



HAL
open science

Nanoparticules hybrides thermosensibles pour la théranostique

Stéphanie Louguet

► **To cite this version:**

Stéphanie Louguet. Nanoparticules hybrides thermosensibles pour la théranostique. Polymères. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2011. Français. NNT : 2011BOR14242 . tel-01446654

HAL Id: tel-01446654

<https://theses.hal.science/tel-01446654>

Submitted on 26 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.

N° d'ordre : 4242



THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par **Stéphanie LOUGUET**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : Polymères

**NANOPARTICULES HYBRIDES THERMOSENSIBLES POUR LA
THERANOSTIQUE**

Soutenue le 5 Avril 2011

Devant la commission d'examen formée de :

M J.F. Berret	Directeur de recherche, CNRS, Université Paris 7	Rapporteur
M H.A. Klok	Professeur, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne	Rapporteur
M J.M Devoisselle	Professeur, Université de Montpellier 1	Examineur
M E. Papon	Professeur, Institut Polytechnique de Bordeaux	Examineur
M C. Schatz	Maitre de conférences, Institut Polytechnique de Bordeaux	Examineur
M P. Voisin	Maitre de conférences, Université de Bordeaux 2	Examineur
M E. Duguet	Professeur, Université de Bordeaux 1	Examineur
M S. Lecommandoux	Professeur, Institut Polytechnique de Bordeaux	Examineur

Titre en anglais

Hybrid and thermosensitive nanoparticles for theranostic applications

Cette thèse a été rédigée en utilisant, pour chaque chapitre, le format habituellement adopté dans les articles scientifiques paraissant dans des revues à comité de lecture. L'indulgence du lecteur est ainsi sollicitée pour les répétitions et redites nécessairement inhérentes à la forme de rédaction choisie.

Remerciements

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un programme de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) rassemblant différents laboratoires de la communauté bordelaise : le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO), l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB), le centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques (RMSB) et l'Institut des Neurosciences de Bordeaux (INB) ainsi que la société Guerbet[®]. Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements au Professeur Klaus Petry pour avoir porté ce projet et à l'ANR pour le financement.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Henri Cramail, directeur du LCPO, et à Monsieur Claude Delmas, directeur de l'ICMCB, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire respectif et m'avoir permis ainsi de réaliser ce travail.

Je remercie les Professeurs Sébastien Lecommandoux et Etienne Duguet de m'avoir fait confiance et donner l'opportunité de travailler sur ce projet de thèse.

C'est lors des enseignements que Sébastien dispensait lors de ma formation d'ingénieur qu'il m'a donné envie de travailler sur la thématique des polymères pour le vivant. Il m'a ensuite accueillie dans son équipe lors de mon stage de master et m'a transmis sa passion pour la recherche, nous avons donc logiquement poursuivi cette collaboration lors de cette thèse. Tout au long de ces années, il m'a énormément appris, guidé et soutenu, et pour tout ça, je lui en suis extrêmement reconnaissante.

Quant à Etienne, il m'a toujours ouvert sa porte et m'a toujours prodigué de bons conseils. Ses qualités scientifiques et surtout son calme ont été salvateurs lors des moments difficiles.

Je tiens également à remercier Monsieur Christophe Schatz de m'avoir guidée tout au long de mon stage de recherche ainsi que lors de ma thèse. Sa rigueur scientifique et ses remarquables compétences ont permis l'accomplissement de ce travail. Je souhaite ainsi lui témoigner toute ma gratitude pour ses qualités scientifiques et pour sa bonne humeur qui ont contribué à un quotidien captivant.

C'est grâce à cet environnement et à la confiance de mes encadrants que j'ai pu m'épanouir dans ce milieu, acquérir une méthode de travail et une démarche scientifique et m'accomplir en tant que chercheuse. Par ces mots, je souhaite que chacun comprenne tout ce qu'ils représentent pour moi. J'espère que nos chemins se recroiseront.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui ont participé à mes travaux de thèse ; en particulier, Romain Epherre « mon producteur de particules perovskites », Stéphane Mornet et Graziella Goglio pour leur aide sur la synthèse des nanoparticules de silice et leurs connaissances sur ces matériaux, Lydia Raison pour son aide sur les expériences d'hyperthermie, le Professeur Gilles Sigaud pour son implication dans les expériences de calorimétrie de titration isotherme, Antonios Vekris, Claudine Boiziau et le Professeur Klaus Petry pour les expérimentations animales, Sylvain Miraux et Gérard Raffard pour les évaluations par imagerie par résonance magnétique et enfin Véronique Bouchaud et le Professeur Pierre Voisin pour les évaluations de toxicité cellulaire.

Je remercie également Anita C. Kumar et Bérengère Rousseau pour leur aide et leur participation aux travaux sur les protéines et les études de chargement en principe actif.

Je tiens également à remercier Nicolas Guidolin pour son implication dans les expériences de diffusion de la lumière et de chromatographie et surtout pour son amitié et sa bonne humeur.

Je remercie aussi Elisabeth Garanger dont les précieux conseils m'ont permis de mettre en place la stratégie de fonctionnalisation des nanoparticules ainsi que pour son écoute et sa bonne humeur, qui m'ont été si chères.

Je tiens aussi à remercier Messieurs Olivier Sandre et Jean-François Le-Meins qui m'ont accueillie si gentiment dans leur bureau pendant la rédaction de ce manuscrit, améliorant cette période parfois complexe de par leurs connaissances scientifiques et les discussions annexes.

Je tiens à remercier vivement les membres de mon jury, particulièrement le Professeur Harm-Anton Klok et Monsieur Jean-François Berret pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également le Professeur Jean-Marie Devoisselle et Monsieur Pierre Voisin d'avoir participé à ce jury et le Professeur Eric Papon de l'avoir présidé.

Pour tous les bons moments passés ensemble, les soirées délirantes, les pauses café, les fous rires, discussions et tout le reste, je remercie toutes les personnes qui ont permis de rendre le travail au quotidien plus agréable. Pour n'en citer que quelques-uns : Anne-Claire, Chantal, Laurent, Charles, Julie, Floraine, Aurélien, Stéphane, Samira, Maité, Valentina, Anne-Laure, Bertrand, Julien, Charlotte, Harry, Hugo, Willy, Antoine, Cédric, Jean, Kamal. Je n'oublierai jamais cette période de ma vie à la fois exigeante et heureuse. C'est grâce à vous que j'ai aussi bien vécu cette thèse ; les liens que nous avons tissés sont plein d'avenir.

Sur un plan plus personnel, je profite également de cette occasion pour remercier les membres de ma famille, Aurore, Maman et Olivier, dont la patience a été mise à rude épreuve (surtout lors de la phase finale ...). Je ne l'ai jamais vraiment dit de vive voix mais je vous remercie infiniment pour votre écoute, soutien, aide et surtout votre amour.

Enfin, mes derniers remerciements vont vers Marc-André, mon soutien indéfectible de chaque jour.

Stéphanie

Sommaire

Introduction générale	1
Liste des abréviations	5
Chapitre I. Etude bibliographique	7
1 Introduction	8
2 Systèmes hybrides polymères/nanoparticules magnétiques pour la théranostique	9
2.1 Concept de « théranostique »	9
2.2 Les stratégies de ciblage	10
2.3 La libération des principes actifs	15
2.4 Techniques d'imagerie médicale	22
2.5 Nano-vecteurs multifonctionnels	28
3 Polymères aux interfaces	29
3.1 Stabilité colloïdale	29
3.2 Voie de fonctionnalisation de colloïdes	37
3.3 Adsorption d'homopolymères	38
3.4 Adsorption de copolymère à blocs	48
3.5 Conformations des chaînes aux interfaces	53
3.6 Stabilité en milieux biologiques	58
4 Systèmes à base de polymères thermosensibles	65
4.1 Polymères à LCST en solution	65
4.2 Systèmes polymères auto-assemblés à LCST	70
4.3 LCST aux interfaces	73
5 Conclusion	77
6 Références	78
Chapitre II. A physico-chemical investigation of poly(ethylene oxyde)-<i>block</i>-poly(L-lysine) copolymer adsorption onto silica nanoparticles	87
1 Introduction	89
2 Materials and methods	91
2.1 Materials	91

2.2	Synthesis and characterization of silica nanoparticles	91
2.3	Polymer and block copolymer synthesis and characterization	91
2.4	Complexation profile of PEO-b-PLL onto silica nanoparticles	92
2.5	Polymer and copolymer adsorption measurements	93
2.6	Electrophoretic mobility measurement	94
2.7	TEM and SEM analysis	94
2.8	ITC measurements	94
3	Results and discussion	95
3.1	Adsorption of PEO-b-PLL copolymer onto silica particles	95
3.2	Adsorption of homo-PEO and homo-PLL onto silica particles: competitive and displacement experiments	100
3.3	Microcalorimetry study	102
4	Conclusion	107
5	References	108
6	Annexes	110
6.1	Chemical characterization of the block-copolymer PEO ₁₁₃ -b-PLL _n and homopolymer PLL _m	110
6.2	Silica particles titration	115
6.3	Polymer titration	117
6.4	Adsorption isotherm of PEO onto silica particles	120
6.5	References	120
Chapitre III. Controlling the grafting density of PEO chains at silica particle surface by adsorption of PEO-<i>block</i>-poly(L-Lysine) copolymers : role of the anchor size block and the ionic strength.....		
1	Introduction	123
2	Materials and methods	124
2.1	Materials	124
2.2	Polymers synthesis	124
2.3	Small Angle Neutron Scattering (SANS)	125
2.4	Adsorption isotherms	126
2.5	Formation of PEO-b-PLL coated silica nanoparticles	126
2.6	Dynamic light scattering (DLS) and static light scattering (SLS) analysis	127

2.7	Microelectrophoresis.....	127
2.8	Isothermal titration calorimetry (ITC)	127
3	Results and discussion.....	128
3.1	Adsorption of PEO-b-PLL copolymers onto silica nanoparticles.....	128
3.2	Conformation of the adsorbed PEO-b-PLL chains at the particle surface	133
3.3	Protein adsorption onto PEO-b-PLL copolymer coated silica particles.....	137
3.4	pH stability of PEO-b-PLL coated particles	142
4	Conclusion.....	143
5	References	144
6	Annexes.....	147
6.1	Block copolymer desorption induced by proteins adsorption onto hybrid nanoparticles.	147
6.2	ITC experiments	148
Chapitre IV. Controlled drug release at nanoparticle surface through synergistic effects of thermoresponsive polymer brushes and magnetically induced heat.....		151
1	Introduction.....	153
2	Materials and methods	156
2.1	Materials	156
2.2	PLL-based block-copolymers synthesis and characterization.....	156
2.3	Block-copolymer adsorption	157
2.4	Doxorubicin loading	159
2.5	Drug release studies.....	160
3	Results and discussion.....	161
3.1	Block-copolymer adsorption onto LSMO@silica MNPs	161
3.2	Thermoresponsivity of the polyether polymers in solution	163
3.3	Thermoresponsivity of the polymeric corona.....	165
3.4	Modulation of the corona thermoresponsivity by co-adsorption of copolymers with different LCST values.....	167
3.5	Drug loading	170
3.6	Drug release	172
4	Conclusion.....	175
5	References	176
6	Annexes.....	179

6.1	LSMO@SiO ₂ MNPs synthesis.....	179
6.2	Determination of the degree of polymerization n of the poly(TFA L-lysine) segments within the block-copolymers PEO ₁₁₃ -b-PLL _n and P(EO _x -co-PO _y)-b-PLL _n	180
6.3	Doxorubicin stability in aqueous media	186
6.4	Drug release setup	189
6.5	Determination of the polyether-block grafting density on LSMO@SiO ₂ MNPs	190
6.6	PEO-coated MNPs stability	191
6.7	dn/dc measurements of PEO-coated MNPs as a function of temperature	192
6.8	Adsorption isotherms of PLL-based BCPs onto LSMO@SiO ₂ MNPs.....	193
6.9	References	194
Chapitre V. Multifunctional nanoparticles for brain diseases diagnosis.....		195
1	Introduction	197
2	Materials and methods	200
2.1	Materials	200
2.2	Synthesis of PEO-based block copolymers	200
2.3	Co-adsorption of PEO-based copolymers on LSMO@silica MNPs.....	201
2.4	Peptide and dye labeling of PEO-coated MNPs.....	201
2.5	MRI relaxometry	201
2.6	Heating experiments.....	202
2.7	Cell culture and cytotoxicity assay.....	202
2.8	Cation leaching studies	202
2.9	Neuroinflammation induction	203
2.10	In vivo MR imaging	203
2.11	Ex vivo fluorescence imaging	203
3	Results and discussion.....	204
3.1	Synthesis of PEO-b-PLL copolymers	204
3.2	Co-adsorption of PEO-b-PLL block copolymers onto LSMO@silica MNPs and their derivatization	206
3.3	Heating experiments in AMF	208
3.4	MRI relaxometry	210
3.5	Cytotoxicity assays	211
3.6	In-vivo evaluation of multimodal imaging particles: MRI and fluorescence.....	214

4	Conclusion	217
5	References	218
6	Annexes.....	221
6.1	LSMO@SiO ₂ MNPs synthesis.....	221
6.2	MNPs functionalization	222
6.3	References	222
	Conclusion générale	223

Introduction générale

La nanomédecine est une branche des nanotechnologies qui étudie la possibilité de diagnostiquer des maladies et d'apporter des solutions thérapeutiques à l'aide de systèmes moléculaires possédant des dimensions typiques de l'ordre de la centaine de nanomètres qui peuvent être ainsi injectés dans la circulation sanguine. La plupart des dispositifs étudiés actuellement sont des nanoparticules organiques ou inorganiques permettant de transporter des agents de contraste pour le diagnostic ou des molécules pharmaceutiques pour soigner des pathologies sévères comme le cancer. Le principal avantage offert par cette technologie est la possibilité de cibler spécifiquement des tissus ou des organes malades, réduisant ainsi les doses injectées tout en améliorant l'efficacité globale du diagnostic ou de la thérapie. A ce jour, les formulations exploitant cette technologie sont peu nombreuses sur la marché, mais il est certain que l'important effort de recherche académique et industriel porté dans ce domaine devrait offrir les prochaines années de nouvelles solutions médicales et générer également une importante activité économique.

Le projet de thèse s'inscrit dans cette thématique de recherche et a pour objectif ambitieux de concevoir un système colloïdal offrant la double possibilité de diagnostic et de thérapie. L'idée d'associer ces deux fonctions au sein d'un même système est relativement récente en nanomédecine et est désormais connue sous le terme de 'théranostique'. Plus précisément l'objectif de cette thèse est de développer un tel système pour cibler le système nerveux central (SNC) afin d'apporter une solution thérapeutique au traitement des gliomes ou de certaines maladie auto-immunes telle que la sclérose en plaques. Le SNC est un organe difficile à atteindre car il requiert le franchissement de la barrière hémato-encéphalique qui est une barrière étanche à la diffusion de nombreux composés. La stratégie retenue en collaboration avec des équipes de biologistes, physiciens et biophysiciens consiste à développer des nanoparticules constituées d'un cœur magnétique jouant à la fois le rôle d'agents de contraste pour l'IRM et d'inducteur de chaleur par effet d'hyperthermie et d'une couronne polymère remplissant elle-même trois fonctions distinctes, l'apport de stabilité en milieu physiologique, un volume permettant le transport d'un principe actif et sa libération par hyperthermie et le greffage de ligands de reconnaissance biologique. Ainsi, dans une situation idéale, l'IRM permettra de localiser les sites de ciblage des nanoparticules dans le SNC et l'application d'un champ magnétique déclenchera alors un échauffement local suffisant pour induire une modification des propriétés de solubilité de la couronne polymère associée à la libération du principe actif.

La conception d'un tel système multifonctionnel a été mise en œuvre à partir de particules magnétiques (oxydes de manganèse) d'une centaine de nanomètres de diamètre et présentant une température de Curie voisine de 43°C. Ces particules ont été enrobées d'une fine couche de silice afin de faciliter leur fonctionnalisation de surface. C'est à ce stade que la contribution du présent de travail de thèse a démarré.

Parmi les différentes options possibles, il a été choisi de greffer une couronne de polymère par une voie non covalente afin de faciliter l'élimination ultérieure des macromolécules par des processus biologiques. Dans le domaine de la vectorisation, la PEGylation des nanoparticules c'est-à-dire le greffage de chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) ou de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) à la surface des particules peut être considéré comme un dogme dans la mesure où il a été largement démontré que le PEO diminuait de façon considérable la reconnaissance des particules et leur élimination consécutive par le système immunitaire. Par ailleurs, il est aisé de nos jours de se procurer des PEO portant des fonctions spécifiques à leurs extrémités pouvant être mises à profit pour greffer un ligand biologique ou amorcer la synthèse d'un bloc polymère. C'est justement cette dernière stratégie qui a été retenue car l'adsorption de copolymères à blocs à base de PEG par interactions faibles à la surface des particules devrait être à même d'apporter au système la multifonctionnalité requise. En effet, la modification de surfaces par adsorption de copolymères à blocs offre le double avantage de pouvoir contrôler aisément les quantités adsorbées et de varier aussi la composition de la couche adsorbée en utilisant des mélanges de copolymères. Cette versatilité dans l'élaboration de la couronne polymère est très souhaitable par rapport aux objectifs du projet. La surface de la silice étant chargée négativement, la poly(L-lysine) a été choisie comme bloc adsorbant en raison de sa charge positive à pH physiologique. La polylysine est un polypeptide qui a été particulièrement utilisé pour concevoir des systèmes de vectorisation tels que les dendrimères, les copolymères à blocs amphiphiles ou les nanogels pour la vectorisation d'ADN en particulier. Les copolymères à blocs de type poly(oxyde d'éthylène)-*bloc*-poly(L-lysine) joueront ainsi un rôle primordial dans la construction du nano-vecteur tant pour l'encapsulation du principe actif que pour le ciblage biologique. Cependant les propriétés de solubilité du PEO sont relativement constantes dans la plage de températures 37-43°C et ainsi un copolymère d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène poly(EO-*stat*-PO) présentant une transition de phase dans cette gamme de températures sera utilisé en complément. Le comportement des polymères thermosensibles aux interfaces étant peu connu à ce jour, une étude spécifique devra être réalisée afin d'élucider l'influence du confinement des chaînes polymères sur l'amplitude de la transition de phase. De même l'encapsulation de la doxorubicine, choisie comme agent anticancéreux modèle, dans la couronne polymère thermosensible devra être optimisée et les mécanismes de libération en présence ou absence d'un champ magnétique seront étudiés. L'adsorption de la couronne polymère étant susceptible de modifier les propriétés magnétiques, ces dernières devront être évaluées à différentes étapes du projet. Enfin, les vecteurs seront dotés d'une vraie capacité de ciblage biologique du SNC grâce à un ligand peptidique identifié par phage display. L'évaluation globale du vecteur multifonctionnel sera effectuée en suivant par IRM et par imagerie en fluorescence le devenir des vecteurs injectés chez l'animal.

Une des plus grandes difficultés à maîtriser au cours de ce projet est la stabilité colloïdale des particules à chaque étape de la construction du vecteur. En effet, partant de particules avec un diamètre proche de la centaine de nanomètres il est légitimement espéré que la taille finale du colloïde fonctionnalisé ne dépasse pas 150 nanomètres.

Or il est connu que la stabilité colloïdale est sensible aux conditions physicochimiques du milieu d'une part et à la nature chimique et aux masses molaires des polymères adsorbés. Ainsi, une attention toute particulière a été portée à l'évaluation des dimensions hydrodynamiques du vecteur à chaque étape de sa construction. Par ailleurs, sa stabilité en présence de protéines a également été déterminée afin d'appréhender les propriétés colloïdales dans des conditions physiologiques.

Le manuscrit de thèse est organisé en cinq chapitres. Le premier chapitre est un état de l'art des systèmes de vectorisation dits multifonctionnels. La physicochimie de l'adsorption des polymères et des copolymères sera aussi largement détaillée en raison de l'importance expérimentale qui lui a été accordée au cours de ce projet. En particulier, le comportement des polymères thermosensibles aux interfaces sera présenté. La partie expérimentale du travail de thèse est présentée sous forme d'articles scientifiques qui ont été soumis ou qui sont en cours de soumission à différents éditeurs de journaux. Le premier article détaille les mécanismes d'adsorption d'un copolymère PEO-*b*/oc-poly(L-Lysine) de composition donnée à la surface de nanoparticules modèles de silice. Le deuxième article présente l'influence de la composition chimique des copolymères et de la force ionique sur la structure et la conformation de la couche de copolymère adsorbée avec une attention toute particulière à son comportement en présence de protéines. Dans un troisième article la thermosensibilité des copolymères adsorbés à la surface de particules magnétiques est abordée et en particulier son rôle sur les propriétés d'encapsulation et de libération de la doxorubicine a été étudiée en détail. Enfin, la fonctionnalisation des copolymères à blocs par des ligands peptidiques spécifiques ainsi que les propriétés de ciblage biologique des vecteurs sont évaluées dans un quatrième et dernier article.

Liste des abréviations

AAm : Acrylamide

AMA : Diméthylaminoethyl methacrylate

ARTP : Atom transfert radical polymerisation

BSA : Albumine de sérum bovin

c^* : Concentration en monomères dans une pelote

cmc : Concentration micellaire critique

\overline{DP} : Degré de polymérisation

EHEC : éther de cellulose

EPR : Enhanced Permeability and Retention

F : Energie libre

F_{el} : Energie libre élastique

F_{int} : Energie libre d'interaction

HMAAm : Hydroxyméthylacrylamide

HMA : dihydroxypropyl methacrylate

LbL : Layer by layer

MEO₂-MA : Méthacrylate de 2-(2-méthoxyéthoxy)éthyle

N : Degré de polymérisation

N-tBAAm : N-test butyl-acrylamide

OEGMA : Oligo méthacrylate d'éthylène glycol

P2VP : Poly(2-vinylpyridine)

P4VP : Poly(4-vinylpyridine)

PAA : Poly(acide acrylique)

PAMPA : Poly(méthacrylamide de chlorure de N-(3-propylammonium))

PAMPS : Poly(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate de sodium)

PBMA : Poly(méthacrylate de butyle)

PCL : Poly(ϵ -caprolactone)

PDADMA : Poly(diallyldiméthylammonium)

PDEAAm : Poly(N,N'-diethylacrylamide)

PDMAEMA : Poly(méthacrylate de 2-diméthylaminoéthyle)

PDMS : Poly(diméthylsiloxane)

PEG : Poly(éthylène glycol)

PEO : Poly(ethylene oxyde)

PEtOx : Poly(1-éthyl-2-oxazoline)

PGA : Poly(acide glutamique)
PHPMA : Poly(N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide)
PLL : Poly(L-lysine)
PMAA : Poly(acide méthacrylique)
PMEMA : Poly(N-morpholino éthyl méthacrylate)
PNIPAAm : Poly(N-isopropylacrylamide)
PNVCL : Poly(N-vinylcaprolactame)
PPO : Poly(propylene oxyde)
PPS : Poly(sulfure de propylène)
PS : Polystyrène
PTMC : Poly(triméthylène carbonate)
PVME : Poly(méthyl éther de vinyle)
PVP : Poly(vinylpyrrolidone)
 R_F : Rayon de Flory
 R_g : Rayon de gyration
 R_H : Rayon hydrodynamique
ROP: Ring-opening polymerization
TFA L-Lys NCA : ϵ -trifluoroacetyl L-lysine *N*-carboxyanhydride
Z : Rapport molaire de charge
 ξ : Taille d'un blob
 Γ : Quantité adsorbée
 k_{ads} : Constante d'adsorption
 k_{des} : Constante de désorption
 μ : Mobilité électrophoretique
 ζ : Potentiel zétâ
 v_{ads} : Vitesse d'adsorption
 v_{des} : Vitesse de désorption

Chapitre I. Etude bibliographique

1 Introduction

Ce projet de thèse a pour ambition de développer des nanoparticules (NPs) multifonctionnelles combinant à la fois des propriétés de diagnostic et de thérapie. Ces systèmes sont composés d'un cœur magnétique jouant le rôle d'agents de contraste pour l'IRM et d'inducteur de chaleur par hyperthermie, d'une couronne polymère constituée de macromolécules thermosensibles permettant d'encapsuler et de libérer des principes actifs, et enfin, de molécules de reconnaissance assurant la spécificité biologique de la vectorisation. L'enjeu majeur de ce projet consiste donc à fonctionnaliser les NPs inorganiques avec une couronne polymère générant un volume pour l'encapsulation de principes actifs, qui soit thermo-stimulable pour induire leur libération et enfin, fonctionnalisable par des ligands biologiques pour permettre un ciblage actif des particules.

La première partie de cette étude bibliographique concerne les systèmes hybrides polymères/nanoparticules magnétiques pour la théranostique. Cette partie a pour objectif de présenter les aspects principaux de ce concept tels que le ciblage et les mécanismes de libération de principe actifs ainsi que les techniques d'imagerie médicale associées. La deuxième partie concerne les différentes voies d'immobilisation des chaînes polymères aux interfaces solide/liquide ainsi que les propriétés de ces systèmes en terme de stabilité colloïdale et d'interactions avec les protéines. Enfin, la dernière partie de ce chapitre concerne la thermosensibilité des brosses polymères.

2 Systèmes hybrides polymères/nanoparticules magnétiques pour la théranostique

Cette partie a pour objectif de présenter le concept général de théranostique ainsi que les différents éléments qui composent des systèmes multifonctionnels offrant des propriétés de thérapie et de diagnostique.

