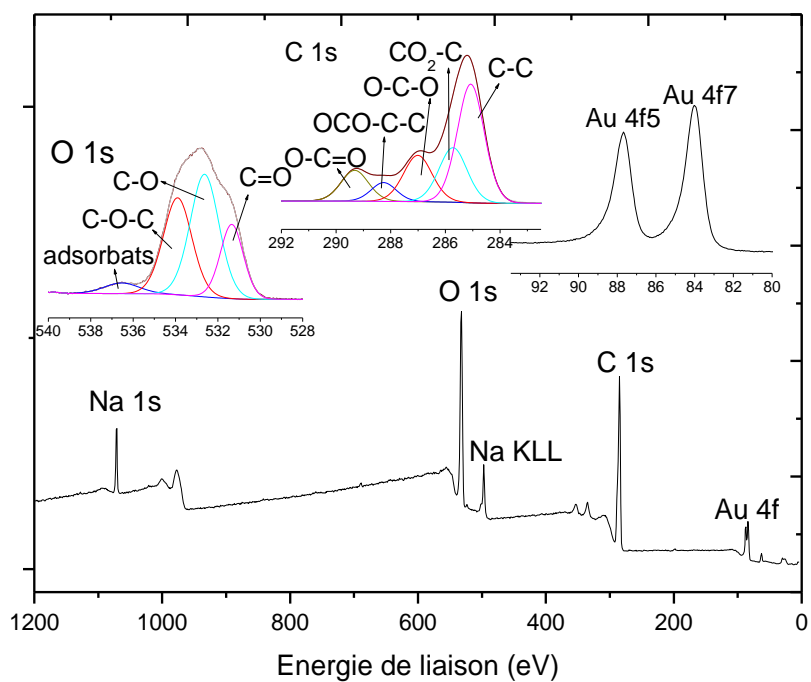


Figure 2 : Spectre XPS des nanoparticules Au-PHEMA-PMAA issues de la précipitation

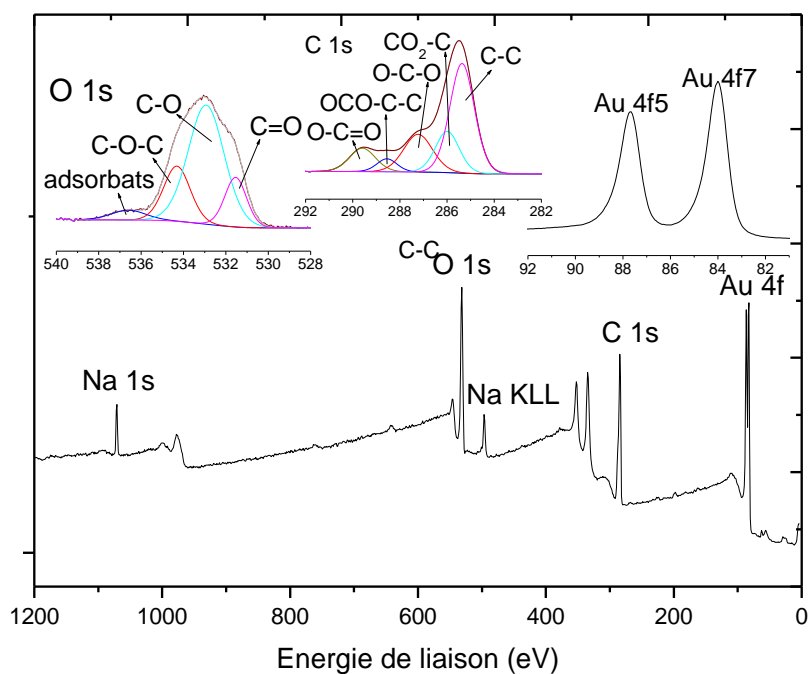


Figure 3: Spectre XPS des nanoparticules Au-PHEMA-PMAA irradiées à 20000 Gy issues de la précipitation

Annexe 4 : Modèles pour des coupures aléatoires

Le modèle de Reed¹ prévoit l'évolution de la polymolécularité en fonction du nombre de coupures aléatoires au sein d'un polymère à partir de l'équation suivante :

(15)

$$Ip(irr) = Ip(0) \times \frac{2(e^{-r} - 1 + r)(1 + r)}{r^2}$$

Dans ce modèle, I_p augmente dans tous les cas avec le nombre de coupure.