2.1 Concept de « théranostique »

Les avancées récentes dans le domaine des biotechnologies ouvrent la voie à des systèmes multifonctionnels combinant à la fois des propriétés de diagnostic et de thérapie. On parle alors de théranostique. La littérature scientifique est désormais riche d'exemples de ces nanoparticules (NPs) multifonctionnelles associant un vecteur (polymère) à des agents thérapeutiques et à des agents de contraste pour l'imagerie (Figure 1). Leurs applications ouvrent des perspectives prometteuses en particulier dans le domaine de la thérapie guidée par imagerie. Néanmoins, un prérequis est le contrôle parfait de leur biodistribution (répartition des NPs dans l'organisme) et leur pharmacocinétique (distribution du principe actif) après administration de ces NPs. Ainsi, le ciblage des tissus à imager et surtout à traiter est une condition indispensable que doivent remplir les NPs pour assurer avec efficacité leur rôle. L'accumulation d'agents thérapeutiques (les principes actifs vectorisés par les NPs) dans les tissus malades doit être spécifique (dans la délivrance des principes actifs) ou très nettement marquée (dans le cas de l'activation programmée de l'agent thérapeutique) afin d'induire une action thérapeutique efficace qui ne se limite pas seulement au traitement des tissus malades mais aussi à la préservation des tissus sains.

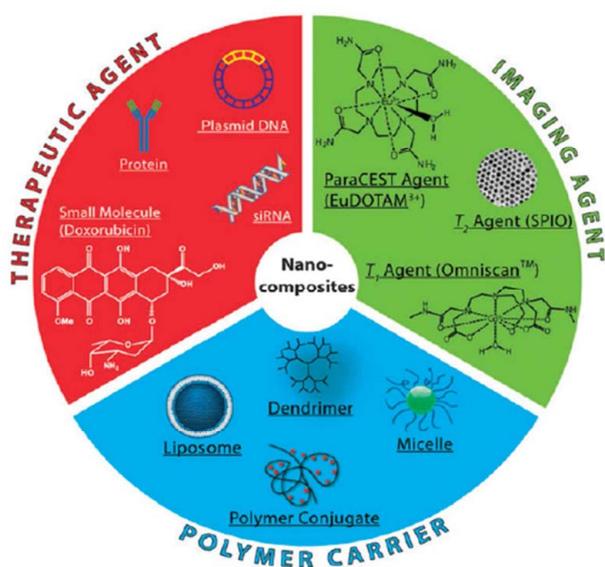


Figure 1. Composants des NPs pour la théranostique.¹

L'objectif de cette section est de présenter les différents types de ciblage, les processus de libération des agents thérapeutiques ainsi que les différentes techniques d'imagerie.

2.2 Les stratégies de ciblage

L'intérêt d'encapsuler un principe actif (PA) dans des NPs est de favoriser le transport des médicaments vers les cellules cibles malades en augmentant les concentrations actives à leur niveau tout en réduisant la toxicité liée à la dispersion des molécules au sein de l'organisme (diminution des effets secondaires). L'encapsulation permet de protéger le PA des phénomènes d'inactivation, d'améliorer le passage des barrières biologiques et ainsi d'améliorer l'efficacité du traitement.

Différents nano vecteurs ont été développés depuis la fin des années soixante-dix. Il s'agit de liposomes, des micelles, des polymersomes, des nanocapsules, des nanoparticules, des dendrimères... Ces systèmes diffèrent de par leur composition chimique, leur mode de préparation (voie covalente ou non covalente), leur comportement vis-à-vis des cellules, leur taux d'encapsulation en PA ainsi que leurs propriétés de ciblage.

2.2.1 Ciblage passif

Ce type de ciblage permet une accumulation passive des NPs dans les tissus ou organes malades. La dénomination 'passive' signifie que le vecteur ne développe pas d'interactions particulières avec son environnement et que l'accumulation des NPs au niveau de leur cible se produit uniquement par diffusion (Figure 3). Le ciblage passif est un processus qui dépend grandement des propriétés physico-chimiques des NPs qui définissent leur temps de circulation et donc leur capacité à atteindre une cible, et également des propriétés des tissus à cibler (présence de macrophages résidents, réseaux vasculaires poreux ...). Effectivement, certains tissus du corps humains tels que le foie et la rate possèdent des vaisseaux sanguins qui présentent de larges fenestrations. En cas d'infection ou en présence d'inflammation, des perturbations de l'intégrité de la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins du tissu affecté peuvent apparaître. Les tumeurs solides présentent aussi une vascularisation particulière caractérisée par le phénomène de perméabilité et de rétention vasculaire accrue que l'on désigne sous le nom d'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). L'effet EPR serait attribuable à certaines propriétés uniques telles que la présence de défauts au niveau de l'architecture des vaisseaux sanguins (diamètre des pores de l'endothélium plus grand), l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins), un drainage lymphatique défectueux et la sécrétion de molécules qui accentuent la perméabilité des vaisseaux sanguins de la tumeur favorisant l'accumulation des NPs dans les tissus tumoraux (Figure 2).

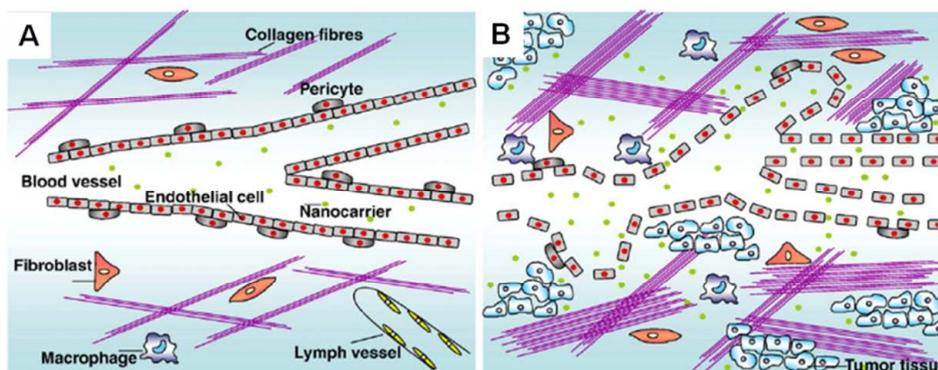


Figure 2. Différences entre des tissus sains et tumoraux qui expliquent le ciblage passif de NPs par effet EPR.

A : Tissus sains contenant des vaisseaux linéaires maintenus par des péricytes. Les fibres de collagène, les fibroblastes et des macrophages sont contenus dans la matrice extracellulaire. Les vaisseaux lymphatiques sont présents. B : Les tissus tumoraux contiennent des vaisseaux sanguins défectueux présentant de larges ouvertures (fenestrations). La matrice extracellulaire contient plus de fibres de collagène, de fibroblastes et de macrophages. Les vaisseaux lymphatiques sont manquants.²

Afin de favoriser l'effet EPR, le vecteur doit avoir un temps de circulation plasmatique prolongé tout en échappant aux défenses naturelles de l'organisme et aux différentes voies d'élimination systémiques. Il est désormais connu que la PEGylation de NPs, c'est-à-dire l'introduction de chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) ou de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) à la surface des nanovecteurs, permet d'augmenter leur temps de circulation dans le sang, favorisant leur accumulation dans les tumeurs. Outre son hydrophilie élevée, la principale fonction des chaînes de PEG ou de PEO est de constituer une barrière stérique entre la surface du vecteur et les opsonines du sang³. L'inhibition de ce contact réduit la phagocytose et par conséquent l'élimination rapide des vecteurs par le système réticulo-endothélial, on parle alors de vecteurs « furtifs » ; l'origine de cette « furtivité » sera abordée plus en détail dans la partie 3.6. L'augmentation du temps de circulation dans le sang passe de quelques minutes pour des nanoparticules non PEGylées à quelques heures voire quelques jours pour des nanoparticules PEGylées favorisant ainsi l'accumulation des vecteurs dans les tumeurs par effet EPR⁴. La taille des vecteurs est également un critère important pour ce type de processus. Idéalement elle doit être comprise entre 50 et 200 nm. Une taille faible est importante pour prolonger le temps de circulation des nanoparticules, pour passer à travers les espaces interstitiels hépatiques et en particulier elle doit être inférieure à 200 nm pour s'accumuler dans les tumeurs par effet EPR.⁵⁻⁸ Le risque d'élimination des NPs par voie rénale est faible dans la mesure où le seuil de coupure rénal est de l'ordre de 50 kg/mol ce qui correspond à une protéine ayant un diamètre hydrodynamique voisin de 5 nm, soit une dimension très faible par rapport aux dimensions usuelles des NPs utilisées pour des applications biomédicales.

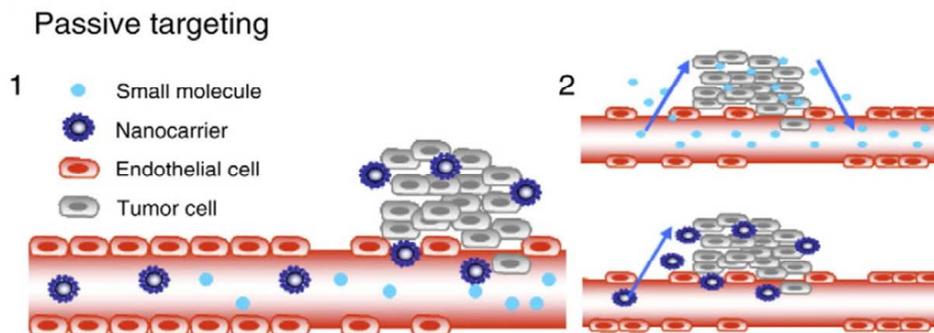


Figure 3. Ciblage passif des NPs par effet EPR. 1: les NPs atteignent la tumeur en passant par les pores de l'endothélium - 2 : Représentation schématique de l'effet de la taille sur la rétention dans les tissus tumoraux : les petites molécules diffusent librement à l'intérieur et l'extérieur des vaisseaux sanguins, faisant décroître rapidement la concentration en PA dans la tumeur. A l'inverse, les NPs encapsulant du PA ne peuvent pas revenir dans le flot sanguins du fait de leur taille plus élevée, résultant d'une accumulation progressive.⁹

Si sur le plan de l'ingénierie des nanoparticules, ce mode de ciblage est simple à mettre en œuvre, son application reste cependant limitée à certains types de tissus, en particulier les tumeurs solides. D'autre part, le ciblage passif est parfois pénalisé par une différence d'accumulation trop faible entre un tissu malade et un tissu sain. La PEGylation réduit, également, l'interaction avec les opsonines sériques mais aussi l'interaction avec la surface des cellules diminuant ainsi leur internalisation.

2.2.2 Ciblage actif

Le ciblage actif vise à augmenter l'accumulation de PA dans l'environnement de la tumeur en fonctionnalisant les nanoparticules par des ligands (anticorps, peptides, aptamères...) qui sont capables d'interagir spécifiquement avec des récepteurs, des canaux ou des molécules particulièrement présentes sur les membranes des cellules à cibler et également à favoriser l'internalisation des NPs par des voies d'endocytose (Figure 4). Ainsi, ce type de ciblage est une stratégie très intéressante qui doit permettre la libération du PA au site même de la maladie, à condition que le ciblage soit suffisamment spécifique (récepteurs présents uniquement sur les cellules cibles, sans quoi il y aurait une compétition entre plusieurs sites actifs et une diminution du ciblage) et que la densité des récepteurs sur la membrane cellulaire soit suffisamment élevée pour permettre l'adhésion efficace des NPs. Les molécules de ciblage n'interviennent qu'à un stade tardif de la vectorisation car le vecteur doit d'abord s'accumuler dans la zone ciblée et entrer en contact avec les cellules cibles pour qu'il y ait un ciblage dit actif. Il a d'ailleurs été rapporté que le ciblage actif n'affecte pas l'accumulation du vecteur mais permet plutôt d'améliorer son internalisation par les cellules cibles par endocytose médiée par le récepteur. Par exemple, Oyewumi *et coll.* ont comparé l'internalisation des nanoparticules de gadolinium (agent de contraste pour l'IRM) fonctionnalisées ou non avec de l'acide folique (molécules ciblant de récepteurs surexprimées au niveau des cellules tumorales).¹⁰

Ces nanoparticules présentent la même forme (sphérique), la même taille (100 nm avec une polydispersité de 0.2 mesurée en diffusion dynamique de la lumière). 8 et 24 hrs après injection d'une dose de 10 mg/Kg, les deux types de nanoparticules ont révélé une accumulation similaire au niveau de la tumeur. En revanche, l'internalisation de ces vecteurs par les cellules est 20 fois plus importante en présence de l'acide folique.

D'autre part, il a été clairement démontré que le ciblage actif améliore de manière significative l'activité thérapeutique des composés encapsulés dans le vecteur. Suzuki *et coll.* ont comparé l'action de liposomes fonctionnalisés ou non avec de la transferrine dont les récepteurs sont surexprimés au niveau des cellules tumorales.¹¹ Ces deux types de liposomes, chargés en oxaliplatine, ont montré une accumulation intratumorale similaire 24 heures après injection intraveineuse. En revanche, après trois jours de suivi, la rétention (interaction entre les vecteurs et les cellules tumorales) est meilleure en présence de la molécule de ciblage. On constate une augmentation de l'activité anti-tumorale par rapport aux liposomes sans ciblage actif ou au PA libre. Une étude réalisée avec des aptamères utilisés comme molécules de ciblage a abouti à des résultats similaires en véhiculant le docetaxel qui est un agent anticancéreux¹².

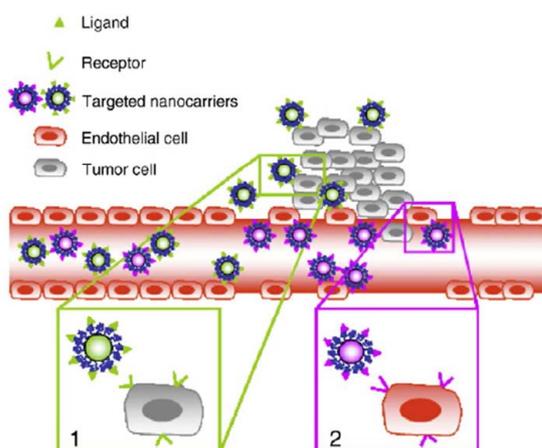


Figure 4. Ciblage actif : les ligands greffés à la surface des NPs se lient aux récepteurs (sur)exprimés par (1) les cellules cancéreuses ou (2) les cellules endothéliales antigéniques.⁹

2.2.3 Ciblage physique dans un gradient de champ magnétique

Une autre approche possible pour les cibrages de NPs consiste à incorporer au sein des vecteurs des particules magnétiques ayant une magnétisation importante (vectorisation magnétique). Il s'agit d'utiliser la force magnétique pour guider mécaniquement un vecteur thérapeutique jusqu'à sa cible.^{13, 14} On peut citer, par exemple, les travaux d'Alexiou *et coll.* sur des nanoparticules d'oxyde de fer enrobées par des dérivés saccharidiques.¹⁵ Leur étude a montré qu'un gradient de champ magnétique fort, appliqué au niveau d'une tumeur, permettait l'accumulation préférentielle des nanoparticules. Des images de microscopie électronique en transmission ont confirmé l'accumulation du ferrofluide au niveau des tissus tumoraux.

Bien que le concept soit simple, il existe un grand nombre de variables qui compliquent la mise en œuvre de cette technique. Les propriétés physico-chimiques des NPs magnétiques, la force et la géométrie du champ, la profondeur et la vascularisation du tissu à cibler ainsi que le débit sanguin sont autant de paramètres qui influencent fortement l'efficacité de cette méthode.^{14, 16}

2.2.4 Cas particulier : Ciblage des pathologies du cerveau

Le ciblage et la délivrance de PA au niveau du système nerveux central demeurent difficile à réaliser du fait des barrières additionnelles que le PA doit franchir avant d'atteindre sa cible. Effectivement, notre organisme possède une barrière qui limite les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral : la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Figure 5). La structure unique de cet épithélium se caractérise par la présence de jonctions serrées, ayant une résistance très élevée, qui empêchent la diffusion des molécules (même pour celles de petites tailles comme les ions). De plus, les jonctions entre les cellules endothéliales, péricytes et astrocytes, sont plus étroites qu'entre tout autre type de cellules. Par ailleurs, la barrière entre le sang et le liquide cérébro-spinal (ou liquide céphalo-rachidien) dans lequel baigne le cerveau constitue également une barrière physique que les particules devront franchir.

La BHE est une interface dynamique par laquelle les substances pénètrent le système nerveux central (SNC) via différents mécanismes¹⁷ : transport passif, transport actif et transport induit par des mécanismes d'endocytose ou transcytose.^{18, 19} Tous ces modes de transport font partie du système d'afflux qui permet aux substances fondamentales pour la survie des cellules cérébrales de pénétrer dans le cerveau à partir du système vascularisé. A ceci s'oppose le système de reflux, majoritairement formé par des protéines, qui impose un mouvement inverse, forçant les substances à échapper au parenchyme cérébral et à retourner dans la circulation périphérique. Ce système d'efflux est responsable de l'inefficacité de bon nombre de thérapies puisque les protéines qui le composent sont souvent des substrats pour les PA²⁰. Il est estimé qu'environ 98% des PA ne sont pas capables de franchir seuls la BHE.²¹

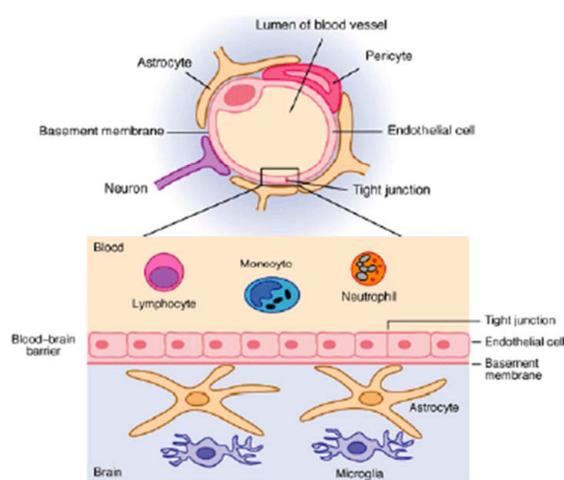


Figure 5. Schéma de la barrière hémato-encéphalique.

Dans le cas des pathologies cérébrales présentant un caractère inflammatoire (tumeur, sclérose en plaques) les cellules immunocompétentes (macrophages) atteignent l'encéphale et permettent, en coopération avec les cellules du SNC, l'initiation et la propagation de la réaction inflammatoire qui aboutit souvent à des lésions tissulaires. L'une des lésions les plus fréquemment rencontrées est la « rupture de la barrière hémato-encéphalique » qui a notamment pour conséquence la formation d'œdèmes et de nécroses hémorragiques cérébrales. De telles conditions favorisent le franchissement de la BHE par les vecteurs.

Outre les stratégies invasives (neurochirurgie : injections intracérébrales ou implants), d'autres stratégies de ciblage moins invasives ont été envisagées :

- Une stratégie consiste à utiliser les macrophages comme « vecteur » d'agents d'imagerie (diagnostique) et/ou de PA (thérapie). Effectivement, lors de phases d'inflammation les cellules immunocompétentes affluent au niveau du CNS.
- Ou bien, des NPs présentant des ligands capables d'induire des processus d'endocytose ou de transcytose peuvent être utilisées : des peptides ou de petites molécules peuvent cibler des récepteurs exprimés sur la paroi endothéliale de la BHE du côté de la lumière du vaisseau.²²⁻²⁴

Dans ce projet, la voie du ciblage actif a été retenue car l'objectif est de diagnostiquer les phases précoces des inflammations symptomatiques de la sclérose en plaques ou de certaines tumeurs cérébrales. Ainsi, nous avons développé des NPs multifonctionnelles présentant des peptides de ciblage, identifiés par phage-display, qui ont une forte affinité avec les cellules endothéliales proches des sites d'inflammation.

2.3 La libération des principes actifs

Les avantages des vecteurs nanoparticulaires sont nombreux. Effectivement, les NPs permettent de « solubiliser » des PA peu solubles, un prérequis à leur administration par voie iv. Elles permettent de maintenir une concentration thérapeutique en médicament sur des périodes de temps très longues et variables selon les applications, apportent une amélioration de l'indice thérapeutique du médicament délivré et permettent de diminuer potentiellement les quantités de médicament ainsi que le nombre d'injections nécessaires, ce qui diminue les effets secondaires ainsi que le développement de résistance au traitement et améliore la qualité de vie du patient. Enfin, elles procurent une augmentation de la stabilité des médicaments à faible temps de vie tels que les protéines et les peptides.

Concernant les systèmes liposomaux et micellaires actuellement commercialisés ou en étude préclinique pour le traitement du cancer, le lecteur pourra se référer aux revues écrites par Danhier⁹ ou Oyewumi¹⁰.

Dans cette partie, nous présenterons les différents mécanismes de libération des PA encapsulés dans des NPs à travers les exemples les plus récents et significatifs de la littérature et nous nous intéresserons plus précisément aux mécanismes de libération des PA induite par hyperthermie.

2.3.1 Agents thérapeutiques

Selon le matériel vectorisé, différentes stratégies d'encapsulation peuvent être employées. S'il s'agit d'acides nucléiques (ADN, ARN, siARN...), on parle de thérapie génique. Elle vise à remplacer ou compléter un allèle mutant déficient par un allèle fonctionnel ou à surexprimer une protéine dont l'activité aurait un impact thérapeutique. Généralement, l'acide nucléique est complexé par interactions électrostatiques avec le vecteur bien qu'il puisse aussi être attaché ou encore encapsulé. Si, au contraire, le matériel à vectoriser est un principe actif (peptide, protéine, molécule anticancéreuse...), nous parlerons de libération contrôlée de médicaments. Dans ce cas, la molécule biologiquement active peut être complexée, encapsulée, ou bien liée de manière covalente par des liaisons facilement clivables.

2.3.2 Mécanismes généraux de libération de principes actifs

Il existe plusieurs mécanismes principaux par lesquels un PA encapsulé peut être libéré par les nanoparticules.

2.3.2.1 *La diffusion du principe actif au travers de la matrice polymérique.*

C'est le processus de libération le plus simple à mettre en œuvre. Du fait de la différence de gradient de concentration entre l'intérieur des NPs et le milieu extérieur, le PA diffuse simplement au travers de la NP. Ce phénomène est très sensible à la balance hydrophile/hydrophobe du PA. Plus le PA est hydrophile plus sa diffusion sera rapide.

2.3.2.2 *Dégradation enzymatique ou chimique de la matrice polymérique*

Ce processus est induit par hydrolyse ou par dégradation enzymatique de certaines familles de polymères ou bien encore par la sensibilité de certaines fonctions chimiques aux milieux réducteurs, tels les ponts disulfures.

Ces mécanismes de libération ont été décrits pour des copolymères à blocs contenant des blocs polyesters (poly(acide lactique), poly(ϵ -caprolactone)) et qui sont capables de s'auto-assembler en vésicules (polymersomes). L'hydrolyse du bloc hydrophobe favorise la formation de pores dans la membrane et ainsi la libération du PA contenu dans la cavité de la vésicule. (Figure 6).

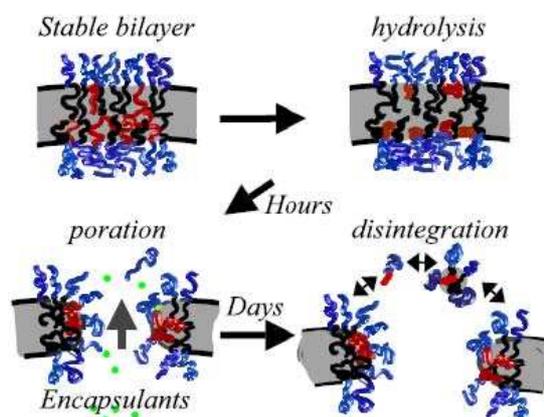


Figure 6. Libération d'une molécule hydrophile par hydrolyse du bloc polyester. Les chaînes en rouge représentent le polyester biodégradable (i.e. PLA ou PCL) tandis que les chaînes en noires représentent un bloc polymère non dégradé tel que le PEG²⁵.

Ceci a été mis en évidence par Discher *et coll.* dans le cadre de l'utilisation de polymersomes de PEO-*b*-PLA permettant la double encapsulation de doxorubicine (agent anti-tumoral hydrophile – encapsulé dans la cavité du polymersome) et de paclitaxel (agent anti-tumoral hydrophobe – encapsulé dans la membrane du polymersome).²⁶ Il a été démontré que la libération de ces deux principes actifs était due à la dégradation du bloc polyester et qu'elle était accélérée par l'abaissement du pH. En outre, les expériences de régression tumorale sur une tumeur solide sous-cutanée induite chez la souris attestent de l'intérêt de tels systèmes pour la délivrance contrôlée : alors que la tumeur non-traitée double de taille en 2 jours, l'injection des vecteurs dans la tumeur réduit d'abord sa taille puis annule toute croissance pendant 5 jours. La tumeur traitée avec les mêmes PA non encapsulés ne rétrécit pas et augmente de moitié en 5 jours.

2.3.2.3 Transition de phase (gonflement ou effondrement de la matrice polymérique) ou dissociation de la matrice polymérique déclenchée par un stimuli physique ou chimique

Ce processus implique l'utilisation de polymères stimulables répondant à des stimuli physiologiques, tel que le pH, la concentration en enzyme et en glucose, ou à des stimuli extérieurs (lumière, champs magnétiques, ...) Ces stimuli peuvent induire des changements d'interactions polymère/polymère ou polymère/solvant.²⁷⁻²⁹ Les deux principaux stimuli qui ont les plus largement étudiés sont le pH et la température.

Actuellement, la plupart des systèmes utilisant les variations de pH pour la délivrance de PA exploitent les différences de pH entre les milieux extracellulaire (pH 7.4) et intracellulaire (endosomes : pH 6 ou lysosomes : pH 5). Un vecteur peut être conçu de façon à être stable à pH sanguin et libérer le PA en réponse à l'acidification du milieu. Par exemple, l'incorporation de fonctions amine tertiaires ou d'acides carboxyliques dans la structure du polymère permet de conférer au vecteur ce type de sensibilité au pH. Plusieurs systèmes à base de micelles et de nanoparticules polymère sensibles au pH ont été développés³⁰⁻³²

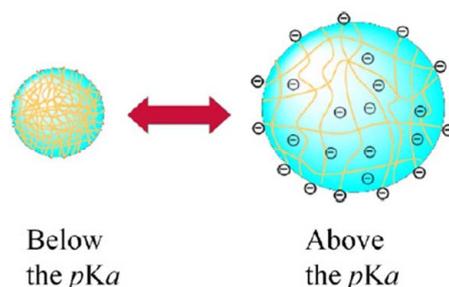


Figure 7. Représentation schématique d'une NP pH-sensible portant, par exemple des fonctions acides carboxyliques. Si $\text{pH} > \text{pKa}$, les groupes $-\text{COOH}$ se déprotonnent, la formation de charges en surface favorisant l'augmentation de la porosité de la particule³³

On peut également citer les travaux de Jordan *et coll.* sur des liposomes pH-sensibles stabilisés par un copolymère à bloc PEO-*b*-polycation et encapsulant des molécules de siRNA (small interfering RNA).³⁴ A pH neutre, le bloc cationique du polymère est adsorbé à la surface du liposome, conférant à ce dernier des propriétés dites furtives, de par la présence des chaînes de PEG en surface. Après internalisation cellulaire, la surface des liposomes devient cationique (présence de phospholipides ionisables dans la membrane) ce qui induit la désorption du polymère, du fait des répulsions électrostatiques entre le bloc cationique et la surface du liposome, et la libération concomitante du gène préalablement encapsulé dans le liposome.

La réponse des matériaux thermosensibles à l'élévation de température induite par des stimuli externes (ultrasons focalisés, champ magnétique, ...) est une stratégie très prometteuse pour la délivrance ciblée de PA. Il existe deux classes de matériaux thermosensibles : les polymères à LCST (lower critical solution temperature) qui deviennent insolubles sous l'effet de la température et les polymères à UCST (upper critical solution temperature) qui ont le comportement inverse. Néanmoins, cette dernière classe de matériaux est peu utilisée pour ce type d'applications puisque les températures critiques sont généralement trop hautes pour être utilisables *in vivo*. Un vecteur thermosensible composé de polymères à LCST voit sa taille diminuer lorsque la température augmente, du fait de la diminution de solubilité des chaînes thermosensibles (remplacement des interactions polymère/solvant par des interactions polymère/polymère). Ainsi, la contraction du vecteur induit la libération du PA encapsulé. Le polymère thermosensible le plus étudié est le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) puisque sa température de transition est proche de celle du corps humain. Néanmoins, du fait de sa non-biocompatibilité, d'autres polymères biocompatibles, tel que le poly(N-vinylcaprolactame) (PNVCL) ont été utilisés pour ce type d'applications. De nombreuses études visant à modifier la température de transition de cette classe de polymères ont été réalisées dans l'optique de les faire correspondre aux conditions physiologiques. (voir partie 4.1.2)

Chung *et al.* ont démontré la capacité d'induire la libération d'un principe actif (doxorubicine), sous élévation de la température, de micelles de PNIPAAm-*b*-Poly(méthacrylate de butyle) (PBMA).

Ils ont également montré que la réversibilité de la transition en température des chaînes de PNIPAAm permettait un contrôle « on/off » de la libération du principe actif via des cycles de chauffage/refroidissement.³⁵ Les auteurs suggérèrent plus tard que cette thermosensibilité pouvait être ajustée en modifiant la composition du bloc formant le cœur hydrophobe de la micelle.³⁶ En remplaçant le bloc PBMA par un bloc rigide de polystyrène (PS) ($T_g \approx 100^\circ\text{C}$), la contraction de la couronne de PNIPAAm n'affecte pas le cœur de la micelle (Figure 8).

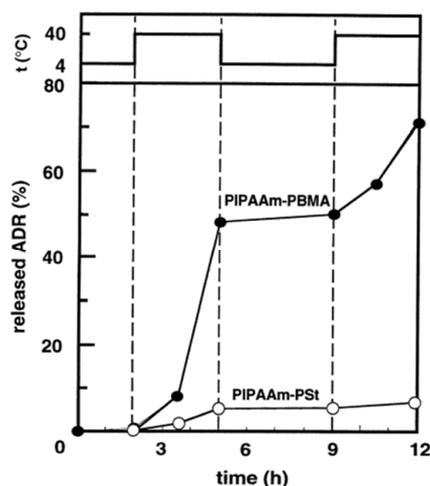


Figure 8. Libération d'adriamycine à partir de micelles de PNIPAAm-*b*-PBMA ou de PNIPAAm-*b*-Poly(styrène) en fonction des cycles de température.³⁶

Cheng *et al.* ont développé des micelles multifonctionnelles à partir de copolymères à blocs thermosensibles et biotinisés : biotine-(PEO-*b*-P(NIPAAm-co-HMAAm)-*b*-Poly(méthacrylate de méthyle)). La copolymérisation d'unités NIPAAm avec des unités hydroxyméthylacrylamide (HMAAm) a permis de moduler la LCST du bloc thermosensible. Les auteurs ont montré que, d'une part, l'élévation de la température au-dessus de la LCST du bloc thermosensible permettait d'induire la libération du PA encapsulé³⁷ (Figure 9), mais également que ces micelles auto-assemblées en milieu aqueux pouvait cibler des cellules tumorales³⁸. Cette double fonctionnalité (ciblage + libération thermo-stimulée d'un principe actif) rend ces systèmes prometteurs pour la thérapie du cancer.

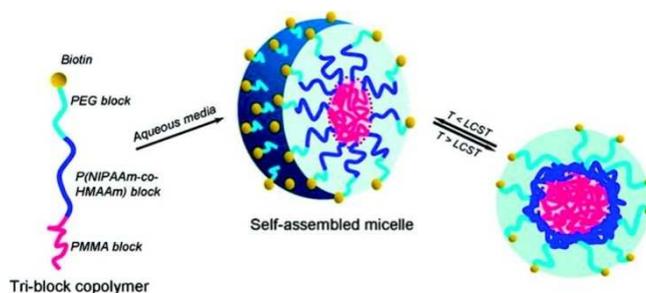


Figure 9. Représentation schématique de l'auto-assemblage en milieu aqueux du copolymères biotine-*b*-PEO-*b*-P(NIPAAm-co-HMAAm)-*b*-PMMA et du changement de structure des micelles formées sous effet de la température.³⁸

Les ultrasons³⁹⁻⁴¹ et l'hyperthermie générée par des particules d'or⁴² ou des particules magnétiques^{43, 44} sont les principaux stimuli capables d'induire une élévation de température et ainsi la libération du PA encapsulé. Les NPs d'or ont la propriété intéressante d'absorber le rayonnement dans le proche infrarouge entraînant une libération locale de chaleur.⁴⁵ L'utilisation des NPs magnétiques en tant qu'inducteur de chaleur sera abordée dans la partie suivante. Les systèmes combinant des particules magnétiques à des polymères thermosensibles sont qualifiés de matériaux magnéto-thermosensibles.

2.3.3 Hyperthermie magnétique et libération thermostimulée

2.3.3.1 Hyperthermie magnétique

A l'heure actuelle, l'hyperthermie produite par les particules magnétiques sous champ magnétique alternatif est une technique très prometteuse dans la thérapie du cancer.⁴⁶⁻⁴⁸ Ce concept est basé sur une plus grande sensibilité des cellules tumorales à la chaleur. Ainsi, traiter les régions tumorales à des températures entre 41 °C et 47 °C permet de réduire la viabilité des cellules cancéreuses et d'augmenter leur sensibilité vis-à-vis de la chimiothérapie.⁴⁹ Cette élévation de température est due principalement à la dissipation de l'énergie des particules magnétiques induite par l'oscillation des moments magnétiques sous champ alternatif (relaxations de Néel et de Brown). Les particules magnétiques ont la capacité de convertir l'énergie des champs magnétiques hautes fréquences en chaleur. Une caractéristique importante concerne la vitesse d'absorption spécifique de ces champs (SAR pour specific absorption rate). Cette grandeur doit être maximale pour minimiser les doses de NPs magnétiques à accumuler pour produire une élévation de température suffisante.

Ito *et coll.* ont clairement démontré l'intérêt de l'utilisation des NPs magnétiques pour l'hyperthermie thérapeutiques.⁵⁰ Leur étude révèle que l'injection intra tumorale d'une suspension de liposomes cationiques encapsulant des NPs de magnétite permet sous champ magnétique d'élever la température de la tumeur jusqu'à 45 °C alors que la température globale de l'animal ne s'élève que de 1 °C (Figure 10). De plus, l'exposition répétée (3 fois) au champ magnétique a permis d'observer une réduction significative du volume de la tumeur chez 4 animaux sur 5.

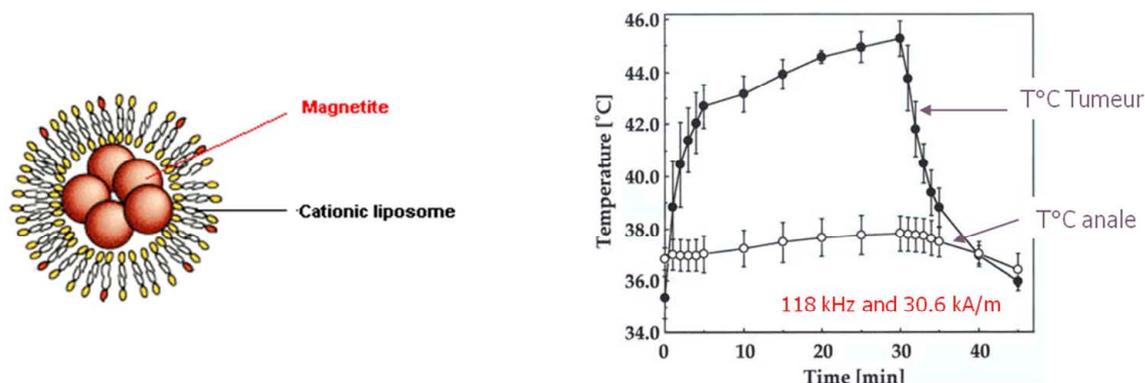


Figure 10. Représentation schématique d'un liposome cationique encapsulant des NPs de magnétite et injectée dans la tumeur ; Evolution de la température dans la tumeur et dans l'organisme sous champ magnétique (pendant 30 min) et après son arrêt.⁵⁰

2.3.3.2 Nanoparticules à échauffement autorégulé

Jusqu'à présent, les oxydes de fer (Fe_3O_4 ou $\text{Y-Fe}_2\text{O}_3$) sont les plus utilisés pour l'hyperthermie thérapeutique. D'une part, ils sont biocompatibles, faciles à synthétiser sous forme de solution aqueuse et, d'autre part, ils possèdent d'intéressantes propriétés en tant qu'agents de contraste⁵¹⁻⁵³. C'est pourquoi, ils sont utilisés dans la majorité des expériences d'hyperthermie *in vitro* et *in vivo* sur modèle animal, et, récemment, sur l'homme.^{54, 55} Néanmoins, l'inconvénient majeur de leur utilisation à des fins thérapeutiques concerne le contrôle de la température atteinte *in vivo*. Effectivement, les phénomènes de conduction thermique et la capacité d'absorption d'énergie des tissus *in vivo* ne sont pas bien décrits, et, de plus, le sur-échauffement peut induire des dommages au niveau des tissus sains. Pour s'affranchir de ces problèmes, une première stratégie consiste à suivre en temps réel l'évolution de température et à contrôler le champ magnétique de telle sorte à ce qu'il s'arrête une fois la température voulue atteinte⁵⁵. Néanmoins, ceci implique un contrôle de la température en plusieurs endroits dans le corps ce qui présente un obstacle dans la mesure où les techniques actuelles de thermométrie sont invasives. Une seconde stratégie consiste à exploiter la dépendance température d'échauffement/propriétés magnétiques de certains matériaux⁴⁸. En effet, la température de Curie (T_C) est la température au-dessus de laquelle les matériaux ferromagnétiques perdent leurs propriétés magnétiques intrinsèques et deviennent paramagnétiques. Ainsi, en concevant des NPs magnétiques présentant une T_C dans la gamme de températures thérapeutiques (41 °C à 47 °C), l'échauffement s'arrêtera spontanément dès que l'environnement de des NPs aura atteint la T_C du matériau. Ainsi, le matériau agit non seulement en tant qu'inducteur de chaleur mais aussi comme un fusible, permettant un contrôle réel de la température.

Les particules de type perovskite ayant une composition du type $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ ^{56, 57} présentent une T_C théoriquement ajustable entre -132 °C et 98 °C pour des taux de dopage au strontium variant de 0.1 à 0.4.⁵⁸ Pour une composition en strontium de 0.18, la valeur de la T_C est de 43 °C⁵⁹. Ces NPs présentent également des qualités d'agents de contraste pour l'IRM⁶⁰ qui en font un candidat de choix comme plateforme pour l'élaboration de systèmes multifonctionnels pour la théranostique. Un analogue à ce type de NPs à échauffement auto-régulé a été développé par l'équipe de Melnikov.⁶¹ Pour ces particules, le dopage est réalisé avec des ions argent qui permettent d'augmenter les propriétés magnétiques et électriques de l'oxyde final. Néanmoins, ce type de NPs est assez peu étudié et peu de données sont donc disponibles.

2.3.3.3 Libération thermostimulée

Le concept de libération thermostimulée par hyperthermie magnétique est de plus en plus considéré comme prometteur pour la délivrance contrôlée d'agents thérapeutiques. Plusieurs articles récents ont permis de valider ce concept. On peut notamment citer les travaux de Sanson *et coll.* concernant des polymersomes magnétiques de poly(triméthylène carbonate)-*b*-poly(acide glutamique) (PTMC-*b*-PGA) produits par la double encapsulation de NPs de maghémite et de doxorubicine.⁶²

Sous l'effet d'un champ magnétique alternatif, la membrane hydrophobe de PTMC, contenant à la fois la doxorubicine et les NPs magnétiques, se fluidifie permettant la diffusion plus rapide de la doxorubicine. Les auteurs ont également mis en évidence la capacité des ces NPs comme agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique et guidage par un gradient de champ magnétique.

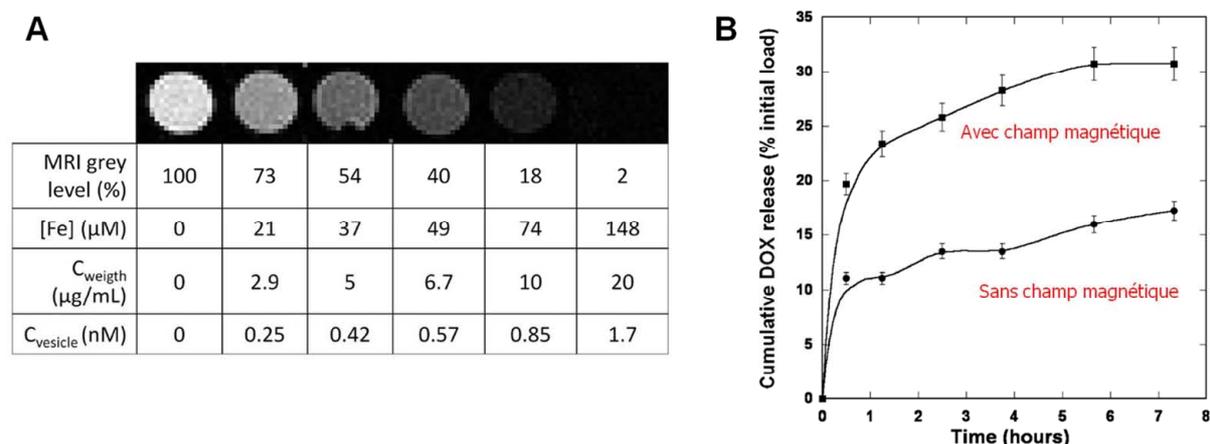


Figure 11. Images d'IRM pondérées en T_2 de suspensions de PTMC-*b*-PGA encapsulant des NPs de maghémite à différentes concentrations (A) ; Quantités de doxorubicine libérée des vésicules de PTMC-*b*-PGA avec et sans champ magnétique.⁶²

Des résultats similaires ont été obtenus avec des NPs de PNIPAAm encapsulant de la doxorubicine et des NPs de $\text{Y-Fe}_2\text{O}_3$ ⁶³ ou avec des NPs de PEO-*b*-poly(oxyde de propylène)-*b*-PEO⁶⁴.

2.4 Techniques d'imagerie médicale

Les progrès récents en imagerie médicale ont déjà permis de grandes améliorations dans le domaine du diagnostique au cours des dernières décennies.^{45, 65, 66} Elles sont basées sur l'utilisation de rayonnements électromagnétiques pour obtenir les informations désirées, sans effectuer de prélèvement sur l'organisme. Ces techniques utilisent des rayonnements repartis sur l'ensemble du spectre électromagnétique : les rayons gamma dans le cas de l'imagerie nucléaire, les rayons X, les ondes radio dans le cas de l'IRM (en complément de l'application d'un champ magnétique) et enfin les rayonnements infrarouges dans le cas de l'imagerie de fluorescence in vivo. (Figure 12)

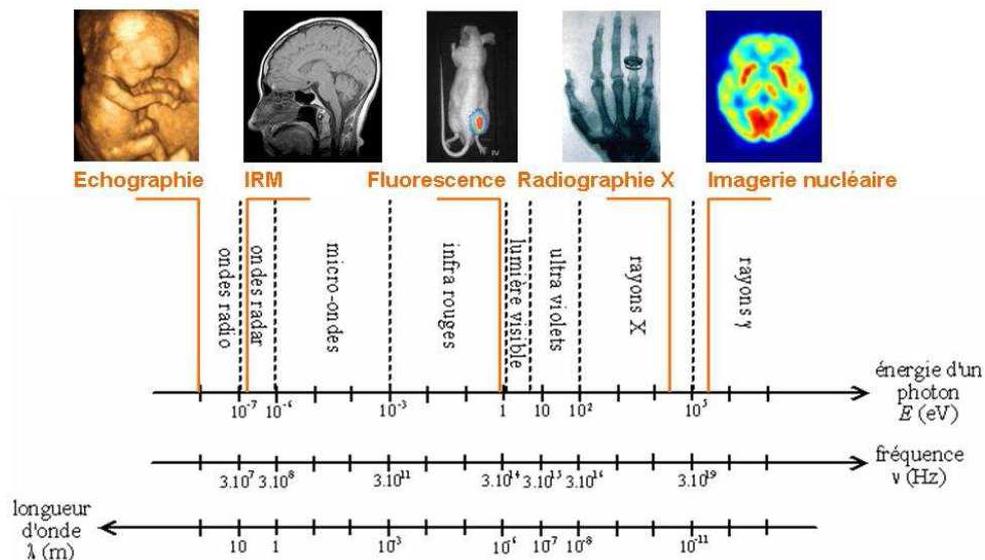


Figure 12. Représentation des différentes modalités d'imagerie en fonction des ondes électromagnétiques qu'elles utilisent.⁶⁵

Nous allons présenter de manière succincte chaque type d'imagerie avec ses avantages et ses défauts. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) puisque c'est la technique que nous avons utilisée pour la visualisation de nos NPs chez l'animal.

2.4.1 Radiographie par rayons X

La radiographie par rayons X est la plus ancienne technique d'imagerie médicale. Cette technique est utilisée dans les scanners qui permettent, après reconstruction, de réaliser des vues en coupe ou des vues en trois dimensions. L'iode, qui a la propriété de fortement absorber les rayons X, est couramment utilisé en tant qu'agent de contraste dans le cas de l'angiographie (visualisation du système sanguin). Son injection dans le système sanguin permet aussi de mieux repérer les organes fortement vascularisés et en particulier certaines tumeurs. Les nanoparticules métalliques (en or par exemple) ont également été proposées récemment comme agents de contraste pour l'imagerie par rayons X du fait de la présence d'atomes lourds. Cependant, le pouvoir contrastant de ces traceurs (iodé ou nano-particulaire) est faible. Les quantités injectées sont par conséquent importantes.

La radiographie par rayons X sont une technique d'imagerie structurale, rapide et efficace offrant une résolution de quelques dizaines de micromètres sans limite de profondeur. Cependant, si cette technique offre un excellent contraste entre les os et les tissus mous, le contraste entre les différents tissus mous est faible et rend par exemple difficile la localisation de tumeurs au sein de ces tissus. De plus, les rayons X sont des rayonnements ionisants et à ce titre, leur utilisation doit s'effectuer avec toutes les mesures de protection adéquates et l'analyse ne peut pas être répétée trop souvent.

2.4.2 Echographies

Les ultrasons, sont utilisés lors des échographies et permettent de réaliser de l'imagerie structurale dédiée à l'analyse des tissus « mous ». Ils peuvent également servir dans le cadre de l'imagerie fonctionnelle, notamment pour la mesure des flux sanguins grâce à l'échographie Doppler. L'utilisation de particules (encapsulant des huiles chargées en gaz) permet d'améliorer le contraste de l'imagerie ultrasonore. L'utilisation des ultrasons est sans danger, c'est pourquoi cette modalité d'imagerie est particulièrement employée pour imager les fœtus. Cette technique est, de plus, rapide, peu coûteuse et peu encombrante. La résolution peut être très précise, mais elle diminue rapidement lors de l'observation de zones profondes, et, par ailleurs, les os ne laissent pas passer les ondes ultrasonores.

2.4.3 Imagerie par Résonance Magnétique

L'IRM est une application de la résonance magnétique nucléaire et consiste donc à observer la réponse des protons de l'eau soumis à une excitation électromagnétique en présence d'un champ magnétique extérieur.⁶⁷ Le corps est constitué de 80% d'eau et de graisse dont l'hydrogène est l'élément principal. Placés dans un puissant champ magnétique, tous les moments des atomes d'hydrogène s'orientent dans la même direction : ils sont alors excités par des ondes radio durant une très courte période (ils sont mis en résonance) qui les écartent de leur direction. A l'arrêt de cette stimulation, les atomes restituent l'énergie accumulée en produisant un signal qui est enregistré et traité sous forme d'image par un système informatique. Cette énergie se décompose en deux composantes : longitudinale, restaurée complètement, et transversale, restaurée partiellement (une partie de l'énergie a en effet été dissipée par le déphasage des spins dû au signal radiofréquence). Les temps caractéristiques du phénomène de retour à l'équilibre, appelés temps de relaxation, sont notés T_1 (relaxation longitudinale) et T_2 (relaxation transversale).

L'intensité recueillie pour un élément de volume (voxel) dépend de la concentration d'eau (d'hydrogène) à l'endroit considéré, on obtient ainsi une image tridimensionnelle de la répartition d'eau dans le corps d'un patient. La quantité d'hydrogène libre est, en effet, différente selon les tissus (certains en contiennent beaucoup, comme la graisse et les tissus bien hydratés, d'autres beaucoup moins, comme l'os), entraînant des images bien différenciées. Par ailleurs, les fluides en mouvement (comme le sang) sont très bien distingués des parties immobiles.

2.4.3.1 Les agents de contraste en IRM

Selon la méthode utilisée, le contraste entre deux voxels de nature différente peut être augmenté si les temps de relaxation des spins nucléaires (décrivant le retour à l'équilibre des noyaux après l'excitation) diffèrent dans les deux zones. Il est donc possible en théorie d'observer des altérations des tissus (telles que des tumeurs) grâce aux différences de densité et de relaxation des protons de l'eau.

Malheureusement, la différence entre tissus sains et altérés est bien souvent insuffisante pour produire une variation sensible d'intensité du signal, ce qui a donc motivé le développement de produits pharmaceutiques capables d'augmenter le contraste.

2.4.3.2 Mode d'action des agents de contraste IRM

Leur mécanisme d'action n'est pas direct, mais indirect : ils accélèrent la vitesse de relaxation ($1/T_i$) des noyaux d'hydrogène les environnant.⁶⁸ L'enjeu est alors de réduire le temps d'acquisition des images IRM ou d'accumuler plus de signal en un temps identique, ce qui permet d'améliorer la sensibilité et le contraste.

Les vitesses de relaxation observées sont l'addition des vitesses intrinsèques des tissus ($1/T_{10}$ et $1/T_{20}$) et de l'accélération de la vitesse sous l'effet du produit de contraste :

$$\frac{1}{T_{\text{observé}}} = \frac{1}{T_0} + \frac{1}{T_{\text{agent de contraste}}} \quad \text{Équation 1}$$

De plus, l'efficacité du produit est proportionnelle à sa concentration, par exemple, pour un agent de type T_i ($i=1$ ou 2) :

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{i0}} + r_i C \quad \text{Équation 2}$$

où r_i est la relaxivité du produit de contraste i et C sa concentration.

Ces agents ont des effets compétitifs sur le signal, à la fois positifs (rehaussement du signal) et négatifs (diminution du signal). Ces effets sont différents selon la classe des produits : on distingue ainsi des agents paramagnétiques, globalement considérés comme des agents de contraste positifs, et, des agents de susceptibilité magnétique, globalement considérés comme des agents de contraste négatifs.

2.4.3.3 Les agents paramagnétiques

Il s'agit d'utiliser des atomes au moment magnétique électronique très élevé car porteurs de nombreux électrons non appariés ; ils diffèrent ainsi de la plupart des atomes de l'organisme qui ne présentent pas de moment magnétique électronique, car ils ne possèdent pas d'électrons non appariés, et ils sont donc diamagnétiques. Ces produits agissent par un mécanisme d'interaction dipolaire avec le moment magnétique nucléaire des protons dont la valeur est beaucoup plus faible (d'un facteur de l'ordre de 680) que celle du moment magnétique électronique. Cette interaction dépend de la concentration du produit et de l'accessibilité de l'eau au produit. Cette interaction étant proportionnelle au carré du spin, plus les atomes possèdent un grand nombre d'électrons non appariés et plus ils présentent d'intérêt pour cette application.

Ces atomes, utilisés sous forme ionique, appartiennent à la classe des métaux de transition (chrome, manganèse, fer) ou des lanthanides (gadolinium, dysprosium). Le gadolinium Gd^{3+} possédant 7 e^- non appariés est le plus intéressant, suivent le fer Fe^{3+} et le manganèse Mn^{2+} avec 5 e^- non appariés. Malheureusement, ces cations présentent une grande toxicité pour le corps humain car ils entrent en compétition avec les cations biologiques ; ils ne peuvent donc être injectés tel quel au patient dans des doses suffisantes pour avoir de bons résultats. Il a donc été nécessaire de rendre inoffensif ces ions paramagnétiques en formant des complexes non toxiques, inertes et stables. Ces ions sont complexés sous forme de chélates, par une liaison qui n'est donc pas covalente.