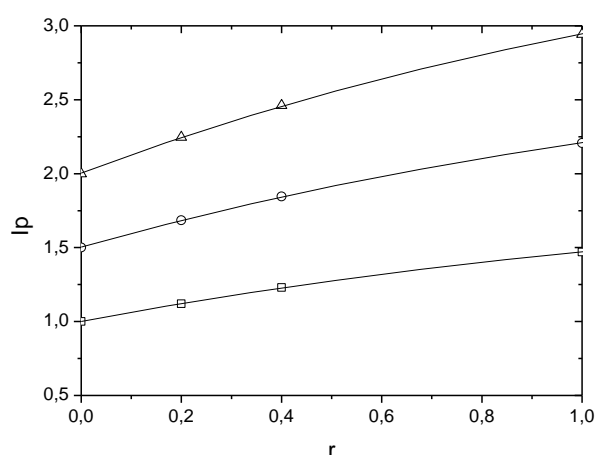


Figure 4 : Evolution théorique de la polymolécularité en fonction du nombre de coupures à partir de l'équation de Reed pour différentes polymolécularités initiales

Cependant, le modèle présenté par Reed sur des coupures aléatoires correspond à des polymères en solution sans hypothèse spécifique sur la forme des distributions en taille.

Dans le modèle d'Inokuti², l'expression de l'équation de la polymolécularité en fonction du nombre de coupures par chaînes polymères contient une donnée β qui exprime la largeur de la distribution de type Poisson³ ou Schulz-Zimm :

(16)

$$Ip(irr) = \frac{2 + 2r}{r} \left\{ 1 - \frac{1}{r} \left[1 - \left(1 + \frac{r}{\beta} \right)^{-\beta} \right] \right\}$$

La valeur de β peut être calculée à partir de l'expression suivante¹ :

¹ Pour $\beta < 1$ la distribution est dite large et pour $\beta > 1$, elle est dite étroite. Lorsque $\beta = 1$, alors la distribution est réduite au type Poisson c'est-à-dire qu'elle ne prend qu'une valeur de polymolécularité de 2.

$$\beta = \frac{1}{Ip(0) - 1}$$

Ainsi différentes courbes de polymolécularité en fonction de r ont été tracées pour des valeurs de β allant de 0,5 à 1,6 sur la Figure 5.

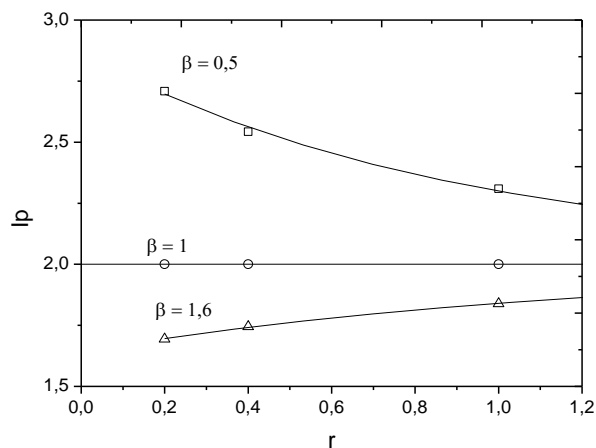


Figure 5 : Evolution théorique de la polymolécularité en fonction du nombre de coupures à partir de l'équation d'Inokuti pour différentes valeurs de β

Lorsque la distribution initiale est large ($\beta=0,5$), la polymolécularité diminue avec le nombre de coupures et tend vers 2. Au contraire lorsque la distribution initiale est étroite, la polymolécularité augmente en tendant vers 2.

Références de l'Annexe 4 :

1. Reed, C. E.; Reed, W. F., Light scattering power of randomly cut random coils with application to the determination of depolymerization rates. *The Journal of Chemical Physics* **1989**, *91* (11), 7193-7199.
2. Inokuti, M., Weight-Average and z-Average Degree of Polymerization for Polymers Undergoing Random Scission. *The Journal of Chemical Physics* **1963**, *38* (5), 1174-1178.
3. Haight, F. A., *Handbook of the Poisson distribution*. John Wiley and Sons: New York [etc.], **1967**.