2.4.3.4 Les agents de susceptibilité magnétique

Les agents de susceptibilité magnétique sont des agents particuliers. Ils sont constitués de structures cristallines qui forment des volumes microscopiques ou domaines. En présence d'un champ magnétique, ceux-ci présentent une magnétisation beaucoup plus élevée que celle des produits paramagnétiques et qui perturbe les lignes de champ et donc les moments magnétiques des protons à proximité des particules. Généralement, ces agents ont un effet prépondérant sur T_2 . Les agents les plus couramment utilisés sont constitués d'oxydes de fer (Fe_2O_3 , Fe_3O_4)^{69, 70} enrobés par une couche de polymère biocompatible tel que le dextrane.

2.4.3.5 Avantage et inconvénients de l'IRM

L'IRM est une technique sans danger puisque, contrairement aux rayons X, elle ne se base pas sur l'utilisation de rayonnements ionisants. Elle offre un excellent contraste au niveau des tissus mous, bien meilleur que celui obtenu par tomographie, mais ne permet pas de visualiser les tissus durs (os). Cette technique est sans doute la modalité d'imagerie structurelle la plus puissante mais elle n'est toutefois pas dénuée de défauts. En effet, la durée d'acquisition est relativement longue mais c'est surtout son coût très important qui limite son utilisation.

Pour des revues détaillées sur l'utilisation d'agents de contraste pour l'IRM à base de polymère, le lecteur pourra se référer aux revues écrites par Lu⁷¹ et Mobley⁷².

2.4.4 Imagerie nucléaire

La médecine nucléaire repose sur la détection de la désintégration d'atomes radioactifs entrant dans la structure de molécules dites radiopharmaceutiques, préalablement injectées au patient. C'est une technique d'imagerie fonctionnelle et même moléculaire car elle permet de visualiser et de localiser l'accumulation des radiopharmaceutiques. Deux technologies basées sur des radioéléments différents sont actuellement utilisées : la tomographie à émission de positrons (TEP, ou PET en anglais pour « Positron Emission Tomography ») et la tomographie d'émission monophotonique (TEMP, ou SPECT en anglais pour « Single Photon Emission Tomography »).

Les agents de contraste utilisés sont le plus souvent des radiopharmaceutiques (molécules substituées par un radioélément) ou des radioéléments seuls.

Ces techniques sont très sensibles, mais nécessitent l'injection de radiopharmaceutiques qui doivent être synthétisés juste avant l'analyse du fait de leur courte durée de vie. En outre, elle est très onéreuse et du fait de l'utilisation de tels agents de contraste est lourde à utiliser en terme de sécurité.

2.4.5 Imagerie de Fluorescence

La dernière modalité présentée ici est l'imagerie de fluorescence. Si cette technique est fortement répandue dans le domaine biomédical, notamment à l'échelle moléculaire (ADN ou protéine) ou cellulaire (cytométrie en flux ou coloration histologique), elle est, malgré ses atouts, encore peu employée pour réaliser de l'imagerie *in vivo*.

L'imagerie de fluorescence est une méthode très sensible mais qui a l'inconvénient d'avoir une profondeur de détection limitée liée à la mauvaise diffusion du rayonnement lumineux lors de la traversée des tissus, à l'absorption des tissus et à leur auto-fluorescence⁷³. La gamme spectrale optimale de son utilisation est le proche IR (900 à 6650 nm) là où l'hémoglobine et l'eau absorbe le moins et où la diffusion des tissus est la moindre.⁷²

Il s'agit malgré tout de la méthode la plus rapide et la moins coûteuse pour imager des molécules ou des cellules chez le petit animal. Elle constitue ainsi une méthode complémentaire de l'IRM ou de la médecine nucléaire⁷⁴. De plus, son faible temps d'acquisition en fait la technique d'imagerie moléculaire la mieux adaptée aux méthodes de « screening ».

2.4.6 Combinaison de différentes techniques d'imagerie

Comme nous l'avons vu, chaque technique présente ses avantages et ses inconvénients. Ainsi, il apparaît évident que la combinaison, au sein d'un même dispositif, de plusieurs « agents de contraste » pour une imagerie multimodale est d'un grand intérêt pour le diagnostic avec une meilleure qualité de l'information, ou bien pour les phases de recherche permettant l'évaluation de la stabilité d'un des marquages ou bien une double ou triple validation de la biodistribution de la nanoparticule à l'échelle moléculaire, cellulaire et anatomique⁷⁵.

Effectivement, du point de vue de l'imagerie, (ou détection) microscopique, la microscopie par fluorescence semble être la technique la plus efficace et la plus prometteuse, tandis que du point de vue de la détection anatomique, l'IRM est un puissant outil de diagnostic médical non invasif qui est couramment utilisé pour le diagnostic de diverses pathologies.^{76, 77}

2.5 Nano-vecteurs multifonctionnels

Récemment, le concept de nanoparticules multifonctionnelles combinant des propriétés de ciblage pour la délivrance ciblée de PA à des propriétés d'agents de contraste pour le diagnostic a connu un grand engouement. Tout en combinant la thérapie et l'imagerie, ces systèmes peuvent également améliorer le traitement de certaines pathologies.^{78, 79}. La littérature présente de nombreuses études de tels systèmes⁸⁰⁻⁸⁵. Gao *et al.* ont développé un vecteur micellaire issu de l'auto-assemblage d'un copolymère à bloc amphiphile et encapsulant à la fois un agent de contraste pour l'IRM et un PA hydrophobe⁸⁵ (Figure 13 a et b). Les auteurs ont montré que l'introduction d'un peptide de ciblage (séquence RGD cyclisé) à la surface du vecteur micellaire induisait une accumulation massive des NPs dans une tumeur sous-cutanée ainsi qu'une diminution beaucoup plus significative de la taille de cette dernière que dans le cas du vecteur non-fonctionnalisé (Figure 13 d et e). Ainsi, ce système multimodal ciblant permet une localisation précise de la tumeur par IRM ainsi qu'une libération ciblée du principe actif.

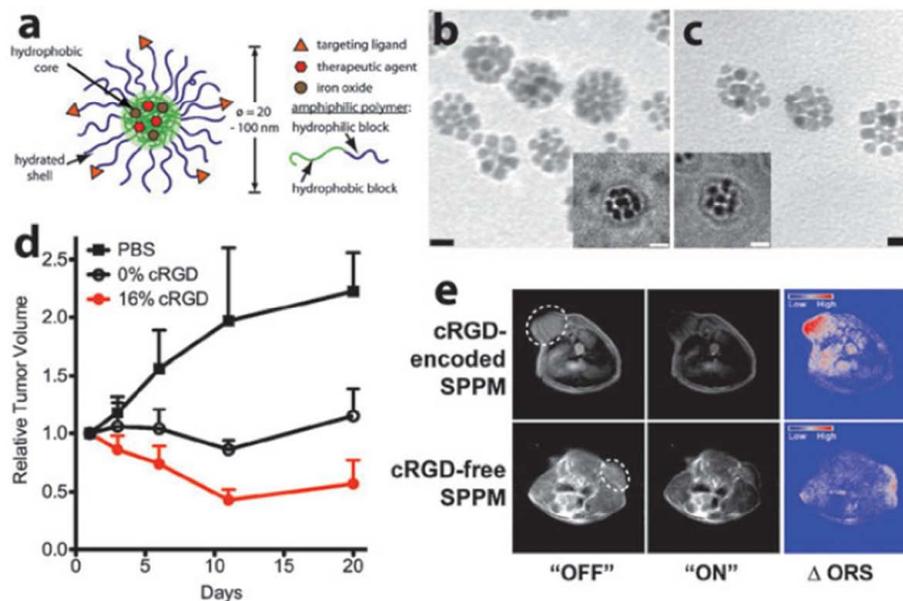


Figure 13. (a) Schématisation du vecteur micellaire encapsulant de la doxorubicine, des NPs d'oxyde de fer et fonctionnalisé en surface par un peptide RGD cyclique ; (b, c) Images de microscopie électronique à transmission (TEM) des nano-vecteurs sans et avec peptide (les insert correspondent aux images de cryo-TEM) ; (d) Evolution de la taille de la tumeur pour différents groupes d'animaux ; (e) images d'IRM (« off-resonance saturation MR image »)⁸⁵

3 Polymères aux interfaces

L'ensemble du projet de thèse repose sur l'idée de fonctionnaliser des nanoparticules inorganiques par des copolymères à blocs doublement hydrophiles. La couche de copolymère physisorbée jouera le rôle d'une plateforme plurifonctionnelle capable de stabiliser les particules dans la circulation sanguine, d'encapsuler des molécules thérapeutiques et de cibler des récepteurs biologiques définis. La présente section a pour objet de présenter les principaux concepts à considérer lors de l'adsorption de polymères ou de copolymère à la surface de substrats solides comme les nanoparticules inorganiques. L'évaluation de la stabilité colloïdale, particulièrement importante dans ce travail de thèse, sera décrite en premier. Puis nous nous intéresserons aux différentes stratégies de fonctionnalisation d'un substrat solide par des polymères et plus spécialement à l'approche non-covalente impliquant des interactions non-covalentes entre un substrat solide et le polymère. Une dernière partie concernera les propriétés de résistance aux protéines.

3.1 Stabilité colloïdale

La stabilité colloïdale, c'est-à-dire la capacité des colloïdes à rester dispersés dans un solvant est un problème central dans la fabrication et l'utilisation de suspensions. Il revêt différents aspects selon que le milieu dispersant soit polaire ou apolaire et que les interactions interparticulaires sont d'origine électrostatique ou stérique.

Les particules solides sédimentent naturellement sous l'effet de la pesanteur si leur densité est supérieure à celle du solvant. La vitesse de sédimentation d'une sphère de rayon R et de densité $\rho_{\text{sphère}}$ dans un fluide de densité ρ_{fluide} et de viscosité η a pour expression :

$$v = \frac{2}{9} \frac{R^2 (\rho_{\text{sphère}} - \rho_{\text{fluide}}) g}{\eta} \quad \text{Équation 3}$$

Quand les particules sont petites, ce qui est le cas pour les colloïdes de dimensions submicrométriques, le phénomène de sédimentation est pratiquement inexistant. Il est masqué par le mouvement brownien qui tend au contraire à disperser la matière.

Néanmoins, pour que des particules restent dispersées dans un solvant, il ne suffit pas qu'elles soient de très faibles dimensions. Plus la matière est finement divisée et plus la surface spécifique augmente. Or l'augmentation d'une interface demande de fournir une énergie correspondant à l'apparition d'une discontinuité entre deux milieux et de liaisons chimiques non compensées. Du fait de cette énergie de surface, un état fortement divisé est moins stable qu'un état plus compact présentant moins de surface.

De très petites particules ont tendance à rester en contact afin de diminuer l'interface avec le milieu environnant. Ceci est à l'origine du phénomène nommé le mûrissement d'Oswald, phénomène largement décrit dans le cas des émulsions. La solubilité d'un composé est plus forte quand celui-ci est sous forme de petites particules ayant un faible rayon de courbure. De ce fait, dans une suspension il existe un flux de matière des petites billes vers les grosses, ce qui provoque à terme la disparition des premières. Néanmoins, ce processus est très lent et est inexistant pour des suspensions contenant des colloïdes monodisperses.

Le comportement des suspensions colloïdales est déterminé par les forces entre particules. D'une part, on distingue les interactions attractives de van der Waals qui, avec le mouvement Brownien, sont à l'origine de la floculation des particules. D'autre part, on peut citer les interactions répulsives qui permettent d'obtenir des suspensions cinétiquement stables. Deux cas de colloïdes sont à considérer :

- **Le premier type est représenté par les colloïdes chargés en phase aqueuse.** La répulsion résulte des forces électrostatiques qui s'exercent entre les surfaces. Le potentiel exact d'interaction entre deux colloïdes, tenant compte des interactions de van der Waals et des forces de répulsion électrostatiques a été calculé par Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek dans le cadre du modèle DLVO.
- **Le second type est constitué par des colloïdes dont la surface est recouverte par des polymères non chargés.** Dans les conditions de bon solvant, les polymères adsorbés à l'interface sont solvatés et représentent une barrière stérique suffisante pour s'opposer aux forces attractives de van der Waals et maintenir les colloïdes à l'état dispersés

3.1.1 Forces de Van der Waals

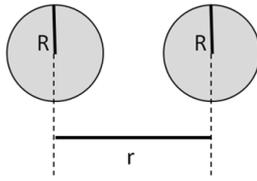
Les forces de Van der Waals sont des forces à longue portée d'origine électromagnétique.⁸⁶ Elles s'exercent sur tout atome ou molécule et leur contribution principale provient des interactions dipôle induit- dipôle induit (force de dispersion de London), dipôle permanent- dipôle induit (force de Debye) et dipôle permanent- dipôle permanent (force de Keesom).

L'interaction de van der Waals est la somme de ces trois contributions et peut s'écrire simplement :

$$U(r) = -\frac{C}{r^6} \quad \text{Équation 4}$$

où C est une constante représentative des propriétés moléculaires du matériau (moment dipolaire permanent des molécules, polarisabilité des molécules, permittivité du vide et constante diélectrique du milieu) et r la distance entre deux dipôles.

Pour deux sphères de rayon R , de densité ρ et distantes de r , le potentiel d'interaction a pour expression :



$$U_{tot}(r) = -\frac{A}{12} \frac{R}{r-2R} \quad \text{Équation 5}$$

avec $A = \pi^2 C \rho^2$

où A représente la constante d'Hamaker qui dépend de la nature chimique des sphères et du milieu dans lequel elles sont placées. Sa valeur fixe l'ordre de grandeur de l'intensité des interactions de van der Waals et est généralement comparable à l'énergie d'agitation thermique kT à température ambiante. Pour la silice dans l'eau, A vaut environ 2 à 3 kT (pour $T = 20^\circ\text{C}$).^{87, 88} Pour deux corps de même nature chimique, cette constante est toujours positive et l'interaction entre particules est attractive. Inversement, elle peut être négative pour deux corps de nature chimique différente résultant d'une interaction répulsive.

L'interaction de van der Waals entre deux particules est généralement d'une portée effective de quelques dizaines de nanomètres et présente une évolution divergente lorsque les sphères entrent en contact ($r = 2R$).

3.1.2 Stabilisation électrostatique et théorie DLVO

En dépit des obstacles énergétiques des dispersions stables de petites particules existent à l'état naturel. Dans ces systèmes, aux forces attractives qui tendent à agréger la suspension s'opposent des forces répulsives induites par la présence de charges à la surface des colloïdes. Ces dernières créent un potentiel qui rend la diminution de la distance entre particules très défavorable énergétiquement. Dans un milieu polaire tel que l'eau, les paires d'ions se dissocient et les contre-ions forment avec les surfaces chargées une double couche électrochimique. Il en résulte une répulsion d'origine entropique, dont la portée est donnée par la longueur de Debye, κ^{-1} , elle-même fixée par la concentration des espèces ioniques dans la phase aqueuse :

$$\kappa = \left(\sum \frac{\rho_{\infty i} e^2 Z_i^2}{\epsilon \epsilon_0 kT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Équation 6}$$

où la somme est effectuée sur l'ensemble des espèces ioniques i présentes dans le système, $\rho_{\infty i}$ est la concentration en ions i à une distance infinie de la surface et Z_i est la valence de l'espèce ionique i .

Le potentiel de répulsion électrostatique entre deux particules colloïdales sphériques chargées, de rayon R et à une distance r , est obtenu à partir de l'équation de Poisson-Boltzmann :

$$U_{\text{électrostatique}}(r) = \left(\frac{64\pi kTR\rho_{\infty}\xi^2}{\kappa^2} \right) e^{-\kappa(r-2R)} \quad \text{Équation 7}$$

$$\text{avec } \xi = \tanh\left(\frac{ze\psi_0}{4Kt}\right)$$

où ψ_0 est le potentiel de surface des particules et ρ_{∞} la somme de toutes les concentrations en ions loin des surfaces. Ainsi le potentiel de répulsion évolue comme une exponentielle décroissante avec r .

L'énergie totale d'interaction est connue sous le nom de potentiel d'interaction DLVO et est la somme des énergies d'attraction et de répulsion (Figure 14):

$$V_T = V_A + V_R \quad \text{Équation 8}$$

La répulsion électrostatique engendre une barrière d'énergie susceptible d'empêcher les colloïdes de se rapprocher à une distance où les interactions attractives de van der Waals prédominent. Le modèle prend aussi en considération l'interaction stérique qui éventuellement s'exerce à courte portée, lorsque les nuages électroniques des atomes ou molécules constitutifs des surfaces entrent en contact.

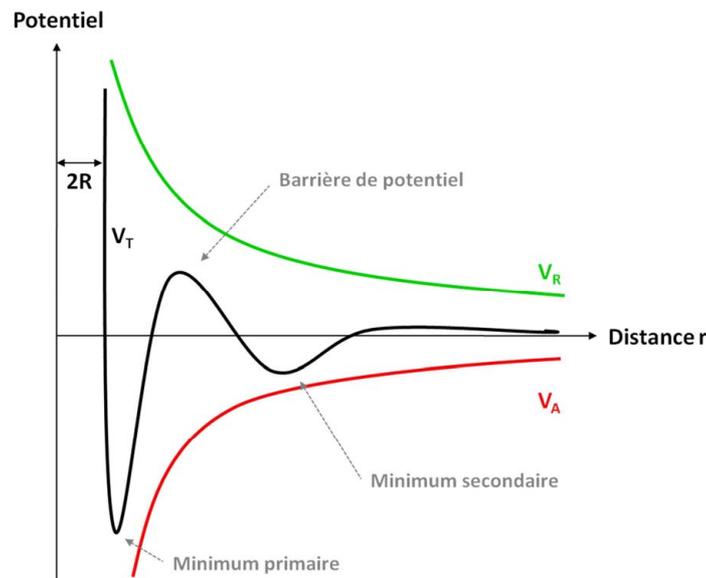


Figure 14. Potentiel d'interaction DLVO

Si la barrière d'énergie correspondant au maximum est assez élevée (quelques centaines de kT), les collisions entre particules ne peuvent pas fournir une énergie suffisante pour la vaincre et la suspension est alors stable. Pour des surfaces fortement chargées, en présence d'un électrolyte concentré, la variation de l'énergie totale présente avant la barrière, un minimum de faible profondeur, appelé minimum secondaire. Une floculation de faible intensité et réversible peut alors apparaître.

Pour une taille donnée de particules, la hauteur de la barrière dépend essentiellement des facteurs suivants :

- La concentration et la charge des ions de l'électrolyte. Leur augmentation provoque l'abaissement de V_R par diminution de la longueur de Debye, κ^{-1}
- La constante diélectrique du milieu : l'utilisation d'un liquide à plus faible constante diélectrique va abaisser V_R
- Le potentiel électrique ψ_0 et la charge de surface : une valeur élevée du potentiel électrique augmente V_R sans modifier V_A . Le pH du milieu, la concentration et la charge des ions adsorbés sont donc parmi les facteurs les plus influents. Si la concentration ionique dépasse une valeur critique, la barrière d'énergie devient nulle, ce qui provoque l'agrégation rapide des colloïdes. Lorsque les particules s'agrègent, elles deviennent virtuellement non redispersables car le minimum primaire est généralement très profond ($\gg 10 kT$). On parle alors de coagulation.

Origine des interactions électrostatiques stabilisant les particules de silice : la couche de surface d'un échantillon de silice contient des atomes de silicium ayant un nombre de valence réduit, inférieur à 4. Ils peuvent se lier avec l'atome d'oxygène d'une molécule d'eau et former après réaction des groupes silanols (Si-OH). Un tel mécanisme se produit avec tous les oxydes. Une surface hydroxylée a un caractère acide, car le groupe $-\text{OH}$ se dissocie, ce qui est à l'origine de la charge négative de la surface. Le logarithme de la constante de dissociation du couple SiOH/SiO^- est égal à 7.1. Pour des faibles valeurs de pH, on constate que les ions H^+ s'adsorbent préférentiellement à la surface de la silice, en se liant aux oxygènes des silanols. Cela se traduit par l'apparition d'une charge positive. Le logarithme de la constante de dissociation du couple $\text{SiOH}_2^+/\text{SiO}^-$ est égal à 2.6. Dans ces conditions on détermine que le point isoélectrique de la silice est compris entre 2 et 3 selon le type de silice. Puisque dans les conditions de notre étude, le pH est toujours neutre, la surface est chargée négativement.

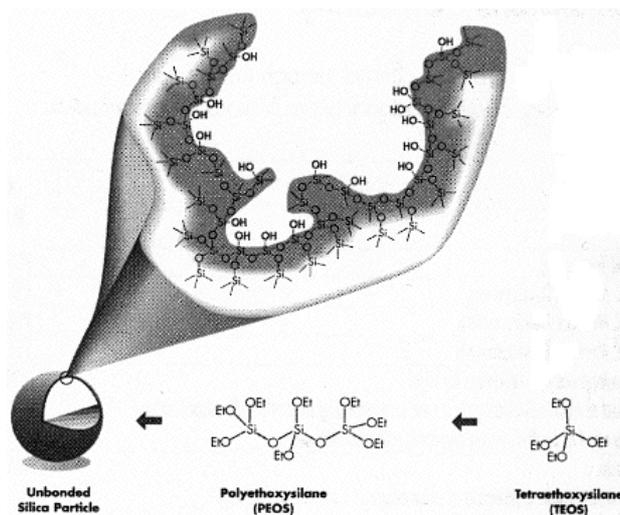


Figure 15. Représentation schématique de la surface d'une particule de silice.

3.1.3 Stabilisation stérique

Une deuxième méthode pour prévenir l'aggrégation des colloïdes consiste à adsorber ou à greffer un polymère à la surface des colloïdes. Les forces répulsives sont d'origine entropique et dépendent du degré de couverture de la surface et de la qualité du solvant :

- Lorsque la densité de chaînes de polymères sur les surfaces est élevée, les interactions latérales ont une influence sur l'extension des chaînes et donc sur les interactions entre les surfaces.
- La qualité du solvant affecte également les interactions répulsives: en bon solvant, les contacts polymère-solvant sont favorables; lors de l'approche d'une deuxième surface, les chaînes de polymère sont comprimées et perdent en partie leur liberté de mouvement. Il en résulte une répulsion d'origine entropique. Au contraire, en mauvais solvant et dans une certaine gamme de compression, ces interactions peuvent être attractives. Lorsque les surfaces sont très proches, la répulsion stérique domine à nouveau; le potentiel résultant est donc attractif aux longues distances et répulsif aux courtes distances.

Il est en général difficile de décrire de façon théorique les interactions répulsives entre des surfaces couvertes de polymères. Des solutions analytiques ont été développées uniquement dans les conditions de très bon ou très mauvais solvant, et pour de faibles densités d'adsorption.⁸⁶ L'évolution du potentiel total $V(h)$ en fonction de la distance h entre les surfaces est représentée sur la Figure 16 pour différentes qualités de solvant. La transition de bon à mauvais solvant s'effectue à la température notée θ . R_g désigne le rayon de giration du polymère.

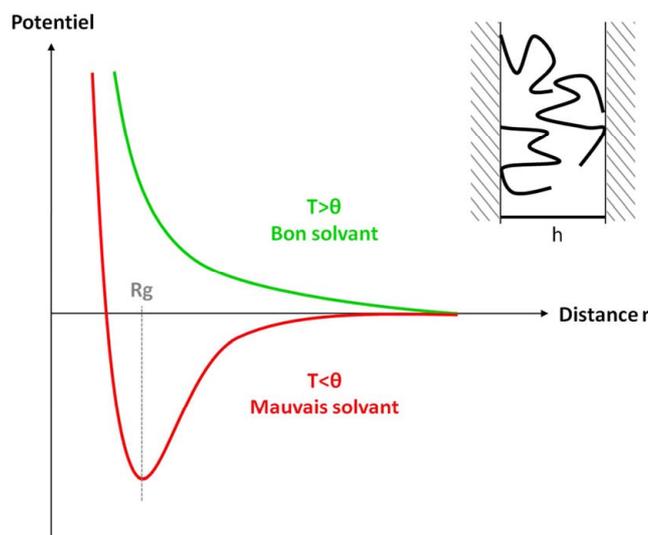


Figure 16. Interaction entre surfaces couvertes de polymères en fonction de la qualité du solvant

3.1.4 Déplétion, floculation

Les dispersions stabilisées uniquement par l'action des forces électrostatiques sont dites « fragiles » puisque l'augmentation de la force ionique du milieu, la diminution de sa constante diélectrique ou un changement de son pH modifie la structure du nuage de contre-ions jusqu'à le rendre inefficace pour empêcher l'agrégation des particules. A l'inverse, la stabilisation stérique induite par adsorption de chaînes polymères aux interfaces induit une pression osmotique répulsive entre deux particules présentant une sensibilité bien moindre au milieu environnant. Néanmoins, l'étude d'un système à trois composants (solvant, polymère et particules) est complexe puisque l'état d'équilibre dépend de la combinaison de multiples interactions.

Quand on ajoute du polymère libre à des particules en suspension, il faut tenir compte des interactions entre la surface des colloïdes et les chaînes de polymère, éventuellement modifiées ou transmises par le solvant. Deux cas peuvent se présenter :

- **La surface est répulsive pour le polymère.** Il y a alors une couche de déplétion à la surface des particules d'où le polymère libre est exclu. Cette situation peut conduire à la déstabilisation de la suspension, on parle alors de floculation due à la déplétion.

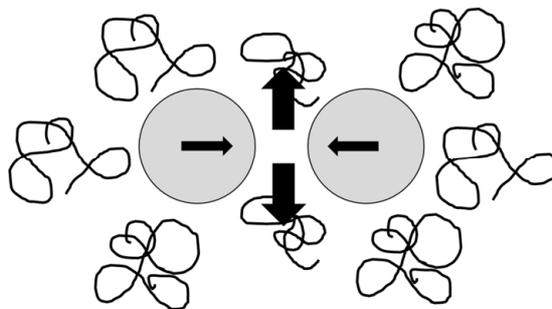


Figure 17. Schéma illustrant le phénomène de floculation due à la déplétion

L'origine de ce phénomène est schématiquement illustrée sur la Figure 17. Quand deux particules s'approchent l'une de l'autre, le polymère qui se trouve dans l'espace qui les sépare est confiné. Comme cette situation est coûteuse en énergie élastique, les chaînes sont exclues de cette zone. La région entre les particules est alors appauvrie en polymère. Du fait de la différence de pression osmotique entre la solution et le volume inter-particules, le solvant presque pur qu'il contient est expulsé pour diluer la solution de polymère. Cela favorise un rapprochement supplémentaire entre les colloïdes. De nombreux modèles rendent compte de la floculation due à la déplétion, notamment celui de Joanny, Leibler et de Gennes⁸⁹ qui exprime la force attractive ressentie par deux colloïdes dans une solution de polymère en régime semi-dilué. Cette force attractive à une portée de $\pi\xi$ dans le cas de deux sphères. (ξ étant la taille d'un blob, c'est-à-dire, la dimension caractéristique d'une chaîne polymère en régime semi-dilué).

Expérimentalement, la floculation induite par déplétion a été largement étudiée et des diagrammes de phases ont été établis pour de nombreux systèmes. Liang *et coll.* ont notamment étudié les interactions entre des particules de latex de polystyrène stabilisées en présence de poly(acide acrylique) (PAA) en fonction du pH.⁹⁰ Pour des pH < 4, les chaînes de PAA induisent une floculation irréversible des particules par pontage indépendamment de la concentration en polymère alors qu'à pH neutre et basique, trois régimes sont mis en évidence : floculation par déplétion, stabilisation, floculation induisant une séparation des phases. Ces trois régimes sont consécutifs à mesure que la concentration en PAA augmente.

- **La surface est attractive pour le polymère.** On dit alors que le polymère est adsorbé à la surface du colloïde. Suivant l'intensité des interactions avec la surface et la longueur du polymère, différentes situations peuvent être rencontrées et la stabilité colloïdale résultante peut varier :
 - Quand le polymère adsorbé sature la surface et quand, de plus les chaînes sont suffisamment longues pour que l'épaisseur de la couche adsorbée soit grande comparée à la portée des forces de van der Waals, les interactions entre colloïdes sont répulsives en bon solvant. Cela correspond à la situation précédemment décrite dans le paragraphe 3.1.3. Lorsque deux particules s'approchent l'une de l'autre, le phénomène prépondérant est l'augmentation de la pression osmotique due à une concentration accrue en monomères. Cette situation est très importante d'un point de vue pratique et est fréquemment utilisée pour stabiliser des suspensions dans l'agro-alimentaire ou des dans l'industrie des colorants. Expérimentalement, des mesures de forces sur des bicouches phospholipidiques couvertes de poly(oxyde d'éthylène) adsorbé confirment la répulsion entre les interfaces.⁹¹
 - La répulsion des couches polymère adsorbées due à l'augmentation de la pression osmotique entre, dans certains cas en compétition avec un autre phénomène. Il s'agit du pontage entre les surfaces qui se produit lorsqu'une même chaîne de polymère est adsorbée simultanément sur deux parois.

C'est la situation d'équilibre lorsque l'échange du polymère se fait librement avec la solution, c'est-à-dire quand l'adsorption est réversible⁹². Cette possibilité existe également dans le cas où l'adsorption est irréversible, à condition que la surface ne soit pas saturée par le polymère adsorbé. C'est la raison pour laquelle des mesures de forces effectuées sur du polystyrène adsorbé sur une paroi de mica dans des conditions de bon solvant, font apparaître à certaines distances des forces attractives.⁹³ D'une manière générale, la floculation d'une suspension provoquée par des effets de pontage se produit pour des concentrations très faibles en polymère de masse molaire élevée. Si l'on augmente la concentration en polymère, la suspension redevient stable.

3.2 Voie de fonctionnalisation de colloïdes

Il existe différentes méthodes pour fonctionnaliser des surfaces par des polymères. Elles sont basées sur les différents types d'interactions possibles entre une chaîne polymère et une surface : soit par approche covalente, ce qui implique la formation d'une liaison chimique entre le substrat et le polymère, soit par une approche physique où le polymère est adsorbé par des interactions faibles.

3.2.1 Voie covalente

Le greffage covalent de chaînes polymère à la surface d'un solide peut se faire principalement via deux voies⁹⁴ (Figure 18):

- « **Greffage sur** » : les chaînes de polymère présentent une fonction réactive en bout de chaîne qui peut réagir sur des groupements fonctionnels disponibles à la surface du solide.
- « **Greffage à partir de** » : les groupements fonctionnels présents à la surface du solide initie la polymérisation des chaînes.

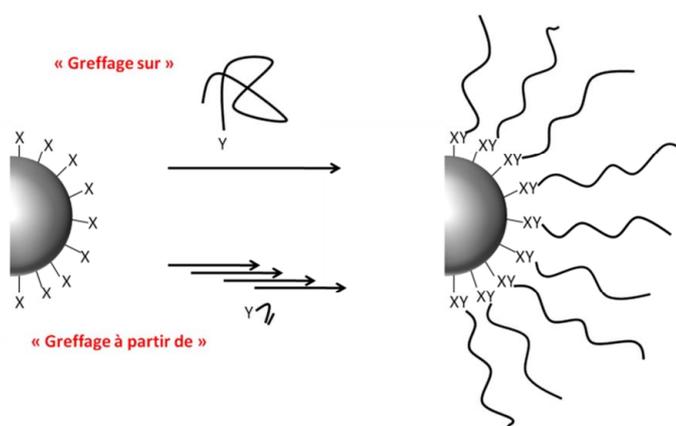


Figure 18. Représentation schématique des différentes méthodes de greffage covalent

Dans les deux cas, les liaisons résultantes entre le substrat et le polymère sont dites « fortes » et la fonctionnalisation qui en résulte est irréversible. De plus, le nombre de chaînes à la surface du solide est contrôlé par les voies de synthèse utilisées. L'inconvénient majeur de ces approches est qu'elles impliquent des synthèses multi-étapes avec des temps de réaction longs. En outre, il est difficile de produire des brosses de polymères denses du fait de la gêne stérique induite par les chaînes entre elles. Pour pallier à ce problème, il est nécessaire d'utiliser des conditions expérimentales particulières : par exemple, le greffage de chaînes de poly(oxyde d'éthylène) dans des conditions de point de trouble des chaînes (addition de sel ou élévation de la température) résulte plus grande densité des chaînes à la surface.^{95, 96}

3.2.2 Physisorption

L'adsorption de polymères est une alternative simple, facile à mettre en œuvre et peu coûteuse pour immobiliser des polymères sur des supports solides. Les liaisons résultantes sont dites faibles et sont donc réversibles. En outre, cette voie permet généralement d'atteindre d'importantes densités de chaînes à la surface en fonction de l'architecture des chaînes. Par exemple, des copolymères amphiphiles présentant des segments hydrophobes de poly(oxyde de propylène) (PPO) tels que les copolymères triblocs PEO-PPO-PEO (aussi connu sous le nom de polyoxamères ou Pluronic[®]) ont été utilisés pour modifier des surfaces hydrophobes via des interactions hydrophobes.⁹⁷⁻⁹⁹ Des copolymères similaires, ayant un bloc central poly(sulfure de propylène) (PPS) (PEG-PPS-PEG) capable d'interagir avec des surfaces d'or, ont été également utilisés pour pegyler des substrats d'or.¹⁰⁰ De même, des copolymères greffés constitués d'une chaîne principale de polyélectrolyte cationique (poly(éthylène imine) ou poly(L-lysine)) et présentant des chaînes latérales de PEO, s'adsorbent spontanément sur des substrats chargés négativement en milieu aqueux par des liaisons électrostatiques fortes entre la surface négative et le polyélectrolyte cationique.¹⁰¹⁻¹⁰³

Cette voie de fonctionnalisation sera traitée plus en détail par la suite, puisqu'elle nous a permis de fonctionnaliser les surfaces de silice par des chaînes de PEO.

3.3 Adsorption d'homopolymères

Avant de s'intéresser plus précisément à l'adsorption de copolymères, il est nécessaire de présenter les tendances générales qui régissent l'adsorption d'homopolymères aux interfaces solide/liquide. L'étude de l'adsorption de polymères aux interfaces a été largement étudiée d'un point de vue théorique et expérimental depuis les années 80.

3.3.1 Généralités

L'adsorption d'homopolymère aux interfaces est le cas le plus simple mais sa modélisation n'est pas triviale. Le phénomène d'adsorption se déroule en trois phases : la diffusion de la molécule vers la surface, son ancrage à la surface et la réorganisation de la chaîne à la surface.

Pour des petites molécules seules les deux premières étapes sont significatives alors que pour des macromolécules toutes sont à considérer.

Les longues chaînes de polymères s'adsorbent différemment des petites molécules du fait de la longueur et de la flexibilité de la chaîne. Plus précisément, des homopolymères peuvent adopter trois configurations aux interfaces : train, boucle ou queue. Les « trains » correspondent à des segments adsorbés à la surface d'un substrat, les « boucles » ont seulement leurs deux extrémités adsorbées et les « queues » sont des parties de chaînes non-adsorbées qui peuvent s'étirer dans la solution. La Figure 19 présente un schéma de ces trois conformations. Les chaînes les plus courtes s'absorbent préférentiellement avec une conformation en train du fait du coût entropique qu'imposerait la formation de boucles à la surface des particules.

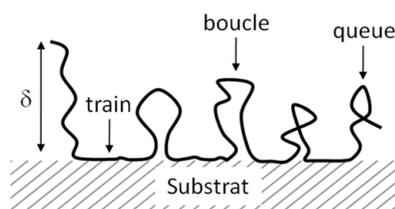


Figure 19. Représentation schématique des différentes séquences d'un homopolymère adsorbé sur une surface solide

La nature de la couche adsorbée dépend grandement de la conformation chaîne. Par exemple, si le polymère s'adsorbe majoritairement en formant des trains, la couche adsorbée résultante est fine. A l'inverse, si les polymères forment préférentiellement des boucles ou des queues, l'épaisseur de la couche polymère sera beaucoup plus grande. La force motrice de l'adsorption de chaînes polymères qui détermine la conformation des chaînes aux interfaces est l'équilibre entre les facteurs entropiques et enthalpiques.

L'adsorption de polymères aux interfaces solide/liquide découle de quatre interactions : polymère/polymère, polymère/solvant, polymère/surface et solvant/surface. En régime dilué, pour que l'adsorption ait lieu, il faut que le polymère déplace les molécules de solvant de la surface solide (ou d'autres molécules adsorbées) avant de s'y ancrer. Ainsi, les interactions solvant/surface sont cruciales. De plus, pour qu'une chaîne reste adsorbée sur la surface les interactions polymère/surface doivent être plus grandes que les interactions polymère/polymère et polymère/solvant.

L'adsorption de chaînes polymères sur un substrat solide induit une perte d'entropie conformationnelle pour la chaîne puisque l'immobilisation des chaînes via des trains réduit le nombre possible de conformations que la chaîne peut adopter comparé au cas où le polymère est libre en solution. De plus, l'entropie translationnelle est également réduite. En l'absence d'autres interactions, l'adsorption de chaînes polymère apparaîtrait défavorable d'un point de vue entropique. Cependant, comme précédemment expliqué, l'adsorption de polymères implique une libération de nombreuses petites molécules (solvant ou autres) liées à la surface du substrat ainsi qu'au polymère, ce qui induit l'augmentation de leur entropie translationnelle et conformationnelle et favorise donc l'adsorption des chaînes de polymère.

Dans la plupart des cas, l'adsorption de polymères peut être accrue ou limitée par des interactions électrostatiques entre les segments des chaînes polymère et la surface. Evidemment, si le polymère porte des groupements chargés, leur interaction avec des surfaces chargées de signe opposé sont favorables. Ces interactions sont d'autant plus favorables que les chaînes sont longues du fait du plus grand nombre de points d'ancrage. C'est pourquoi, l'adsorption de macromolécules est souvent considérée comme un phénomène irréversible. Une fois ancrées à la surface du substrat, le déplacement des chaînes polymère est un processus extrêmement lent.

Ainsi, on peut se demander si une telle couche adsorbée est représentative d'un état d'équilibre ou bien si la structure observée est contrôlée par des cinétiques d'adsorption et de désorption. Dans la plupart des cas, l'échange et le réarrangement des chaînes polymère à l'interface solide/liquide sont des phénomènes lents, et ainsi la morphologie de la couche adsorbée formée est déterminée par le processus d'adsorption initial. Pour atteindre un réel état d'équilibre il serait nécessaire d'attendre des temps extrêmement longs.

Différentes grandeurs caractérisant l'adsorption d'un polymère peuvent être mesurées ou estimées. La quantité adsorbée, notée Γ , quantifie la masse totale de polymère adsorbée à la surface d'un substrat. Cette grandeur est usuellement exprimée par rapport à la surface du substrat en mg/m^2 . La fraction de boucles, de trains et de queues, ainsi que l'épaisseur de la couche adsorbée sont autant de paramètres qui renseignent sur les mécanismes d'interactions polymères/substrat. Les cinétiques d'adsorption sont également à considérer ; elles déterminent laquelle des étapes de diffusion de la chaîne vers la surface ou celle de l'adsorption de la chaîne à l'interface est cinétiquement déterminante. De plus, la compréhension des mécanismes de désorption du polymère et des compétitions d'adsorption sont aussi déterminantes dans l'étude de l'adsorption des polymères.

3.3.2 Isotherme d'adsorption

Un profil typique d'une isotherme d'adsorption est présenté sur la Figure 20. La forme de cette isotherme d'adsorption est typique d'une isotherme dite de « forte affinité » : augmentation rapide de la quantité adsorbée pour des faibles concentrations jusqu'à atteindre un plateau.

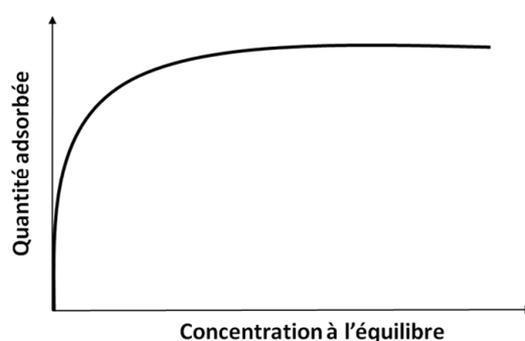


Figure 20. Représentation schématique d'un profil typique d'isotherme d'adsorption pour un homopolymère adsorbé sur une surface solide.

Une seule chaîne polymère peut occuper plusieurs sites d'accroche sur le substrat. Plus la masse du polymère est grande plus le nombre de sites occupés augmente. L'adsorption d'une chaîne polymère étant généralement favorable d'un point de vue énergétique, la quantité de polymère adsorbée à la surface absorbante augmente rapidement avec la concentration du polymère en solution. Néanmoins, à mesure que l'adsorption se produit, le nombre de sites disponibles décroît. Une réorganisation des chaînes adsorbées est alors nécessaire pour permettre à d'autres chaînes d'interagir avec le substrat. Ceci implique une désorption locale de segments de chaînes, processus cinétiquement lent. Ainsi, la quantité de polymère adsorbée augmente graduellement avec la concentration en polymère en solution.

Plusieurs modèles existent pour décrire la relation entre la quantité de molécules adsorbées et la quantité à l'équilibre dans la solution. Deux des plus employés sont respectivement la loi de Langmuir et la loi de Freundlich.

3.3.2.1 Loi de Langmuir

La relation établie par Irvin Langmuir permet de déterminer différentes grandeurs caractéristiques relatives à l'adsorption d'une substance sur un solide. Elle se base sur plusieurs hypothèses¹⁰⁴:

- le nombre de sites d'adsorption à la surface du solide est fixe et le recouvrement de la surface absorbante s'effectue en couche mono moléculaire.
- L'enthalpie d'adsorption est identique pour chaque site d'adsorption.
- Il n'y a pas de gêne stérique des molécules adsorbées sur deux sites voisins.
- A l'équilibre, la vitesse d'adsorption (v_{ads}) est égale à la vitesse de désorption (v_{des}).

Soit θ , le taux de recouvrement, on a donc en tenant compte des hypothèses énumérées ci-dessus et pour une surface unitaire :

$$v_{ads} = v_{des} \quad \text{Équation 9}$$

Soit,

$$k_{ads}C(1-\theta) = k_{des}\theta \quad \text{Équation 10}$$

où k_{ads} et k_{des} représentent respectivement les constantes d'adsorption et de désorption. C représente la concentration en molécules libres.

$$\frac{k_{ads}}{k_{des}}C = \frac{\theta}{1-\theta} \quad \text{Équation 11}$$

En posant $k = k_{ads}/k_{des}$, on obtient :

$$\theta = \frac{kC}{1+kC} \quad \text{Équation 12}$$

Or le taux de recouvrement correspond au ratio entre la quantité adsorbée (C_{ads}) et la quantité adsorbée maximale (C_{ads}^{Max}).

Ainsi on a :

$$C_{ads} = \frac{kC_{ads}^{Max}C}{1+kC} \quad \text{Équation 13}$$

Le tracé de C/C_{ads} en fonction de C correspond à une droite de pente $1/C_{ads}^{Max}$ et d'ordonnée à l'origine $1/(kC_{ads}^{Max})$. Ceci permet de déduire les grandeurs caractéristiques de l'adsorption, c'est-à-dire la quantité adsorbée maximale qui correspond à la valeur au plateau et le ratio k_{ads}/k_{des} indiquant vers quelle réaction (adsorption ou désorption) l'équilibre est déplacé. En outre, sachant la valeur de k , il est possible de déterminer la variation d'énergie libre liée à l'adsorption¹⁰⁵ :

$$\Delta G^{ads} = -k_B T \ln \left(\frac{k}{v_{eau}^m} \right) \quad \text{Équation 14}$$

où v_{eau}^m représente le volume molaire de l'eau, c'est-à-dire 0.018 L/mol.

3.3.2.2 La loi de Freundlich

L'isotherme de Freundlich a une origine purement empirique. En effet, contrairement à Langmuir qui suppose que l'enthalpie d'adsorption des substances sur les solides est une constante avec le taux de recouvrement de la surface du solide, Freundlich suppose une variation logarithmique de cette enthalpie en fonction du taux de recouvrement et on obtient une équation du type :

$$C_{ads} = AC^{\frac{1}{n}} \quad \text{Équation 15}$$

où A et n sont des constantes.

Par la suite, nous allons décrire brièvement les paramètres principaux influençant l'adsorption des polymères neutres et des polymères chargés. Flerer *et coll.* ont décrit ces phénomènes dans un ouvrage de référence en science des colloïdes, « Polymers at Interfaces »¹⁰⁶.

3.3.2.3 Influence de la longueur de la chaîne

L'étude de la dépendance de la quantité maximale adsorbée en fonction de la masse molaire du polymère renseigne sur la conformation des chaînes à la surface. Effectivement, si les chaînes s'adsorbent en conformation étendue (c'est-à-dire en ne formant que des trains), la quantité adsorbée ne dépend pas de la taille des chaînes. C'est le cas lors de l'adsorption du poly(oxyde d'éthylène) sur la silice en solution aqueuse. Pour ce système, l'adsorption des chaînes résulte de la forte affinité entre les groupements éther du polymère et les groupements hydroxyle portés par la silice. La force de ces liaisons hydrogène est telle que la chaîne polymère est « collé » à l'interface solide/liquide.¹⁰⁷ En revanche, si les interactions sont plus faibles, les chaînes forment des boucles ou des queues à la surface et la quantité adsorbée est proportionnelle à la masse molaire ($\approx M^\alpha$ avec α compris entre 0.3 et 0.5). C'est le cas pour l'adsorption du poly(alcool vinylique) sur des particules de poly(styrène) où le paramètre α vaut 0.33.¹⁰⁸

3.3.2.4 Influence de la polymolécularité du polymère

En général, pour des homopolymères, la quantité adsorbée augmente rapidement avec la concentration en polymère initiale jusqu'à atteindre un plateau. Pour un polymère monodisperse cette transition est abrupte et devient moins marquée à mesure que la polymolécularité des chaînes augmente.^{106, 109, 110} Cette différence vient du fait que des polymères polydisperses sont en réalité un mélange de polymères de tailles différentes. Ainsi, la courbure plus arrondie observée pour l'adsorption de polymères polydisperses a été attribuée à l'adsorption préférentielle des chaînes les plus longues par rapport aux chaînes les plus courtes. A des faibles concentrations en polymères, la surface adsorbante disponible est telle que toutes les chaînes de polymère s'y adsorbent indépendamment de leur longueur. A mesure que l'adsorption se déroule, la surface du substrat devient plus saturée. Les chaînes longues, ayant une affinité plus grande pour la surface comparée aux chaînes courtes, déplacent ces dernières. Ceci induit une courbure sur l'isotherme d'adsorption. Pour des polymères très polydisperses, le plateau attendu est en réalité un pseudo-plateau puisqu'il existe un échange continu entre les chaînes longues et courtes, ceci même pour des concentrations en chaînes libres très élevées.

3.3.2.5 Influence de la qualité du solvant

La qualité du solvant, c'est-à-dire, la nature des interactions polymère/solvant, affecte grandement la quantité adsorbée. Effectivement, en bon solvant les polymères adoptent une conformation en pelote et se contractent en mauvais solvant pour minimiser leur énergie libre. Ainsi, pour des chaînes de même taille la concentration adsorbée sera plus importante dans le cas du mauvais solvant. Cet effet a été clairement montré par l'étude de l'adsorption de l'éther de cellulose (EHEC) sur la silice dans l'eau avec des concentrations variables en chlorure de sodium ou sulfate de sodium.¹¹¹ Effectivement, les auteurs ont corrélé les mesures de points de trouble des solutions de EHEC avec du sel avec leurs quantités adsorbées sur le substrat.

A mesure que la concentration en sel augmente, la température du point de trouble diminue, indiquant une diminution de la qualité du solvant pour la cellulose et alors la concentration en polymère adsorbé augmente.

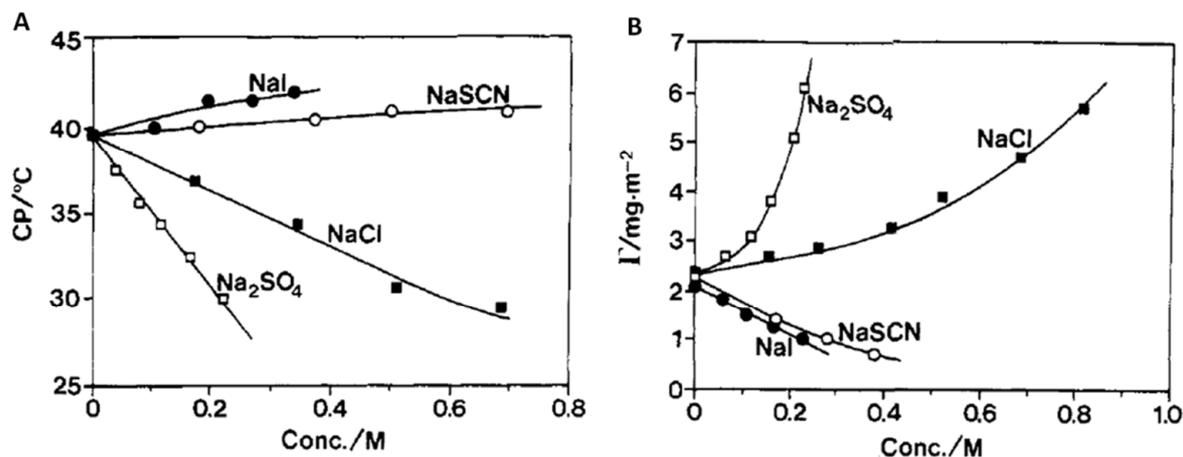


Figure 21. Variation du point de trouble de solutions aqueuses de EHEC (A) et quantité maximale de EHEC sur de la silice (B) en fonction de la nature et de la concentration en sel¹¹¹.

La même tendance a été montrée par Cohen-Stuart *et coll.* lors de l'étude de l'adsorption de poly(vinylpyrrolidone) (PVP) sur de la silice non-poreuse dans deux solvants : l'eau et le 1,4-dioxane¹¹².

3.3.3 Cas de l'adsorption de polyélectrolytes sur des surfaces chargées

L'adsorption des polyélectrolytes sur des surfaces chargées dépend grandement des pKa respectifs des polyélectrolytes et des groupements chargés à la surface du substrat. D'après la Figure 22 où les charges des deux composés sont représentées en fonction du pH, deux principales situations sont à considérer : le polymère et la surface ont soit des charges opposées (Cas I) soit la même charge (Cas II).

Dans le premier cas (Cas I), la force motrice de l'adsorption du polymère est à première vue l'attraction coulombienne entre le polyélectrolyte et la surface. Néanmoins, il faut considérer l'attraction des contre-ions avec la surface et la chaîne polymère. Lorsqu'un polyélectrolyte s'adsorbe sur une surface de signe opposée, des contre-ions sont libérés à la fois du polymère et de la surface solide. Cette libération induit une augmentation de l'entropie du système, ce qui diminue l'énergie libre du système. L'augmentation de la force ionique a deux effets majeurs : elle diminue le gain entropique lié à la libération des contre-ions et diminue la portée et la force des interactions électrostatiques attractives entre le polymère et la surface. De même, l'ajout de sel induit une compétition entre le polymère et les ions pour les sites d'adsorption du solide.