Annexe 5 : Radiosensibilisation

Auteur	Année	Taille (nm)	Concentration	Coating	Cible biologique	Source d'irradiation	Energie des photons	Critères de radiosensibilisation
Chien¹	2007	20	1 mM	Citrate	CT-26	e ⁻ accélérés	6 MeV	DEF = 1,19
Kong²	2008	10,8	15 nM	Thioglucose	MCF-7	rayons X	220 kVp	DEF = 1,63
					MCF-7	rayons γ	662 keV	DEF = 1,13
			3,85 nM	Cystéamine	MCF-10A	rayons X	220 kVp	DEF = 1
					MCF-7	rayons X	220 kVp	DEF = 1,37
					MCF-7	rayons γ	1,2MeV	DEF = 1,13
Zhang³	2008	30	15 nM	Nu	DU-145	rayons X	200 kVp	DEF = 1,3
				Thioglucose	DU-145	rayons X	200 kVp	DEF = 1,5
Chang⁴	2008	13	11 nM	Citrate	B16F1	e ⁻ accélérés	6 MeV	DEF = 1,02
Liu⁵	2008	4,7	500 μM	PEG	CT-26	rayons X	6 MV	diminution des cellules / irradiation seule
Roa⁶	2009	10,8	15 nM	Glucose	DU-145	rayons γ	662 keV	DEF = 1,5
Rahman⁷	2009	1,9	0,25 mM	Thiol (court)	BAEC	rayons X	80 kVp	DEF = 4
			0,5 mM	Thiol (court)	BAEC	rayons X	80 kVp	DEF = 20
			1 mM	Thiol (court)	BAEC	rayons X	80 kVp	DEF = 24,6
			0,5 mM	Thiol (court)	BAEC	rayons X	150 kVp	DEF = 1,4
			1 mM	Thiol (court)	BAEC	rayons X	150 kVp	DEF = 2,2
			0,5 mM	Thiol (court)	BAEC	e ⁻ accélérés	6 MeV	DEF = 2,9
			0,5 mM	Thiol (court)	BAEC	e ⁻ accélérés	12 MeV	DEF = 3,7

Brun⁸	2009	37,5	ratio NP/protéine 0,0002	Citrate	protéine centrine	rayons X	40 kVp	DEF = 1,48
			0,0002	Citrate	protéine centrine	rayons X	80 kVp	DEF = 1,13
			0,0002	Citrate	protéine centrine	rayons X	120 kVp	DEF = 1,3
			0,0001	Citrate	protéine centrine	rayons X	40 kVp	DEF = 1,15
			0,00002	Citrate	protéine centrine	rayons X	40 kVp	DEF = 1,22
Brun⁹	2009	37,5	ratio ADN/NP 1:1	Citrate	ADN	rayons X	120 kVp	DEF = 3,3
			10 : 1	Citrate	ADN	rayons X	120 kVp	DEF = 1,6
			5:1	Citrate	ADN	rayons X	120 kVp	DEF = 1
			5:1	Citrate	ADN	rayons X	120 kVp	DEF = 3
			1:1	Citrate	ADN	rayons X	120 kVp	DEF = 3
Chithrani¹⁰	2010	14	1 nM	Citrate	Hela	rayons X	220 kVp	DEF = 1,2
			1 nM	Citrate	Hela	rayons X	220 kVp	DEF = 1,43
			1 nM	Citrate	Hela	rayons X	220 kVp	DEF = 1,26
			1 nM	Citrate	Hela	rayons X	105 kVp	DEF = 1,66
			1 nM	Citrate	Hela	rayons γ	660 keV	DEF = 1,18
Liu¹¹	2010	6,1	500 μ M	PEG	EMT-6/CT-26	rayons X	160 kVp	DEF = 1,2
					EMT-6/CT-26	rayons X	6kV	DEF = 2
					EMT-6/CT-26	e ⁻ accélérés	6MeV	DEF = 1,25
					AGO-1552B	rayons X	160kVp	DEF = 1,97
					Astrocyte	rayons X	160kVp	DEF = 0,96
Butterworth¹²	2010	1,9	2,4 μ M	Thiol (court)	DU-145	rayons X	160kVp	DEF = 0,81
					L-132	rayons X	160kVp	DEF = 0,87
					MCF-7	rayons X	160kVp	DEF = 1,09
					MDA-MB-231	rayons X	160kVp	DEF = 1,11