Dans le second cas (Cas II), la force motrice guidant l'adsorption du polyélectrolyte sur le solide provient des forces attractives de van der Waals entre le polymère et le substrat. Dans ce cas, l'addition de sel a l'effet inverse du cas précédent : elle augmente la quantité de polymère adsorbée. Ceci peut être expliqué par :

- Dans une solution sans électrolyte, la concentration locale de contre-ions augmente après l'adsorption de la chaîne polymère, et ceci pour respecter le principe d'électro neutralité. Cette augmentation locale de la concentration peut être vue comme une « organisation » dans le système, ce qui correspond à une diminution de l'entropie et une augmentation de l'énergie libre. Ainsi, la présence de contre-ions contrebalance l'adsorption du polyélectrolyte sur une surface de même charge. L'addition de sel, fait diminuer ce phénomène et induit une augmentation de la quantité de polymère adsorbé.
- L'addition de sel diminue les répulsions entre le polymère et la surface, mais également, il diminue les répulsions entre les unités de monomères chargés. La chaîne devient ainsi plus flexible et sa taille hydrodynamique diminue. Ainsi la quantité adsorbée augmente.

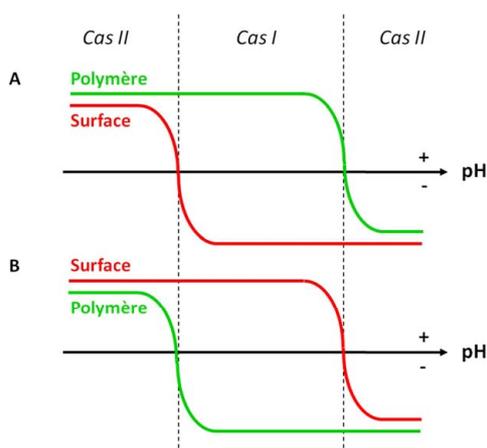


Figure 22. Illustration schématique de la variation de charge d'un polyélectrolyte et d'une surface en fonction du pH dans le cas où le pK_a du polymère est plus grand (A) ou plus petit (B) que celui de la surface.

Ces effets de sel et du pH sur l'adsorption de polyélectrolytes à la surface d'oxydes ont été vérifiés par Hoogeveen *et coll.* lors de l'étude de l'adsorption de polyélectrolytes forts et d'un polyélectrolyte faible sur des oxydes de titane et de silice¹¹³. Il faut noter que ces oxydes voient leurs charges s'inverser en fonction du pH et, qu'en présence de sel, la densité surfacique de charge est augmentée. En outre, ils ont établi que les cinétiques d'adsorption de tels polymères sur des oxydes étaient déterminées par (i) la vitesse de transport du polymère de la solution vers la surface solide et (ii) son ancrage. Pour l'adsorption sur une surface nue, la première étape est l'étape limitante, à moins que l'énergie d'adsorption ne soit trop faible (adsorption de polyélectrolytes faibles ou faible taux de charge du polymère et /ou du substrat) ou qu'il n'y ait une barrière électrostatique (adsorption de polyélectrolyte sur un solide de même charge).

La variation de pH ou de force ionique dans le milieu influence les cinétiques d'adsorption principalement via cette première étape en modulant le coefficient de diffusion des chaînes. Ce dernier est faible pour des polymères fortement chargés en milieu peu salin, du fait des répulsions entre les unités monomères chargés qui rendent la chaîne plus rigide (augmentation de son volume hydrodynamique). Comme précisé précédemment, cette répulsion peut être modulée en jouant sur le pH et la force ionique.

La modulation des cinétiques d'adsorption de polyélectrolytes sur des particules chargées a également été étudiée par Fresnais *et coll.* et notamment son rôle sur la taille des objets résultants a été mis en évidence.¹¹⁴ Dans cette étude, des agrégats, résultant des interactions électrostatiques entre des nanoparticules cationiques d'oxyde de césium enrobées par des chaînes courtes de poly(acide acrylique) et un copolymère à blocs neutre-cationique, ont été formés par différentes voies: mélange direct, dialyse, dilution ou quenching. Le premier procédé correspond au mélange instantané des suspensions de nanoparticules anioniques et de copolymères à blocs en milieu aqueux à faible force ionique. Pour les procédés de dialyse, dilution et quenching, les deux composés sont mélangés dans un milieu fortement salin. Dans ces conditions, les longueurs de Debye sont très faibles (≈ 0.3 nm) et les interactions électrostatiques sont majoritairement écrantées. La dialyse et la dilution lente permettent de diminuer cette salinité de manière contrôlée. Le quenching, quant à lui, correspond à la dilution rapide de la solution initiale, diminuant brusquement la force ionique du milieu. Le contrôle de la vitesse de diminution de la force ionique du milieu (notée dI/dt) (de 1 M en NH_4Cl à 10^{-2} M en 1 s ou 1 jour) permet de moduler la taille des agrégats (de 100 nm à 1 μm) ainsi que de leur composition. Effectivement, il apparaît que le mélange direct ou une diminution brusque de la force ionique induit la formation de « petits » agrégats cinétiquement gelés. Ces agrégats présentent une structure cœur-écorce : le cœur est formé des nanoparticules inorganiques stabilisé par le bloc neutre du copolymère. Si la diminution de la force ionique est plus lente, les agrégats sont plus gros jusqu'à présenter des tailles micrométriques. Dans ce cas, les objets formés sont sphériques mais la conformation des blocs du copolymère n'est pas aussi définie par rapport au cas précédent. Ainsi dI/dt apparaît être un paramètre critique contrôlant les cinétiques d'adsorption d'un polyélectrolyte sur des particules chargées de signes opposés.

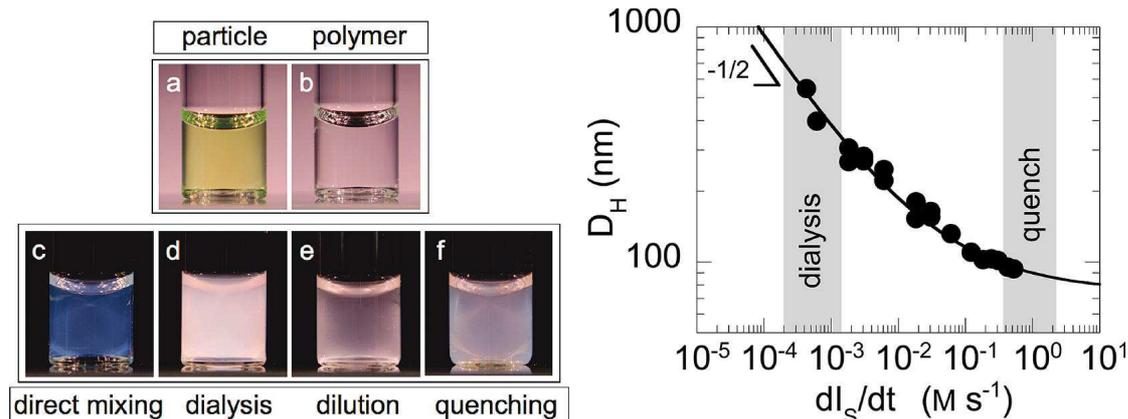


Figure 23. Photographies des suspensions nanoparticules d'oxyde de césium enrobées par du PAA (a) et du polymère (b) et des dispersions d'agrégats formés par les différents procédés : mélange direct (c), dialyse (d), dilution (e) et quenching (f) (A) ; Variation du diamètre hydrodynamique des agrégats en fonction de la vitesse de diminution de la force ionique (B)¹¹⁴.

De plus la force ionique critique en dessous de laquelle des agrégats se forment (c'est-à-dire quand le bloc polyélectrolyte peut s'adsorber sur les particules chargées) est indépendante de la valeur de dI_s/dt et vaut environ 0.43 M. Ce résultat corrèle avec ceux de Chodanowski *et coll.* quant à la modélisation de l'adsorption de polyélectrolytes sur des particules chargées.¹¹⁵

3.3.4 Désorption, déplacement et compétition d'adsorption

Bien que l'adsorption d'un polymère sur un substrat solide soit réversible, la désorption est un phénomène difficilement observable d'un point de vue expérimental. Ceci s'explique par la dynamique lente des systèmes polymères. Pour désorber un polymère d'une surface, tous les segments qui y sont ancrés doivent se détacher au même moment. Si seulement quelques segments sont désorbés, la probabilité est grande qu'ils se réadsorbent avant que les autres segments ne se désorbent. Ainsi, sur un intervalle de temps limité, l'adsorption de polymères peut être considérée comme un processus irréversible.

La réversibilité de l'adsorption peut néanmoins être provoquée soit en changeant les conditions expérimentales (pH ou force ionique) ou en utilisant une molécule ou macromolécule ayant une plus grande affinité avec le substrat que le polymère adsorbé. (Ce dernier point est développé plus largement dans le chapitre 2) Effectivement, dans le cas de l'adsorption de polyélectrolytes sur une surface ayant une charge opposée, les interactions guidant l'adsorption peuvent être affaiblies ou annulées lorsque le système est soumis à des variations de pH ou de force ionique. Ces effets ont été largement mis à profit lors des études sur les assemblages multilamellaires de polyélectrolytes (« layer by layer », LbL). Leur sensibilité à des stimuli dit biologiques (pH, force ionique, température) sont à l'origine de nombreuses études et notamment pour la libération de molécules contenues dans une des strates (médicaments, gène,...) ou pour le « nettoyage de surface » qui aurait été recouverte par des protéines et des substances biologiques dont l'accumulation est indésirable.¹¹⁶⁻¹²⁰

L'augmentation croissante de la force ionique dans les systèmes LbL induit dans un premier temps un gonflement de la couche polymère puis une dissociation de l'assemblage (Figure 24 B). Ceci est dû à une compétition entre les ions ajoutés et les charges portées par les polymères qui affaiblissent plus ou moins fortement les interactions entre les polymères cationiques et les polymères anioniques qui sont responsables de l'assemblage. Un exemple est présenté sur la Figure 24 A avec l'étude de LbL formé à pH 11 entre un chlorure de poly(diallyldiméthylammonium) (PDADMA) et le poly(acide acrylique) (PAA).¹²¹ Au-delà d'une concentration en sel de 0.6 M, l'épaisseur de la couche LbL diminue fortement.

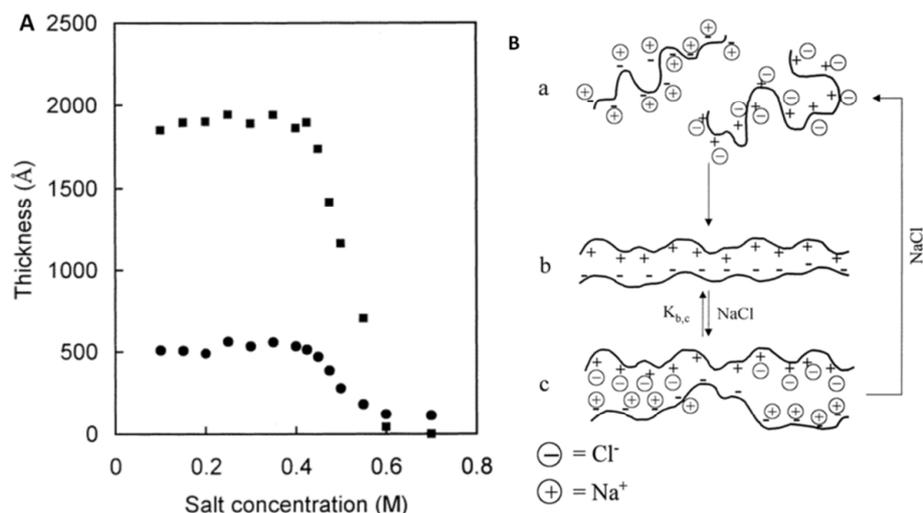


Figure 24. (A) Epaisseur de 20 couches de PAA/PDADMA LbL préparées avec des PAA de 84 500 g/mol (•) et 5 200 g/mol (◻) en fonction de la concentration en sel (B) Représentation schématique de l'effet du sel sur l'assemblage LbL.¹²¹

De la même manière, la dissociation de l'assemblage LbL peut être induite par une variation de pH. En effet, lorsque la différence (pH-pKa) (où le pKa est relatif au polyélectrolyte) diminue, les interactions coulombienne sont affaiblies et conduisent à la désorption partielle ou totale du polymère.

3.4 Adsorption de copolymère à blocs

Deux arrangements sont envisageables pour des macromolécules contenant deux monomères de natures chimiques différentes :

- Copolymères dits à structures homogènes qui sont constitués d'un mélange aléatoire ou alterné des deux monomères.
- Copolymères dits à structure hétérogène qui sont constitués de blocs distincts consécutifs ou greffés.

Dans cette partie nous ne considérerons que l'adsorption des copolymères à blocs de type A-B.

Les forces guidant l'adsorption de copolymères à blocs aux interfaces solide/liquide sont les mêmes que celles présentées dans la partie précédente concernant les homopolymères. Usuellement, l'adsorption d'un copolymère sur un substrat se fait par l'adsorption préférentiellement d'un des deux blocs. Le bloc adsorbant, dit d'ancrage, présente une affinité plus forte avec la surface que le bloc non adsorbant, dit stabilisant. Néanmoins, cette vision est un peu simpliste puisqu'elle ne prend pas en compte la possibilité auto-assemblage du copolymère sous forme d'agrégats micellaires. Effectivement un copolymère à blocs en solution peut adopter deux morphologies. Premièrement, si le solvant est bon pour les deux blocs les chaînes polymères existent sous forme de chaînes dites unimères en solution et le bloc d'ancrage forme une couche gonflée par le solvant (Cas 1). Si le solvant est sélectif d'un des deux blocs et que la concentration des chaînes en solution est supérieure à la concentration micellaire critique, les chaînes polymères vont s'auto-assembler sous forme d'agrégats micellaires. Deux cas peuvent alors être observés : si le cœur est formé du bloc adsorbant, alors la micelle perd sa structure cœur-écorce et les chaînes adsorbantes s'adsorbent à la surface du solide (Cas 2) ; à l'inverse, si la couronne de la micelle est composée des chaînes adsorbantes, alors leurs interactions avec le substrat peuvent induire l'adsorption de la micelle qui perd alors sa conformation sphérique, on parle de conformation en « pancake » (Cas 3).

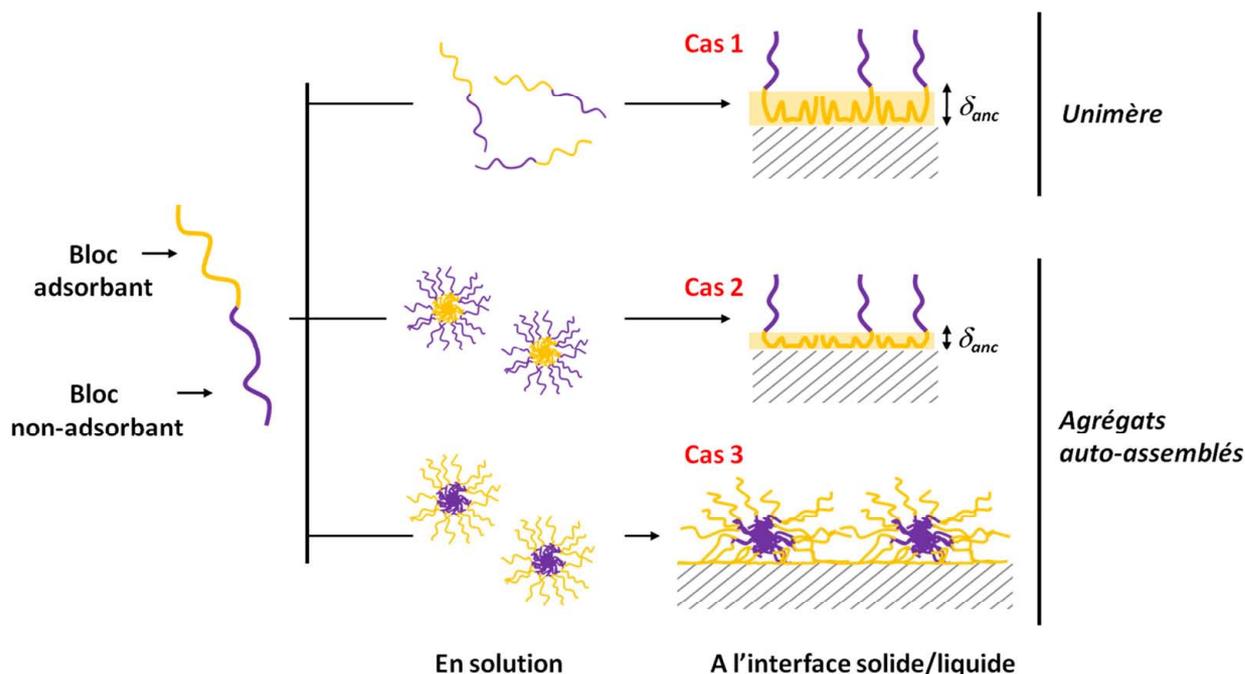


Figure 25. Différentes structures possibles de la couche polymère en fonction de la morphologie du copolymère en solution.

3.4.1 Cas 1 : Adsorption d'unimères

C'est le cas le plus simple. A des concentrations très faibles en solution, un copolymère à blocs peut s'adsorber via ses deux blocs en conformation étendue sur la surface, indifféremment de l'affinité des deux blocs avec la surface.

Si la concentration en polymère est telle que la surface du substrat n'est pas entièrement recouverte, alors le bloc dit non-adsorbant peut occuper des sites du substrat adsorbant. Il faut noter que le terme non-adsorbant ne veut pas nécessairement dire que le bloc ne s'adsorbe pas dans toutes les circonstances. Cette dénomination implique plutôt que l'autre bloc (bloc adsorbant) présente une plus grande affinité pour le substrat que le bloc non-adsorbant. Pour de plus grandes concentrations en polymère, deux possibilités peuvent être rencontrées : si la différence d'affinité pour le substrat des deux blocs est faible ou nulle, alors l'adsorption du copolymère est similaire à celle d'un homopolymère. A l'inverse, s'il existe une différence notable d'affinité pour le substrat, la conformation du copolymère est celle représentée sur la Figure 25, cas 1 : le bloc adsorbant est ancré au substrat et le bloc non-adsorbant s'étire vers la solution. L'architecture du copolymère et notamment les longueurs relatives des deux blocs définissent alors la structure de la couche adsorbée, comme l'illustre la Figure 26. Par exemple, lorsque le bloc adsorbant est petit comparé au bloc non-adsorbant (Figure 26A), les chaînes polymère peuvent s'adsorber de manière proche, et la densité des chaînes non-adsorbantes peut être grande. Plus la taille du bloc adsorbant augmente, moins la quantité adsorbée est grande et plus la densité des chaînes non-adsorbantes diminue (Figure 26B et C).

Notre étude concerne l'adsorption de poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(L-Lysine) (PEO-*b*-PLL) sur des nanoparticules de silice. Dans les conditions expérimentales que nous avons choisies, les deux blocs peuvent s'adsorber sur la silice : le PEO s'adsorbe par liaisons hydrogène sur les groupements $-\text{SiOH}$ présents à la surface des nanoparticules alors que la PLL s'adsorbe par complexation électrostatique mettant en jeu les fonctions amine qui sont protonées à pH neutre et les groupements silanols à la surface de la silice qui sont partiellement dissociés dans les mêmes conditions de pH (SiO^-). L'étude de l'adsorption de ce copolymère à blocs sur des nanoparticules de silice nous a permis d'établir un mécanisme d'adsorption (chapitre 2).

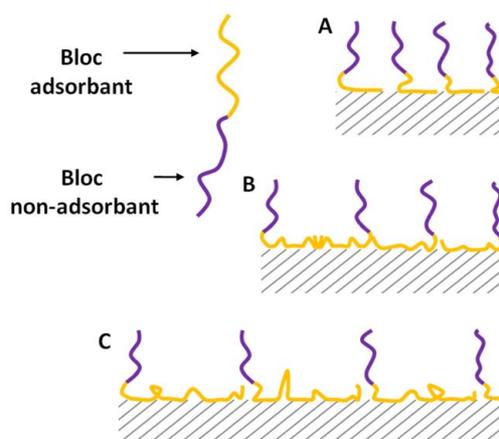


Figure 26. Différentes morphologies de brosse formées par l'adsorption d'un copolymère à blocs dont la longueur du bloc d'ancrage est variable : celle-ci augmente de A à C.

Il est important de rappeler que l'épaisseur de la couche adsorbée, définie principalement par la longueur de blocs non-adsorbants à l'interface solide/liquide, dépend de plusieurs facteurs. La densité des chaînes non-adsorbées ainsi que l'épaisseur de la couche sont déterminées par les longueurs des deux blocs du copolymère. Ceci sera discuté plus en détails dans la partie 3.5. De plus, les possibles répulsions inter-chaînes (répulsions électrostatiques ou gêne stérique) peuvent également favoriser l'extension des blocs non adsorbants.

3.4.2 Cas 2 : Adsorption d'unimères à partir d'agrégats micellaires

L'existence d'agrégats auto-assemblés en solution complexifie grandement le processus d'adsorption. La formation de la couche adsorbée comprend trois étapes : (i) une première étape rapide durant laquelle les micelles diffusent vers le substrat pour former une couche diffuse d'agrégats, (ii) puis une deuxième étape où un équilibre s'établit entre les agrégats micellaires et les chaînes libres en solution (unimères) et (iii) enfin, une dernière étape pendant laquelle les chaînes s'adsorbent et se réorganisent à la surface solide/liquide de telle sorte à adopter une conformation proche de l'équilibre.¹²² Ainsi, les agrégats micellaires peuvent être considérés comme des « réservoirs de matériels adsorbants », mais les forces gouvernant la formation de la couche adsorbée sont les mêmes que dans le cas d'unimères libres en solution. Un autre mécanisme pourrait être envisagé : les agrégats micellaires pourraient d'abord s'adsorber sur la surface puis les chaînes polymères se réorienteraient à travers la couche formée. Néanmoins, ceci impliquerait que le cœur, composé du polymère adsorbant, soit au contact proche de la particule. Ceci est rendu pratiquement impossible par la barrière stérique générée par la couronne non adsorbante.¹²³

Dans le cas de simples tensioactifs, la deuxième étape d'adsorption est nettement plus rapide puisque les molécules diffusent plus rapidement et ainsi les échanges entre le solvant et la micelle sont facilités. Dans le cas d'agrégats formés par des macromolécules, de tels échanges sont beaucoup plus lents voire impossibles si les agrégats sont cinétiquement gelés.

Ces considérations cinétiques furent étudiées par Bijsterbosch *et coll.* dans le cas de l'adsorption de copolymères amphiphiles de poly(diméthylsiloxane)-*b*-poly(1-éthyl-2-oxazoline) (PDMS-*b*-PEtOx) de masses molaires variables sur un oxyde de titane.¹²⁴ En milieu aqueux, les copolymères à blocs forment des micelles ($cmc > 2 \text{ mg/L}$) et la surface solide est sélective du bloc hydrophobe (PDMS). Dans leurs travaux, il apparaît que les cinétiques d'adsorption sont dépendantes de la vitesse d'échange entre les micelles et les chaînes polymères libres. Pour des chaînes polymères courtes (2500 g/mol ; $R_H \approx 10 \text{ nm}$), cette vitesse d'échange est grande par rapport au temps nécessaire aux chaînes pour diffuser au travers de la couche diffuse. Ainsi, avant que les micelles n'approchent de la surface elles sont déjà dissociées et ce sont alors les molécules sous forme d'unimères qui s'adsorbent à la surface du solide. A l'inverse pour des chaînes polymères longues (100000 g/mol ; $R_H \approx 190 \text{ nm}$), plus la vitesse d'échange entre les micelles et les chaînes libres diminue et plus cette étape devient cinétiquement déterminante. La vitesse d'adsorption du copolymère est diminuée par la lenteur de cet échange. Les auteurs ont estimé le temps de relaxation d'une micelle, c'est-à-dire le temps nécessaire pour qu'une micelle se dissocie.

Pour les polymères les plus longs, ce temps de relaxation est de quelques dizaines de secondes, pour les chaînes les plus courtes, il vaut environ une seconde.

3.4.3 Cas 3 : Adsorption d'agrégats micellaires

L'adsorption d'agrégats micellaires aux interfaces solide/liquide est rencontrée dans le cas des copolymères à blocs amphiphiles neutre-chargé interagissant avec des substrats de charge opposée. Ces systèmes forment des micelles en solution et vont conserver cette structure micellaire lors de l'adsorption sur des substrats de charge opposée. Ce type de structure a été souvent étudiée par microscopie à force atomique ou à balayage comme le montre la Figure 27.¹²⁵⁻¹²⁷ Sur ces images, on distingue clairement les différentes morphologies formées par l'auto-assemblage de poly(styrène)-*b*-poly(2-vinylpyridine) (PS-*b*-P2VP). Effectivement, la mise en solution de ce copolymère à blocs dans le toluène (solvant sélectif du bloc PS) conduit à son auto-assemblage en structure cœur-écorce sphérique (micelle) ou allongée (bâtonnet) en fonction de la concentration en polymère. Le bloc P2VP forme le cœur rigide des agrégats et le bloc PS constitue la couronne. Le substrat de microscopie (mica) est plongé dans les suspensions de polymère pour permettre l'adsorption des agrégats micellaires par interactions de van der Waals entre le bloc PS et la surface de mica. L'évaporation du solvant permet la formation de films fins caractérisés par des micro-domaines organisés.