					PC-3	rayons X	160kVp	DEF = 1,02
					T98G	rayons X	160kVp	DEF = 1,91
		0,24µM		Thiol (court)	AGO-1552B	rayons X	160kVp	DEF = 1,16
					Astrocyte	rayons X	160kVp	DEF = 1,04
					DU-145	rayons X	160kVp	DEF = 0,98
					L-132	rayons X	160kVp	DEF = 0,86
					MCF-7	rayons X	160kVp	DEF = 1,41
					MDA-MB-231	rayons X	160kVp	DEF = 1,67
					PC-3	rayons X	160kVp	DEF = 1,07
					T98G	rayons X	160kVp	DEF = 1,3
Rahman¹³	2010	2	1 mM	Dopé dans PAG	BAEC	rayons X	80kVp	DEF = 2
Geng¹⁴	2011	14	5 nM	Thioglucose	SK-OV-3	rayons X	90kVp	DEF = 1,3
					SK-OV-3	e ⁻ accélérés	6 MeV	DEF = 1,2
Jain¹⁵	2011	1,9	12 µM	Thiol (court)	MDA-MB-231	rayons X	160 kVp	DEF = 1,41
					MDA-MB-231	rayons X	6MV	DEF = 1,29
					MDA-MB-231	rayons X	15 MV	DEF = 1,16
					DU-145	rayons X	160 kVp	DEF = 0,92
					DU-145	rayons X	6MV	DEF = 1,13
					L-132	rayons X	160 kVp	DEF = 1,05
					L-132	rayons X	6MV	DEF = 1,08
Xiao¹⁶	2011	5	ND	Nu	ADN	e ⁻ accélérés	60 kev	augmentation des cassures de brin * 2,3
		10	ND	Thiol-undécane	ADN	e ⁻ accélérés	60 kev	augmentation des cassures de brin * 1,6
		13	ND	DTDTPA	ADN	e ⁻ accélérés	60 kev	pas d'augmentation
		13	ND	Gd/DTDTPA	ADN	e ⁻ accélérés	60 kev	pas

Sim¹⁷	2011	50	ND	PEG	DU-145	rayons X	6 MV	d'augmentation diminution des cellules / irradiation seule
Zhang¹⁸	2012	4,8	0,05mM	PEG	Hela	rayons γ	660 keV	DEF = 1,41
		12,1	0,05mM	PEG	Hela	rayons γ	660 keV	DEF = 1,65
		27,3	0,05mM	PEG	Hela	rayons γ	660 keV	DEF = 1,58
		46,6	0,05mM	PEG	Hela	rayons γ	660 keV	DEF = 1,42
		4,8	0,1 mM	PEG	Hela	rayons γ	660 keV	DEF = 1,46
		12,1	0,1 mM	PEG	Hela	rayons γ	660 keV	DEF = 2,07
		27,3	0,1 mM	PEG	Hela	rayons γ	660 keV	DEF = 1,86
		46,6	0,1 mM	PEG	Hela	rayons γ	660 keV	DEF = 1,52
Coulter¹⁹	2012	1,9	12 μ M	thiol (court)	DU-145	rayons X	160 kVp	pareil qu'avec l'irradiation seule
					MDA-MB-231	rayons X	160 kVp	diminution des cellules / irradiation seule
					L-132	rayons X	160 kVp	pareil qu'avec l'irradiation seule
Kumar²⁰	2013	Nu : 2-3 puis ac PEG : 11- 12	0,5 mg/ml	PEG Alexa Fluor 647	Hela	rayons X	220 kVp	augmentation de la mort cellulaire * 1,3
			2 mg/ml	PEG Alexa Fluor 647	Hela	rayons X	220 kVp	augmentation de la mort cellulaire * 2,8
Chattopadhyay²¹	2013	30	ND	Herceptin	MCF-7	rayons X	100 kVp	augmentation de la mort cellulaire * 1,6
			ND	rien	MCF-7	rayons X	100 kVp	Pas

Zhou²²	2013	5 non couplé puis 16-17 couplé	0,1µM DOX	β-cyclodextrin, acide folique	Hela	rayons X	160kVp	d'augmentation de la mort cellulaire augmentation de la mort cellulaire * 2,7
Ngwa²³	2013	50	0,2 mg/ml	Méthyl polymère	Hela	rayons γ	¹²⁵ I 28keV	rDEF = 1,7-2,3
Kaur²⁴	2013	5-9	5,5µM	Glucose	Hela	rayons γ	ND	REF = 1,52
					Hela	ion C+	ND	REF = 1,39
Wang²⁵	2013	13	20 nM	Glucose	A-549	rayons X	6 MV	DEF = 1,49
Bobyk²⁶	2013	1,9	10 mg/ml	thiol (court)	F-98	rayons X	50 keV	DEF = 1,92
		15	10 mg/ml	thiol (court)	F-98	rayons X	50 keV	DEF = 1,4
Joh²⁷	2013	cœur : 12 ac PEG : 23	1 mM	PEG	U-251	rayons X	150 kVp	DEF = 1,3
Zhang²⁸	2014	13,5	Np/cell=100	Polyélectrolytes cationiques	U-712	rayons X	40 kVp	diminution de la dose pour tuer les cellules
Setua²⁹	2014	50	0,087mM	Cisplatine	S1, S2, SP56	rayons γ	660 keV	augmentation de la mort cellulaire
	2014	50		PEI	S1, S2, SP56	rayons γ	660 keV	augmentation de la mort cellulaire
Miladi³⁰	2014	ND	2mM	DTDTPA/Gd	U-87	rayons γ	662 keV	diminution des cellules / irradiation seule
Rahman³¹	2014	1,9	1 mM	thiol (court)	BAEC	rayons X	30 keV	DEF = 1,74
					BAEC	rayons X	40 keV	DEF = 3,47
					BAEC	rayons X	50 keV	DEF = 2,77
					BAEC	rayons X	60 keV	DEF = 3,06

BAEC	rayons X	70 keV	DEF = 1,3
BAEC	rayons X	81 keV	DEF = 2,52
BAEC	rayons X	100 keV	DEF = 1,35

Tableau 3 : Résumé des études de radiosensibilisation de l'or *in vitro* dans la littérature

CT-26 : carcinome du colon (souris) ; DEF : dose enhancement factor ; MCF-7 : adénocarcinome du sein (humain) ; MCF-10A : cellules épithéliales mammaires (humain) ; DU-145 : adénocarcinome de prostate (humain) ; B16F1 : mélanome (souris) ; PEG : polyéthylène glycol ; BAEC : cellules endothéliales d'aorte bovine ; ADN : acide désoxyribonucléique ; Hela : adénocarcinome du col de l'utérus (humain) ; EMT-6 : cellules cancéreuses épithéliales mammaires (souris) ; AGO-1552B : cellules primaires fibroblastes ; Astrocyte : cellules gliales du système nerveux central ; L-132 : fibroblastes pulmonaires producteur de kératine (humain) ; MDA-MB-231 : adénocarcinome métastatique du sein (humain) ; PC-3 : adénocarcinome de prostate (humain) ; T98G : glioblastome cérébral (humain) ; PAG : polyacrylamide gel ; SK-OV-3 : adénocarcinome ovarien (humain) ; DTDTPA : dithiolated diethylenetriaminepentaacetic ; Gd : Gadolinium ; PEG Alexa Fluor 647 : PEG couplé à un fluorophore ; rDEF : residual DNA damage enhancement factor ; DOX : doxorubicine ; REF : radiosensitivity enhancement factor ; A-549 : carcinome pulmonaire (humain) ; F-98 : gliome (rat) ; U-251 : gliome (humain) ; U-712 : glioblastome (humain) ; PEI : polyéthylèneimine ; S1, S2, SP56 : glioblastome cérébral multiforme ; U-87 : glioblastome cérébral (humain).

Diamètre d'une particule (nm)	Masse d'une particule (g)	C _{massique} d'or (mg/mL) pour 1nM en particules	C _{molaire} d'or atomique (nM) pour 1nM en particules
2	8,08.10 ⁻²⁰	4,86.10 ⁻⁵	248
5	1,26.10 ⁻¹⁸	7,59.10 ⁻⁴	3870
10	1,01.10 ⁻¹⁷	6,08.10 ⁻³	31000
15	3,41.10 ⁻¹⁷	2,05.10 ⁻²	105000
20	8,08.10 ⁻¹⁷	4,86.10 ⁻²	248000
30	2,73.10 ⁻¹⁶	0,164	839000
40	6,47.10 ⁻¹⁶	0,389	1990000
50	1,26.10 ⁻¹⁵	0,759	3870000
60	2,18.10 ⁻¹⁵	1,31	6700000
80	5,17.10 ⁻¹⁵	3,11	15900000
100	1,01.10 ⁻¹⁴	6,08	31000000

Tableau 4 : Conversion entre C_{massique} en or et C_{molaire} en or atomique

Références de l'Annexe 5 :