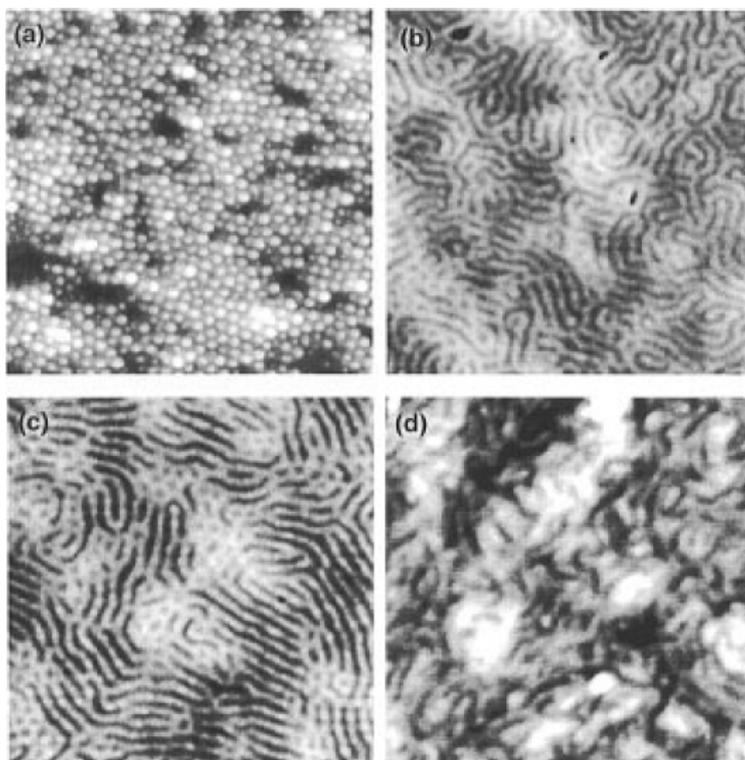


Figure 27. Images de microscopie à effet tunnel montrant la structure d'une surface de mica recouverte d'un film de micelles de PS-*b*-P2VP : les solutions de copolymère ont des concentrations variables : 1 (a), 2 (b), 2.5 (c) et 5 g/L (d). La longueur de l'image correspond à 1 μm .¹²⁶

Des structures similaires sont également observées lors de l'adsorption en milieu aqueux de copolymères à blocs au caractère ampholyte tel que le poly(acide méthacrylique)-*b*-poly(méthacrylate de 2-diméthylaminoéthyle) (PMAA-*b*-PDMAEMA) sur des substrats de silicone¹²⁸. Effectivement, dans cette étude, Mahltig *et coll.* ont montré que l'adsorption du copolymère était sensible au pH. Pour des pH compris entre 2 et 4 et supérieurs à 11, aucune adsorption n'était observable du fait des répulsions électrostatiques entre les chaînes polymère et le substrat de même charge. Pour des pH compris entre 4 et 11, le polymère s'adsorbe par interactions électrostatiques. Néanmoins cette adsorption était maximale pour des pH voisins de 9 (Figure 28A). En outre, ils ont observé par microscopie à effet tunnel la formation de micro-domaines parfaitement sphériques. L'étude du comportement de ce copolymère en solution a pu montrer que quelque soit le pH, des objets se formaient en solution et que leurs tailles étaient corrélables aux tailles observées par microscopie à effet tunnel (Figure 28B). Ceci a permis aux auteurs de conclure que le copolymère PMAA-*b*-PDMAEMA s'adsorbait sous forme de micelles sur des substrats en silicone.

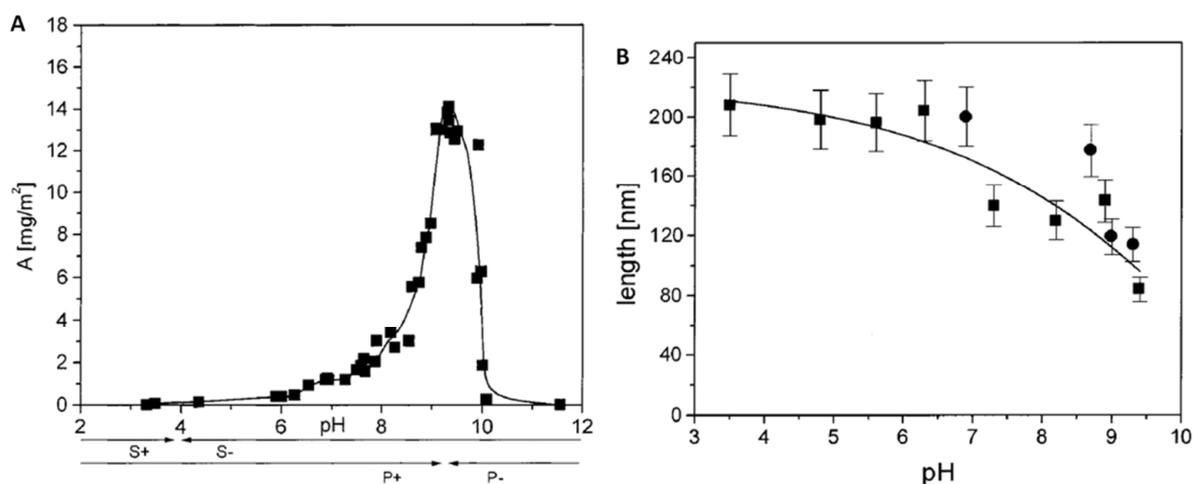


Figure 28. (A) Quantité de polyampholyte adsorbé sur des supports en silicone en fonction du pH – les flèches indiquent les domaines de pH où le substrat et le polymère sont chargés positivement (S+, P+) ou négativement (S-, P-); (B) Diamètres hydrodynamiques des objets micellaires formés en solution et mesurés par diffusion de la lumière (■) et hauteur des objets sphériques à la surface du substrat observés en microscopie à effet tunnel (●) en fonction du pH¹²⁸.

3.5 Conformations des chaînes aux interfaces

Dans cette partie, on s'intéresse plus précisément à la conformation des chaînes aux interfaces, qu'elles soient chimiquement greffées (dans le cas de la fonctionnalisation des surfaces par voie covalente) ou simplement adsorbées (dans le cas d'une fonctionnalisation par physisorption). Dans la suite le terme « greffé » sera indifféremment utilisé pour désigner les deux cas.

3.5.1 Chaînes greffées sur des surfaces planes

Les chaînes de polymères « greffées » sont caractérisées par leur distance moyenne D entre deux points d'ancrage. Suivant que D est plus petit ou plus grand que la taille des chaînes polymères en solution, caractérisée par le rayon de Flory ($R_F = aN^{3/5}$ en bon solvant où a est la longueur d'une unité monomère et N le degré de polymérisation), on distingue plusieurs régimes¹²⁹ :

- Si $D > 2R_F$, la distance entre les points d'ancrage est telle que les chaînes ne sont pas comprimées et elles adoptent alors des conformations en pelote. On parle de régime en « champignon » (Figure 29). L'épaisseur de la couche adsorbée est comparable à R_F .
- Si $D < R_F$, les fortes interactions liées au volume exclu entre les chaînes ont pour effet de leur faire adopter une configuration très différente de celle qui est la leur en solution. Pour équilibrer la pression osmotique (qui a tend à gonfler la brosse) et l'élasticité des chaînes greffées (qui s'oppose à ce gonflement), les chaînes sont fortement étirées et on parle de régime de « brosse » (Figure 29).
- Si $R_F < D < 2R_F$, c'est un régime conformationnel intermédiaire que l'on qualifie de « champignons en interaction ».

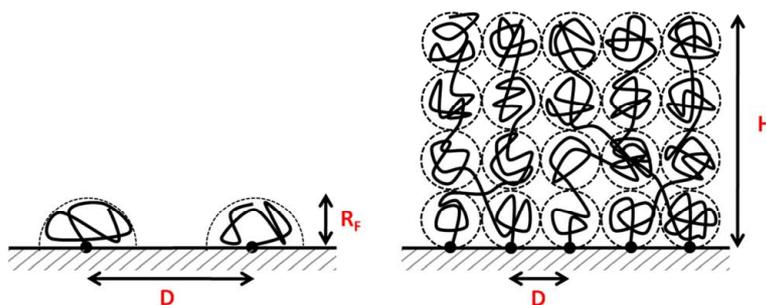


Figure 29. Différentes conformations envisageables pour des chaînes greffées sur une surface plane

Ces différents régimes ont été largement étudiés d'un point de vue théorique et expérimental par de Gennes et Alexander¹²⁹⁻¹³². Leur modèle relatif au régime de brosse est basé sur ces hypothèses :

- Toutes les chaînes sont uniformément étirées, ce qui signifie que la longueur entre leurs deux extrémités (distance bout-à-bout) est égale à l'épaisseur de la brosse, notée L .
- La fraction volumique $\phi(z)$ des monomères en fonction de l'éloignement z de la surface est constante dans toute la brosse et vaut $\approx Na^3/D^2L$
- Les chaînes polymère constituant une brosse peuvent être vues comme une solution de polymère semi-diluée

En solutions semi-diluées, c'est-à-dire, quand la concentration moyenne en polymère dans la solution est égale à la concentration en monomères dans une pelote (notée c^*), les chaînes de polymère entrent en contact.

La valeur de c^* en bon solvant est donnée par :

$$c^* \approx N^{-\frac{4}{5}} \quad \text{Équation 16}$$

Par des arguments de lois d'échelle, de Gennes décrit chaque chaîne comme une succession de sous unités de taille identique ξ ($\approx D$) et composées d'un nombre g ($\approx \phi^{-5/4}$) de monomères. Ainsi la longueur de la brosse à l'équilibre est définie comme :

$$L \approx \frac{N}{g} \xi \approx ND \phi^{5/4} \approx ND \left(\frac{Na^3}{D^2L} \right)^{\frac{5}{4}} \quad \text{Équation 17}$$

D'où :

$$L \approx Na \left(\frac{a}{D} \right)^{\frac{2}{3}} \quad \text{Équation 18}$$

Ce même résultat peut être obtenu par des considérations énergétiques. Les hypothèses précédemment décrites permettent d'établir une expression simple de l'énergie libre d'une chaîne, notée F .¹³³ F comprend deux contributions : l'énergie élastique (F_{el}) qui permet la déformation des chaînes, et l'énergie libre d'interaction (F_{int}) qui rend compte des interactions monomère/monomère et monomère/solvant. Ce dernier terme est directement lié à la pression osmotique. Dans un bon solvant, l'état d'équilibre des chaînes est atteint lorsque les deux contributions F_{el} et F_{int} s'annulent.

L'énergie élastique d'une chaîne dans une brosse est définie par :

$$\frac{F_{el}}{kT} \approx \frac{L^2}{Na^2} \phi^{\frac{1}{4}} \approx \frac{L^2}{Na^2} \left(\frac{Na^2}{LD^2} \right)^{\frac{1}{4}} \quad \text{Équation 19}$$

où k est la constante de Boltzmann et T la température.

Cette composante étant opposée à l'énergie libre d'interaction du polymère :

$$\frac{F_{int}}{kT} \approx \frac{N}{g} \approx N \phi^{\frac{5}{4}} \approx N \left(\frac{Na^2}{LD^2} \right)^{\frac{5}{4}} \quad \text{Équation 20}$$

La minimisation de l'énergie libre de la chaîne ($F \approx F_{el} + F_{int}$) permet de déterminer la hauteur de la brosse à l'équilibre. On retrouve la même équation que celle définie par les lois d'échelle de de Gennes. (Équation 18).

3.5.2 Chaînes greffées sur des surfaces convexes

Un modèle de brosse plane est applicable à des polymères « greffés » à la surface de particules colloïdales dans la mesure où l'épaisseur L de la couche superficielle est petite devant le rayon R des particules. Dans notre cas, les particules de silice et les particules magnétiques recouvertes de silice ont des diamètres compris entre 25 et 60 nm. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que les chaînes de poly(oxyde d'éthylène) (POE) en conformation étirée. En effet, pour un POE de masse 2000 g/mol (45 unités monomériques) la longueur étirée des chaînes est de 16 nm et cette même longueur vaut 40 nm pour un POE de 5000 g/mol (113 unités monomériques). Ainsi, la courbure de la surface n'est plus négligeable à l'échelle de la chaîne polymère qui y est greffée et devient une caractéristique importante qui joue sur la hauteur de la brosse et la densité des chaînes.

Modèle de Daoud-Cotton

La structure d'une couche de polymères greffée sur une surface courbe se distingue essentiellement par le fait que la décroissance du profil de concentration en monomères est davantage progressive que dans le cas d'une surface plane. Elle se fait suivant une loi de puissance, c'est-à-dire de façon moins abrupte qu'un profil parabolique. Daoud et Cotton ont donné une expression du profil de concentration dans les polymères en étoile et sans recourir à des considérations énergétiques.¹³⁴

Dans le modèle en loi d'échelle des brosses planes, la couche de polymère est décrite comme une solution semi-diluée. Elle est formée d'un empilement compact de blobs de taille ξ tel que, dans chaque monocouche, chaque chaîne contribue pour un blob. Sa valeur de ξ est par conséquent constante, elle est égale à la distance moyenne D entre deux points d'ancrage (Figure 29). Daoud et Cotton ont transposé cette description à la géométrie sphérique. La couronne de polymère en étoile est également formée d'un empilement compact de blobs, disposés en strates. Mais leur taille ξ est croissante de telle sorte que dans chaque strate le nombre de blob soit égal au nombre de bras f de l'étoile. Ainsi, ξ varie en fonction de la distance au centre r de la manière suivante :

$$\xi^2 \approx \frac{4\pi r^2}{f} \text{ soit } \xi \approx r f^{-\frac{1}{2}} \quad \text{Équation 21}$$

Il faut rappeler que dans le régime semi-dilué, pour des concentrations $c > c^*$, la taille des blobs ξ dépend de la concentration moyenne en monomère comme suit :

$$\xi \approx a c^{-\frac{3}{4}} \quad \text{Équation 22}$$

Le profil interfacial se déduit des deux équations précédentes :

$$c(r) \approx \left(\frac{r}{a}\right)^{-\frac{4}{3}} f^{\frac{2}{3}} \quad \text{Équation 23}$$

Bien que la fonction $c(r)$ soit rapidement décroissante, l'essentiel de la masse en polymère se situe à l'interface du substrat sur lequel il est ancré. Dans le cas de brosses planes, la concentration moyenne en monomères dans la couche ne dépend pas de N . De même, pour une géométrie sphérique, l'Équation 23 ne fait pas apparaître explicitement le degré de polymérisation. Cette particularité a une conséquence importante qui est représentée schématiquement sur la Figure 30. Que la surface où les bras prennent leur origine soit située en R_0 ou en R_1 , le profil est identique dans les deux cas pour $r \gg R_1$ bien que son extension maximale dépende de la longueur ($\sim N$) des bras. Ainsi, deux colloïdes ayant le même rayon extérieur R_2 et dont la couronne est formée par le même nombre de bras ont une structure périphérique identique, quelles que soient la nature et la taille de leur partie centrale.

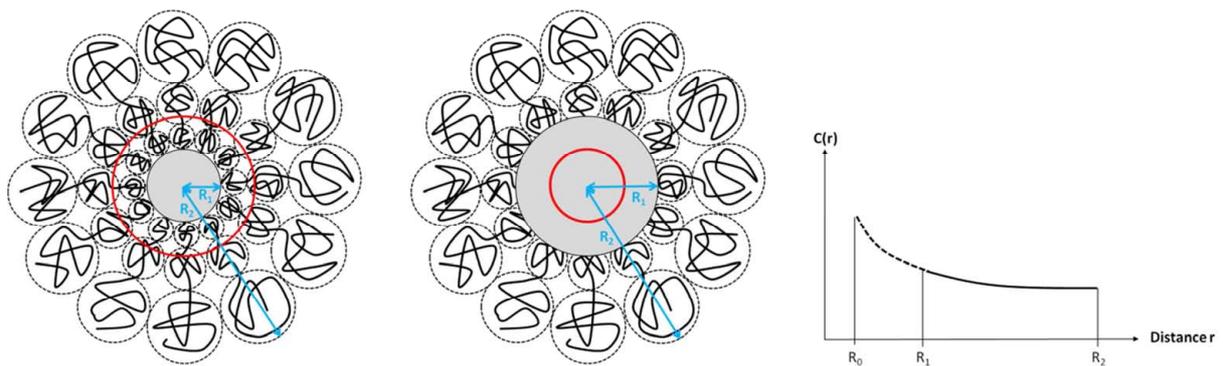


Figure 30. Comparaison entre deux colloïdes de même rayon extérieur R_{ext} et ayant le même nombre de bras et la même structure à la périphérie.

Néanmoins, ceci a une conséquence directe sur la pression osmotique dans la brosse. Effectivement, de Gennes a établi que la pression osmotique était inversement proportionnelle à ξ^3 . Ainsi, plus la taille du blob est petite et plus la pression osmotique sera grande diminuant ainsi l'entropie conformationnelle des chaînes.

3.6 Stabilité en milieux biologiques

L'adsorption de protéines plasmatiques sur des matériaux synthétiques est un facteur clé qui définit le devenir des matériaux artificiel implantés ou injectés dans des organismes vivants. Effectivement l'adsorption de certaines protéines déclenche une série de processus qui vise à éliminer tout corps étranger contenu dans le sang. Ainsi, pour des applications biomédicales, il est primordial de limiter l'adsorption non-spécifique des protéines sur des matériaux.

3.6.1 Opsonisation et phagocytose

Les macrophages du système réticulo-endothélial (RES) ont la capacité d'éliminer les nanoparticules du système sanguin quelques secondes après leurs injection par voie intraveineuse les rendant ainsi inefficaces.¹³⁵ Ces macrophages, par exemple les cellules de Kupffer (foie) ne peuvent pas directement identifier ces nanoparticules mais reconnaissent les opsonines (protéines spécifiques) liées à la surface des nanoparticules.¹³⁶ Le processus d'élimination se déroule en trois étapes :³

- **L'opsonisation** : recouvrement des corps étrangers par les opsonines contenues dans le sang. Ce recouvrement est dû à l'adsorption par des forces attractives (van der Waals, électrostatique, ionique, hydrophobe, ...) entre la surface de la particule et les protéines.
- **Reconnaissance des particules par les phagocytes**: ceci se fait par l'intermédiaire des opsonines qui exposent, une fois adsorbées à la surface des particules, des ligands reconnus par les phagocytes. Sans l'adsorption des opsonines, les phagocytes ne sont pas capables de se lier ou de reconnaître des nanoparticules comme élément étranger.
- **L'ingestion des particules par les phagocytes, on parle de phagocytose**. Cette étape implique l'endocytose des particules par le phagocyte. Après l'endocytose, le phagocyte sécrète des enzymes et autres composés réactifs qui conduisent à la destruction des corps phagocytés. Malheureusement, la plupart des matériaux polymère non-biodégradables ne peuvent pas être suffisamment dégradés par ce processus. En fonction de leur taille ou de leur masse molaire, les particules vont être soit éliminé par le système rénal soit accumulé dans les autres organes du RES, typiquement, le foie ou la rate. En première approximation, l'élimination par le système rénal n'est possible que pour des molécules ayant une masse molaire de 5000 g/mol ou moins. Pour des chaînes polymères plus compactes ou pour des dendrimères, ce seuil est de 10 000 g/mol. Pour les autres cas, la biodistribution des particules dans les différents organes, dépend de plusieurs facteurs tels que la taille des particules et la nature chimique de leur surface.

Bien que l'activation du processus d'opsonisation ne soit pas encore parfaitement comprise à ce jour, ce phénomène est crucial dans le processus d'élimination des particules injectées par voie intraveineuse.

De nombreuses recherches dans le domaine des nanotechnologies appliquées à la médecine visent à bloquer ou ralentir ce processus afin d'augmenter le temps de circulation des particules dans l'organisme. Il n'existe pas de règle absolue pour empêcher l'opsonisation des particules mais il est certain que des particules neutres ou hydrophiles sont moins susceptibles d'être opsonisées que des particules chargées ou hydrophobes.¹³⁷⁻¹³⁹

3.6.2 Forces guidant l'adsorption de protéines

L'adsorption de protéines se déroule en trois étapes : les protéines s'approchent de la nanoparticule du fait du mouvement brownien, puis interagissent avec leurs surfaces et enfin y adhèrent. Une fois adsorbées, les protéines subissent un réarrangement de leur structure. Du fait de l'hétérogénéité de la plupart des surfaces en termes de charges électriques d'affinité aux liaisons hydrogènes et d'hydrophobicité, les forces guidant l'adsorption des protéines sont variées. La variation d'énergie libre associée à l'adsorption des protéines sur des surfaces solides présente une composante enthalpique (interactions de van der Waals, effet hydrophobe, interactions électrostatiques) et une composante entropique basée sur la libération des contre-ions et /ou l'eau contenue dans la couche de solvatation et la réduction de l'ordre structural dû aux changements de conformation de la protéine après son adsorption sur un substrat :¹⁴⁰

$$\Delta_{ads}G = \Delta_{ads}G_{VdW} + \Delta_{ads}G_{EDL} + \Delta_{ads}G_{hydr} + \Delta_{ads}G_{struct} \quad \text{Équation 24}$$

- $\Delta_{ads}G_{VdW}$ décrit les interactions attractives de van der Waals. Alors qu'elles sont souvent négligeables pour des polymères flexibles, les forces attractives de van der Waals sont significatives dans le processus de formation d'une couche compacte de protéines autour d'une particule.
- $\Delta_{ads}G_{EDL}$ décrit les interactions électrostatiques entre une protéine et une surface chargée. Cette interaction résulte d'un recouvrement entre les doubles couches électriques des objets chargés ce qui induit un changement de polarité dans la région interfaciale (on parle de neutralisation de charge)
- $\Delta_{ads}G_{hydr}$ décrit le changement d'hydratation conduisant à la déshydratation de la protéine et aux interactions hydrophobes lorsque la surface est apolaire.
- $\Delta_{ads}G_{struct}$ décrit les changements de conformation des protéines qui induisent un gain entropique, rendant favorable leur adsorption sur des surfaces. Effectivement, contrairement à des polymères flexibles dont l'attachement sur des surfaces conduit à une diminution de leur entropie conformationnelle, l'adsorption de protéines globulaires, fortement ordonnées en solution en raison de leur structure secondaire et tertiaire, augmente leur entropie conformationnelle. Ce gain entropique peut induire l'adsorption spontanée des protéines.

3.6.3 Modèle d'adsorption

Une des stratégies pour diminuer l'adsorption des protéines sur des surfaces consiste à modifier la nature des interactions protéines/surface à courte distance (pour des distances protéines/surface < 1 nm). Un moyen simple est de générer des forces répulsives à longue portée qui empêchent les protéines de venir au contact des surfaces. Ceci est généralement réalisé en enrobant les particules avec des matériaux inertes d'un point de vue chimique et hydrophile. Parmi d'autres, le poly(éthylène glycol) (ou poly(oxyde d'éthylène)), des polysaccharides (dextrane, acide hyaluronique, agarose, ...) ainsi que d'autres polymères neutres tels que le poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle) et le poly(acrylamide) ont démontré leur efficacité à minimiser les interactions protéines/surface du fait de leur hydrophilie combinée à des forces de répulsion d'origine stérique ou électrostatique. Néanmoins, la pegylation, c'est-à-dire la fonctionnalisation de particules par des chaînes de PEG est de loin la méthode la plus utilisée pour rendre les particules « furtives ». Effectivement, ce polymère est neutre, hydrophile, extrêmement flexible et est caractérisé aussi par une très forte hydratation de sa chaîne. Il a été aussi démontré qu'il induit une faible toxicité et une faible immunogénicité.^{141, 142}

Bien qu'imparfaitement compris à ce jour, les mécanismes expliquant la résistance des matériaux pegylés à l'adsorption des protéines sont fréquemment attribués aux effets d'exclusion stérique par une répulsion osmotique et à l'hydratation des chaînes.

Des approches théoriques et expérimentales ont montré que la longueur des chaînes (définie par leur rayon de Flory, R_F) et leur densité de greffage (défini par la distance entre deux points d'ancrage, D) sont les deux facteurs principaux influençant la capacité d'une couche de polymère à s'opposer à l'adhésion de protéines.¹⁴³⁻¹⁴⁸ Or, comme il a été expliqué dans la partie 3.5, ces deux paramètres définissent la conformation adoptée par les chaînes greffées à la surface un substrat (Figure 29).

La capacité des brosses polymères à prévenir l'adsorption de protéines a été étudiée d'un point de vue théorique par Jeon, Szeifer et Halperin. Leurs travaux ont permis de déterminer les facteurs cinétiques et thermodynamiques qui gouvernent l'interaction des protéines avec des substrats modifiés par des chaînes polymère. Jeon *et coll.* ont déterminé une densité optimale de chaînes de PEO formant une barrière stérique effective en fonction de la taille des protéines.^{145, 146} Néanmoins, ces travaux ne permettent pas d'étudier les cas où les chaînes de PEO sont petites ($M_w < 44$ g/mol). Szeifer *et coll.* ont modélisé les interactions entre des lysozymes avec une surface pegylée en utilisant la théorie des champs moyens appliquée à une unique chaîne.^{147, 149} Ils définissent l'interaction entre les protéines et la surface greffée par des chaînes de PEO comme la somme des interactions protéines/surface, polymère/surface, protéine/polymère et la conformation des protéines.

Halperin a exprimé le potentiel d'interaction entre des protéines et des surfaces greffées par des brosses de polymère comme la somme d'interactions individuelles protéine/surface nue (purement attractive) et protéine/brosse (purement répulsive), lui permettant de prédire la masse de protéine adsorbée en fonction de la densité de greffage du polymère¹⁴⁴.

Trois modes d'adsorption ont été proposés (Figure 31):

- **Cas A** : Adsorption primaire à la surface du substrat solide du fait de la diffusion des protéines au travers de la couche formée par les chaînes de polymère. Ce cas est rencontré pour de petites protéines dont la dimension (notée $D_{\text{protéine}}$) est plus petite que la distance entre chaînes. On parle d'adsorption par insertion.
- **Cas B** : Adsorption secondaire des protéines à la périphérie de la brosse polymère du fait des interactions attractives de van der Waals ou électrostatiques avec la surface.
- **Cas C** : Adsorption par compression de la brosse polymère, ce qui est une variation de l'adsorption primaire pour des grosses protéines. Ces deux derniers cas peuvent être rencontrés si la taille des protéines est plus importante que la distance interchaîne. Le cas C sera rencontré si la brosse est compressible.

La résistance à l'adhésion des protéines peut donc être améliorée en :

- **Augmentant la densité de greffage des chaînes** ce qui implique une diminution de la distance entre chaînes (suppression du cas A) et qui induit une diminution de la compressibilité de la brosse (suppression du cas C). Effectivement, la compression des chaînes de PEO induit une élévation locale de la concentration en monomères, augmentant l'énergie libre des chaînes ce qui se traduit par une interaction répulsive.
- **Augmentant la hauteur de la brosse** pour écranter les interactions protéines/substrats (suppression du cas B). Les interactions électrostatiques entre la surface et la protéine dépendent de la charge portée par cette dernière. La portée de ces interactions varie avec la concentration et la valence des ions présents en solution comme décrit par la longueur de Debye (Équation 6). Dans des conditions physiologiques, ces interactions ont une portée inférieure à 1 nm. Les liaisons hydrogène sont des interactions à courte portée impliquant une orientation privilégiée des groupements fonctionnels mis en jeu. Les forces hydrophobes sont des interactions à longue portée (>10 nm) dont l'intensité diminue avec une augmentation de la température.