1. Chien, C. C.; Wang, C. H.; Hua, T. E.; Tseng, P. Y.; Yang, T. Y.; Hwu, Y.; Chen, Y. J.; Chung, K. H.; Je, J. H.; Margaritondo, G., Synchrotron X-Ray Synthesized Gold Nanoparticles for Tumor Therapy. *AIP Conference Proceedings* **2007**, 879 (1), 1908-1911.
2. Kong, T.; Zeng, J.; Wang, X.; Yang, X.; Yang, J.; McQuarrie, S.; McEwan, A.; Roa, W.; Chen, J.; Xing, J. Z., Enhancement of Radiation Cytotoxicity in Breast-Cancer Cells by Localized Attachment of Gold Nanoparticles. *Small* **2008**, 4 (9), 1537-1543.
3. Zhang, X.; Xing, J. Z.; Chen, J.; Ko, L.; Amanie, J.; Gulavita, S.; Pervez, N.; Yee, D.; Moore, R.; Roa, W., Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by gold-nanoparticles. *2008* **2008**, 8.
4. Chang, M.-Y.; Shiau, A.-L.; Chen, Y.-H.; Chang, C.-J.; Chen, H. H. W.; Wu, C.-L., Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Science* **2008**, 99 (7), 1479-1484.
5. Chi-Jen, L.; Chang-Hai, W.; Chia-Chi, C.; Tsung-Yeh, Y.; Shin-Tai, C.; Wei-Hua, L.; Cheng-Feng, L.; Kuen-Ho, L.; Hwu, Y.; Yao-Chang, L.; Chia-Liang, C.; Chung-Shi, Y.; Chen, Y. J.; Je, J. H.; Margaritondo, G., Enhanced x-ray irradiation-induced cancer cell damage by gold nanoparticles treated by a new synthesis method of polyethylene glycol modification. *Nanotechnology* **2008**, 19 (29), 295104.
6. Wilson, R.; Xiaojing, Z.; Linghong, G.; Andrew, S.; Xiuying, H.; Yeping, X.; Sunil, G.; Samir, P.; Xuejun, S.; Jie, C.; Ronald, M.; James, Z. X., Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle. *Nanotechnology* **2009**, 20 (37), 375101.

7. Rahman, W. N.; Bishara, N.; Ackerly, T.; He, C. F.; Jackson, P.; Wong, C.; Davidson, R.; Geso, M., Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2009**, *5* (2), 136-142.
8. Brun, E.; Duchambon, P.; Blouquit, Y.; Keller, G.; Sanche, L.; Sicard-Roselli, C., Gold nanoparticles enhance the X-ray-induced degradation of human centrin 2 protein. *Radiation Physics and Chemistry* **2009**, *78* (3), 177-183.
9. Brun, E.; Sanche, L.; Sicard-Roselli, C., Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, *72* (1), 128-134.
10. Chithrani, D. B.; Jelveh, S.; Jalali, F.; Prooijen, M. v.; Allen, C.; Bristow, R. G.; Hill, R. P.; Jaffray, D. A., Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy. *Radiation Research* **2010**, *173* (6), 719-728.
11. Chi-Jen, L.; Chang-Hai, W.; Shin-Tai, C.; Hsiang-Hsin, C.; Wei-Hua, L.; Chia-Chi, C.; Cheng-Liang, W.; Ivan, M. K.; Hwu, Y.; Tsung-Ching, L.; Michael, H.; Chung-Shi, Y.; Yu-Jen, C.; Margaritondo, G., Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Physics in Medicine and Biology* **2010**, *55* (4), 931.
12. Butterworth, K. T.; Coulter, J. A.; Jain, S.; Forker, J.; McMahon, S. J.; Schettino, G.; Prise, K. M.; Currell, F. J.; Hirst, D. G., Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles: potential application for cancer therapy. *Nanotechnology* **2010**, *21* (29), 295101.
13. Rahman, W. N.; Wong, C. J.; Yagi, N.; Davidson, R.; Geso, M., Dosimetry And Its Enhancement Using Gold Nanoparticles In Synchrotron Based Microbeam And Stereotactic Radiosurgery. *AIP Conference Proceedings* **2010**, *1266* (1), 107-110.
14. Geng, F.; Kun, S.; James, Z. X.; Cunzhong, Y.; Shi, Y.; Qifeng, Y.; Jie, C.; Beihua, K., Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer. *Nanotechnology* **2011**, *22* (28), 285101.
15. Jain, S.; Coulter, J. A.; Hounsell, A. R.; Butterworth, K. T.; McMahon, S. J.; Hyland, W. B.; Muir, M. F.; Dickson, G. R.; Prise, K. M.; Currell, F. J.; O'Sullivan, J. M.; Hirst, D. G., Cell-Specific Radiosensitization by Gold Nanoparticles at Megavoltage Radiation Energies. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* **2011**, *79* (2), 531-539.
16. Fangxing, X.; Yi, Z.; Pierre, C.; Yunhui, H.; Darel, H.; Léon, S., On the role of low-energy electrons in the radiosensitization of DNA by gold nanoparticles. *Nanotechnology* **2011**, *22* (46), 465101.
17. Sim, L., Fielding, Andrew, English, Michael, Waclawik, Eric, Rockstroh, Anja, Soekmadji, Carolina, Vasireddy, Raja, Russell, Pamela, & Nelson, Colleen, Enhancement of biological effectiveness of radiotherapy treatments of prostate cancer cells in vitro using gold nanoparticles. In *International Nanomedicine Conference*, Coogee Beach, Sydney, N.S.W., **2011**.
18. Zhang, X.-D.; Wu, D.; Shen, X.; Chen, J.; Sun, Y.-M.; Liu, P.-X.; Liang, X.-J., Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy. *Biomaterials* **2012**, *33* (27), 6408-6419.
19. Coulter, J. A.; Jain, S.; Butterworth, K. T.; Taggart, L. E.; Dickson, G. R.; McMahon, S. J.; Hyland, W. B.; Muir, M. F.; Trainor, C.; Hounsell, A. R.; O'Sullivan, J. M.; Schettino, G.; Currell, F. J.; Hirst, D. G.; Prise, K. M., Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* **2012**, *7*, 2673-2685.

20. Kumar, R.; Korideck, H.; Ngwa, W.; Berbeco, R. I.; Makrigiorgos, G. M.; Sridhar, S., Third generation gold nanoplatfrom optimized for radiation therapy. *Translational cancer research* **2013**, *2* (4), 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.07.02.
21. Chattopadhyay, N.; Cai, Z.; Kwon, Y. L.; Lechtman, E.; Pignol, J.-P.; Reilly, R. M., Molecularly targeted gold nanoparticles enhance the radiation response of breast cancer cells and tumor xenografts to X-radiation. *Breast Cancer Research and Treatment* **2013**, *137* (1), 81-91.
22. Zhou, H.; Zhang, Y.; Su, G.; Zhai, S.; Yan, B., Enhanced cancer cell killing by a targeting gold nanoconstruct with doxorubicin payload under X-ray irradiation. *RSC Advances* **2013**, *3* (44), 21596-21603.
23. Ngwa, W.; Korideck, H.; Kassis, A. I.; Kumar, R.; Sridhar, S.; Makrigiorgos, G. M.; Cormack, R. A., In vitro radiosensitization by gold nanoparticles during continuous low-dose-rate gamma irradiation with I-125 brachytherapy seeds. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2013**, *9* (1), 25-27.
24. Kaur, H.; Pujari, G.; Semwal, M. K.; Sarma, A.; Avasthi, D. K., In vitro studies on radiosensitization effect of glucose capped gold nanoparticles in photon and ion irradiation of HeLa cells. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2013**, *301*, 7-11.
25. Wang, C.; Li, X.; Wang, Y.; Liu, Z.; Fu, L.; Hu, L., Enhancement of radiation effect and increase of apoptosis in lung cancer cells by thio-glucose-bound gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Journal of Nanoparticle Research* **2013**, *15* (5), 1-12.
26. Bobyk, L.; Edouard, M.; Deman, P.; Vautrin, M.; Pernet-Gallay, K.; Delaroche, J.; Adam, J.-F.; Estève, F.; Ravanat, J.-L.; Elleaume, H., Photoactivation of gold nanoparticles for glioma treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2013**, *9* (7), 1089-1097.
27. Joh, D. Y.; Sun, L.; Stangl, M.; Al Zaki, A.; Murty, S.; Santoiemma, P. P.; Davis, J. J.; Baumann, B. C.; Alonso-Basanta, M.; Bhang, D.; Kao, G. D.; Tsourkas, A.; Dorsey, J. F., Selective Targeting of Brain Tumors with Gold Nanoparticle-Induced Radiosensitization. *PLoS ONE* **2013**, *8* (4), e62425.
28. Zhang, P.; Qiao, Y.; Wang, C.; Ma, L.; Su, M., Enhanced radiation therapy with internalized polyelectrolyte modified nanoparticles. *Nanoscale* **2014**, *6* (17), 10095-10099.
29. Setua, S.; Ouberai, M.; Piccirillo, S. G.; Watts, C.; Welland, M., Cisplatin-tethered gold nanospheres for multimodal chemo-radiotherapy of glioblastoma. *Nanoscale* **2014**, *6* (18), 10865-10873.
30. Miladi, I.; Alric, C.; Dufort, S.; Mowat, P.; Dutour, A.; Mandon, C.; Laurent, G.; Bräuer-Krisch, E.; Herath, N.; Coll, J.-L.; Dutreix, M.; Lux, F.; Bazzi, R.; Billotey, C.; Janier, M.; Perriat, P.; Le Duc, G.; Roux, S.; Tillement, O., The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents. *Small* **2014**, *10* (6), 1116-1124.
31. Wan Nordiana Rahman, S. C., Naoto Yagi, Siti Aishah Abdul Aziz, Nathan Annabell, Moshi Geso, Optimal energy for cell radiosensitivity enhancement by gold nanoparticles using synchrotron-based monoenergetic photon beams. *International Journal of Nanomedicine* **2014**, *9* (1), 2459-2467.

Titre : Nano-objets hybrides et polymères sous irradiation

Mots clés : micelles/nanoparticules polymères, nanoparticules d'or greffées de polymères, polymérisation radicalaire contrôlée, chimie click, irradiation, diffusion de neutron aux petits angles

Résumé : Les nano-objets hybrides ou polymères connaissent un intérêt grandissant depuis plusieurs années mais peu sont étudiés sous irradiation. Dans ce travail, différents nano-objets ont été synthétisés et étudiés pour comprendre leur stabilité face à des rayonnements ionisants. Nous avons étudié l'effet de l'irradiation sur des copolymères à blocs amphiphiles pouvant s'organiser en micelles dans l'eau. Les objets varient par la nature de leur polymère hydrophobe et leur sensibilité aux rayonnements ionisants. Dans un cas, des polyméthacrylates ont été copolymérisés par ATRP à partir d'un PEG macro-amorceur. Dans un autre cas, pour accentuer l'effet de l'irradiation, un polysulfone

aliphatique plus radiosensible, a été synthétisé *via* une polyaddition thiol-ène.

Après nanoprecipitation, les objets ont été caractérisés avant et après irradiation par des techniques de diffusion et de chromatographie. En parallèle, on s'est intéressés également à des nanoparticules métalliques connues pour augmenter l'effet de l'irradiation. Des nanoparticules d'or greffées de polymères ont été synthétisées par voie « grafting to » après synthèse de macro-ligands par polymérisation radicalaire contrôlée. Après une caractérisation fine des objets, l'effet de l'irradiation a été étudié sur la taille des objets et la masse molaire des polymères afin de déterminer la nature des phénomènes mis en jeu.

Title : Hybrid and polymer nano-objects under irradiation

Keywords : polymer micelles/nanoparticles, polymer-grafted gold nanoparticles, controlled radical polymerization, click-chemistry, irradiation, small-angle neutron scattering

Abstract : Hybrid and polymer nano-objects have known a growing interest these last years but few are studied under irradiation. In the present work, different nano-objects have been synthesized and studied to understand their stability towards ionizing rays. We have studied the effect of irradiation onto amphiphilic bloc copolymer that form micelles in water. Objects were varied by the nature of their hydrophobic bloc and their sensibility to ionizing rays. First, methacrylates were copolymerized by ATRP with a PEG macro-initiator. Secondly, to improve radiation effect, a more radiosensitive polymer, a polyolefinsulfone, was synthesized by a thiol-

ene polyaddition. After nanoprecipitation, objects were characterized before and after irradiation by scattering and chromatography techniques. In parallel, we also studied metallic nanoparticles well known for improving irradiation effect. Polymer-grafted gold nanoparticles were synthesized *via* a "grafting to" technique, after the synthesis of macro-ligands by controlled radical polymerization. After a precise characterization of these objects, irradiation effect has been studied *via* changes in size and polymer molecular weight. This will permit to determine the nature of induced phenomena.