Les trois modes d'adsorption des protéines sont basés sur l'hypothèse que les interactions entre les chaînes de PEO et les protéines sont répulsives. Cependant, Abbot *et coll.* ont mis en évidence une interaction de très faible amplitude (≈ 0.5 kT) entre des chaînes de PEO en solution et l'albumine de sérum bovin (BSA).¹⁵⁰

De même, Sheth *et coll.* ont montré l'existence d'une interaction entre la streptavidine et le PEO par mesure de force de surface et l'ont attribuée à un changement de conformation des unités monomères d'une conformation polaire (induisant la répulsion des protéines) à une conformation apolaire (induisant l'attraction des protéines).¹⁵¹⁻¹⁵³ Ce changement de conformation peut être induit soit par compression des chaînes soit en augmentant la température.

Pour tenir compte de ces interactions attractives faibles et non-spécifiques entre les chaînes polymère et les protéines, Halperin et Kröger ont développé un quatrième mode d'adsorption, l'adsorption ternaire qui correspond à l'adsorption des protéines dans la brosse (Cas D, Figure 31)¹⁵⁴.

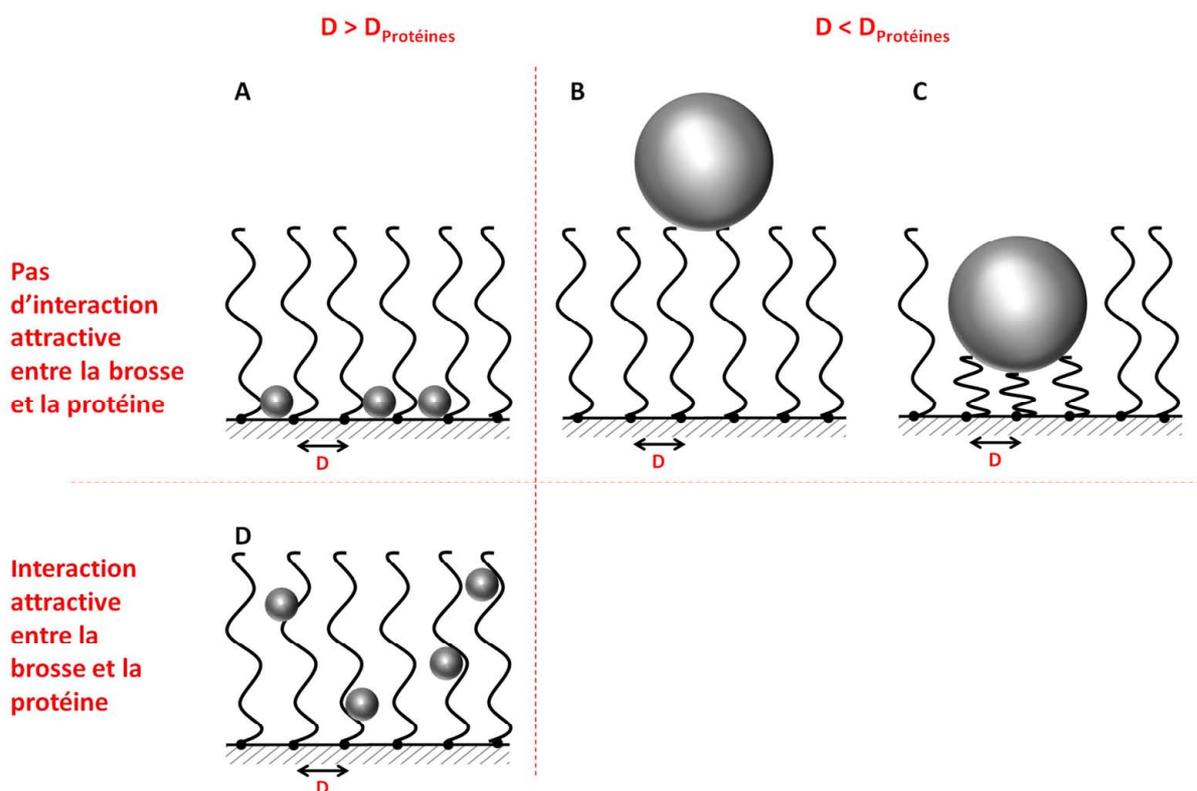


Figure 31. Modes d'adsorption des protéines sur des surfaces greffées par des polymères : (A) adsorption par insertion, (B) adsorption à la périphérie de la brosse polymère, (C) adsorption par compression de la brosse et (D) adsorption des protéines dans la brosse

Currie *et coll.* ont étudié la quantité de BSA adsorbée (Γ) sur des brosses de PEO en fonction de la densité de greffage et de la longueur des chaînes de PEO formant des brosses (Figure 32)¹⁵⁵. Ils ont montré que Γ présentait pour des chaînes relativement grandes ($N > 148$) un maximum aux faibles densités de greffage. Au-delà Γ diminue rapidement. Ce maximum fut expliqué comme la marque de l'adsorption ternaire correspond à l'interaction de la BSA avec les chaînes de PEO.

Effectivement, à des faibles densités de greffage, la BSA peut diffuser au travers de la brosse de PEO et s'adsorber sur les chaînes. Plus la densité de greffage augmente, plus la distance entre chaînes diminue induisant une augmentation de la répulsion osmotique qui s'oppose à l'insertion des molécules de BSA dans la couronne. Le fait que seules les longues chaînes de PEO ($N > 148$) montrent un maximum pour des faibles densités de greffage implique que ce maximum ne peut être dû à une adsorption primaire c'est-à-dire avec la surface ou à une adsorption secondaire puisque celle-ci diminue en augmentant la hauteur de la brosse. Les chaînes de PEO les plus petites ($N = 148$) ne montrent pas de maximum à de faibles densités de greffage car elles ne développent pas suffisamment d'interactions avec les protéines.

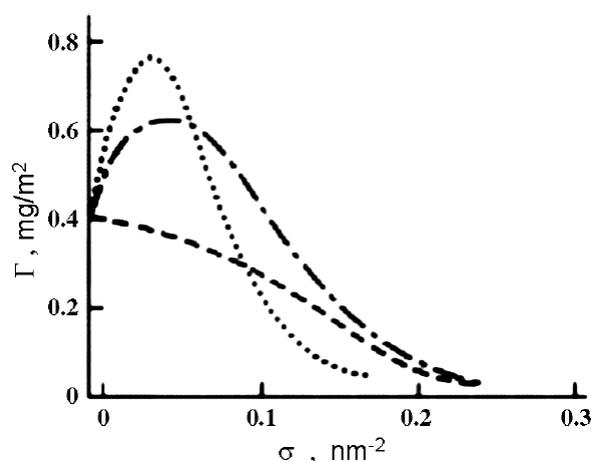


Figure 32. Quantité adsorbée de BSA sur des brosses de PEO avec $N=700$ (...), 445 (-.-) et 148 (- - -)¹⁵⁵.

Klok *et coll.* ont également évalué l'adsorption non-spécifique de fibrinogène fluorescent sur des brosses de poly(méthacrylate de poly(éthylène glycol)) en fonction de la quantité d'amorceur à la surface du substrat silicone¹⁵⁶. Cette dernière contrôle la densité de greffage des chaînes polymérisées par un mécanisme de transfert d'atome initié en surface (Figure 33 A). Plus la quantité d'amorceur est grande, plus les chaînes s'étirent d'où une augmentation de l'épaisseur de la couche polymère (Figure 33 B) et une diminution de la quantité de protéines adsorbées sur les substrats modifiés (Figure 33 C). On distingue trois régions sur le profil d'adsorption du fibrinogène sur les brosses de PPEGMA: jusqu'à une épaisseur de film de 20 nm, l'adsorption est significative et fortement décroissante, de 20 à 40 nm, l'adsorption est faible et constante et, au-delà de 40 nm, elle devient négligeable. Pour des faibles taux d'amorceur en surface, la brosse résultante est peu dense et la protéine peut s'adsorber par insertion de la brosse (Cas A décrit par Halperin). A mesure que la densité augmente, la pression osmotique croît et empêche l'insertion de protéine. Néanmoins cette dernière peut s'adsorber par compression de la brosse (Cas C). Mais également, du fait de l'augmentation de l'épaisseur du film jusqu'à 40 nm, les interactions attractives entre la surface solide et la protéine sont écartées et l'adsorption devient nulle.

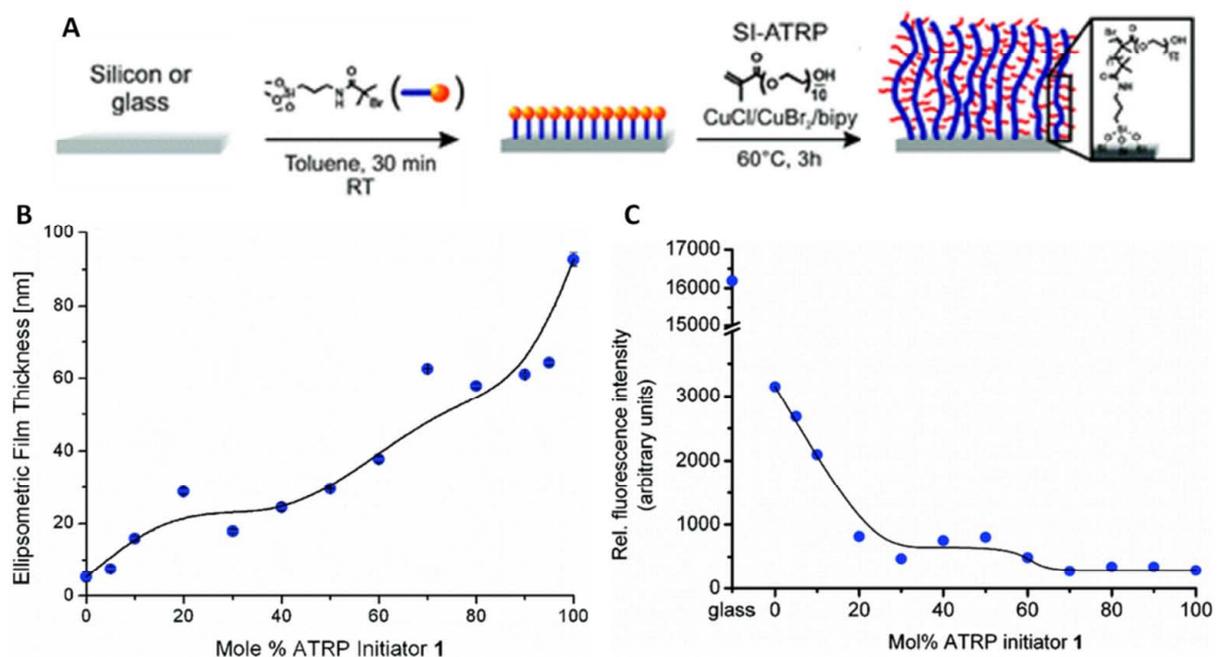


Figure 33. Représentation schématique de la synthèse de la brosse de PEGMA (A), épaisseur du film mesurée par ellipsométrie (B) et adsorption non-spécifique de fibrinogène marquée par l'alexa fluor 647 sur des brosses de PEGMA (C) en fonction de la quantité d'amorceur utilisée pour modifier la surface de silicone¹⁵⁶.

4 Systèmes à base de polymères thermosensibles

La température correspond au stimulus le plus utilisé pour perturber la solubilité des polymères en solution, et ceci de manière réversible. En particulier, les polymères présentant une température critique supérieure de démixtion, communément appelés polymères à LCST (lower critical solution temperature), présentent la propriété unique de voir leur solubilité diminuer lorsque la température de la solution augmente. Dans une stratégie d'auto-assemblage à base de copolymères à blocs, l'utilisation de tels blocs polymère permet d'envisager la micellisation d'un système copolymère par simple augmentation de la température.

4.1 Polymères à LCST en solution

4.1.1 Généralités

La solubilité d'un polymère dans un solvant donné dépend des interactions monomère-monomère, solvant-solvant et monomère-solvant. Dans le cas de l'eau qui est le principal solvant où l'on observe des comportements de type LCST, les interactions entre les molécules de solvant sont fortes et la structure de l'eau est elle-même organisée. La réponse en température que l'on observe avec un polymère à LCST dans l'eau comme le PEO ou le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) a une origine enthalpique et entropique. Pour des températures inférieures à la LCST, la solubilité du polymère est généralement attribuée à l'existence de liaisons hydrogène entre la partie polaire du polymère, par exemple les atomes d'oxygène dans le PEO et les molécules d'eau. Ces interactions sont associées à une variation d'enthalpie négative (exothermie). Comme les molécules d'eau ne peuvent pas former de liaisons hydrogène avec les parties apolaires de la chaîne polymère tels que les groupements éthylène dans le cas du PEO, on assiste à une certaine orientation des molécules d'eau autour de ces groupes (structure en cage appelée clathrate). La conséquence est une diminution de l'entropie du système. Lorsque la température est inférieure à la LCST, l'enthalpie de mélange fortement négative l'emporte sur la réduction d'entropie ce qui permet de solubiliser le PEO dans l'eau à température ambiante par exemple. Lorsque la température est supérieure à la LCST on observe une séparation de phase macroscopique résultant de deux effets à savoir l'augmentation d'entropie liée à la libération des molécules d'eau initialement en interaction avec les domaines apolaires du polymères et aussi une augmentation de l'enthalpie du système liée à la rupture des liaisons hydrogène. Le remplacement des interactions monomère-solvant par des interactions monomère-monomère et solvant-solvant conduit à la précipitation du polymère.

La température critique à laquelle se produit cette séparation de phase est évidemment dépendante de la structure des polymères, notamment la balance mettant en jeu les interactions hydrophiles/hydrophobes et les liaisons hydrogène. Taylor et Cerankowski ont proposé comme règle générale que la LCST est gouvernée par la balance hydrophile/hydrophobe du polymère.¹⁵⁷

Un exemple simple de cette dépendance est trouvé dans le travail de Nuhn et Klok qui ont étudié les phénomènes de LCST pour des peptides ayant une structure de type élastine. Leur étude a montré que d'une part, la LCST du peptide pouvait être modulée en contrôlant la balance hydrophile/hydrophobe du peptide, la température critique pouvant être diminuée en substituant un résidu valine par un résidu isoleucine, leucine ou phénylalanine (plus hydrophobe), et que d'autre part les évolutions de LCST observées sont corrélables avec les calculs théoriques du coefficient de partition ($\log P$).¹⁵⁸

De nombreux polymères possédant une LCST ont déjà été étudiés comme indiqué dans le Tableau 1 présentant les plus utilisés.

Tableau 1. Liste (non exhaustive) d'homopolymères présentant une LCST

Polymères thermosensibles	LCST (°C)	ref
Poly(N-isopropylacrylamide) : PNIPAAm	32	159
Poly(N,N'-diéthylacrylamide) : PDEAAm	25-32	160
Poly(oxyde de propylène) : PPO	10-20	161
Poly(méthyl éther de vinyle) : PVME	32-40	162
Poly(méthacrylate de 2-diméthylamino éthyle) : PMADAME	32-46	163
Poly(N-morpholino éthyl méthacrylate) : PMEMA	34-54	164
Poly(2-alkyl-1,3-oxazoline) : alkyle = a) éthyle, b) i-propyle, c) n-propyle	a) 60, b) 38, c) 27	165-167

La LCST du PEO autour de 100°C dans l'eau¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ a été largement étudiée d'un point de vue théorique^{171, 172}. Contrairement au PNIPAAm, la déshydratation des chaînes de PEO est davantage progressive.¹⁷³ La rupture des interactions PEO/eau avec la température a été attribuée à un changement de conformation des chaînes polymère induisant une modification des moments dipolaires de la macromolécule. A faible température, les atomes d'oxygène du PEO préfèrent une conformation *gauche* autour de la liaison C-C et une conformation *trans* autour des liaisons C-O¹⁷⁴. Cette conformation privilégiée induit l'apparition d'un moment dipolaire élevé qui favorise les interactions avec les molécules d'eau. Si la température augmente, la mobilité des chaînes augmente ce qui entraîne une modification des conformations qui elle-même conduit à une diminution du moment dipolaire (Figure 34). De ce fait, les interactions avec les molécules d'eau environnantes deviennent moins favorables.

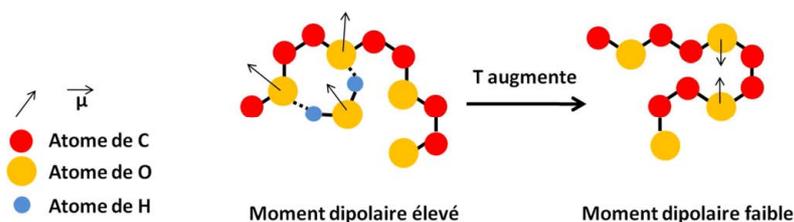


Figure 34. Représentation schématique de la conformation des chaînes de PEO et des moments dipolaires en fonction de la température

4.1.2 Modulation de la LCST

La modulation de la température critique d'un polymère est un enjeu important et a fait l'objet de nombreuses recherches. Différentes stratégies ont été étudiées pour modifier la balance hydrophile/hydrophobe d'un polymère.

4.1.2.1 Copolymérisation statistique avec des unités monomères neutres

La copolymérisation statistique d'un monomère formant un polymère à LCST avec un monomère hydrophile tend à augmenter la LCST du copolymère statistique ainsi synthétisé. Inversement, la copolymérisation avec un monomère hydrophobe diminue la LCST par rapport à l'homopolymère de référence. Par exemple, la copolymérisation du NIPAAm avec un monomère hydrophile (acrylamide, AAm) ou hydrophobe (N-test butyl-acrylamide, N-tBAAm) conduit à des valeurs de LCST très différentes¹⁷⁵ (Figure 35).

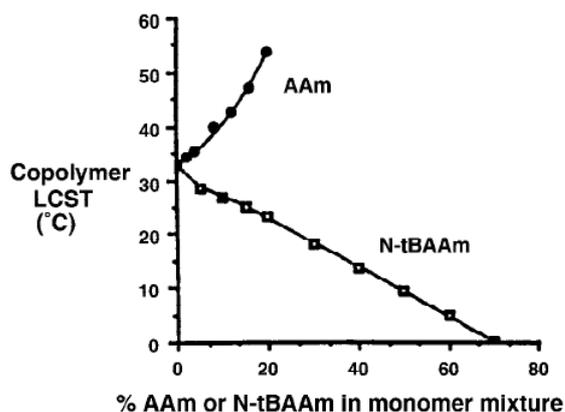


Figure 35. Effet de la copolymérisation du NIPAAm avec de l'acrylamide (co-monomère hydrophile) et du N-test butyl-acrylamide (co-monomère hydrophobe)¹⁷⁵

4.1.2.2 Copolymérisation statistique d'unités monomères ayant des LCST différentes

Une autre voie consiste à copolymériser de manière statistique deux monomères dont les homopolymères correspondants possèdent chacun une LCST. Ainsi, la température critique va osciller entre deux valeurs, en fonction de la fraction de chacun des deux blocs.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸

Par exemple, Lutz *et coll.* ont proposé la synthèse d'un copolymère statistique à base de deux monomères ayant des LCST différentes: le méthacrylate de 2-(2-méthoxyéthoxy)éthyle (MEO₂-MA) et l'oligo méthacrylate d'éthylène glycol (OEGMA), présentant respectivement une LCST de 26°C et de 90°C.¹⁷⁷ Les auteurs ont montré que la variation de la température critique du copolymère varie linéairement avec sa composition. Il est donc possible d'ajuster la température critique entre 26 et 90°C simplement en jouant sur la composition du mélange initial des monomères (Figure 36).

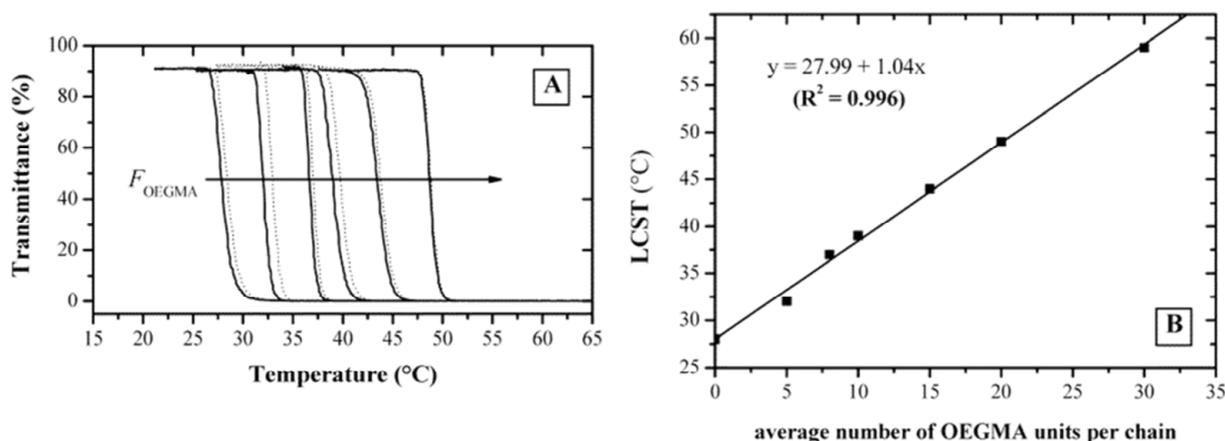


Figure 36. Evolution de la transmittance en fonction de la température ($\lambda = 670$ nm, vitesse d'échauffement = 1 °C min^{-1}) des copolymères de MEO₂-MMA et OEGMA contenant une fraction croissante d'unités OEGMA (A) et évolution de la LCST des copolymères en fonction du nombre d'unités OEGMA par chaîne de copolymère (B)¹⁷⁷.

4.1.2.3 Copolymérisation statistique avec des unités stimulables

Il est également possible d'incorporer des unités monomères dont la solubilité sera modifiée par l'application d'un autre stimulus que la température, tel que le pH. On peut notamment citer la copolymérisation statistique du NIPAAm avec des unités d'acide acrylique.^{179, 180} Pour des pH inférieurs au pKa de l'acide acrylique (~ 4.2), la température critique diminue avec le pH (Figure 37 A) et devient inférieure à celle de l'homopolymère PNIPAAm du fait de l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaires entre les unités NIPAAm et les fonctions acides, ce qui augmente le caractère hydrophobe du copolymère (Figure 37 B). Au-delà de pH=4.2, la majorité des fonctions acides sont dissociées ce qui tend à augmenter l'hydrophilie du système ; par conséquent la LCST devient trop importante pour être mesurée expérimentalement.

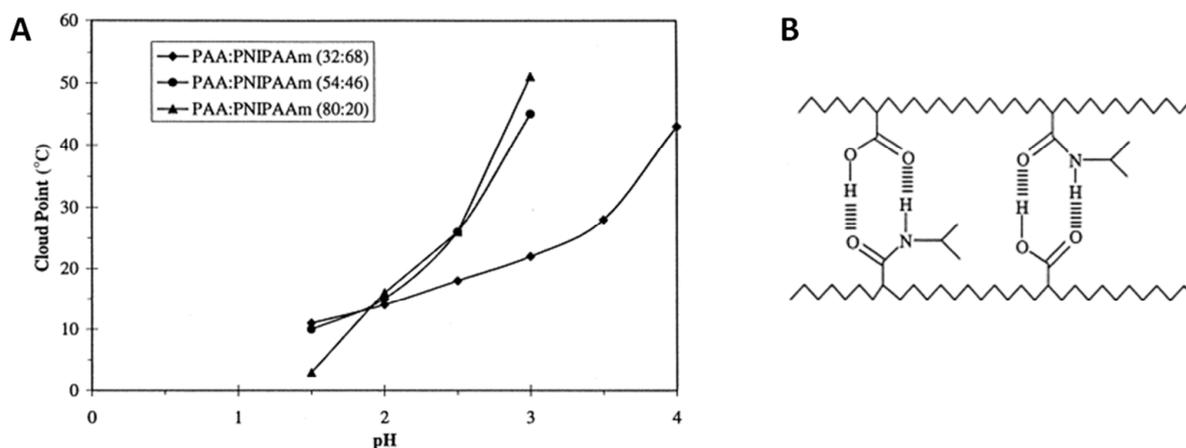


Figure 37. Evolution du point de trouble en fonction du pH pour différents copolymères présentant des fractions variables en PAA et PNIPAAm (A) et représentation schématique des liaisons hydrogène intermoléculaires entre les unités NIPAAm et acide acrylique (B) ¹⁷⁹.

De manière plus originale, des études ont montré que la LCST peut être affectée par l'introduction d'unités monomères changeant de conformation sous l'action de la lumière. La capacité de certains composés à répondre à la fois à la température et à la lumière a été introduite dans le milieu des années 80 avec le cas des gels de polyacrylamide contenant des groupements chromophores de type azobenzène.¹⁸¹ L'irradiation à $\lambda=350-400$ nm provoque un changement de conformation *trans-cis*. La conformation *trans* confère au polymère un caractère plus hydrophobe provoquant l'abaissement de la LCST du polyacrylamide et inversement lorsque les groupements azobenzènes sont sous leur conformation *cis*.¹⁸²

4.1.2.4 Copolymérisation séquentielle

La copolymérisation séquentielle (copolymères à blocs) d'un polymère thermosensible permet également de faire varier la LCST mais de façon moins sensible que dans le cas de la copolymérisation statistique. Différentes équipes ont observé que l'ajout d'un bloc hydrophile peut, en effet, augmenter le caractère hydrophile du copolymère et augmenter ainsi sa LCST.^{28, 183-185} Le système PNIPAAm-*b*-poly(acide glutamique) (PNIPAAm-*b*-PGA) a été étudié et une LCST vers 38-39 °C a été mesurée, soit une augmentation de 6-7 °C par rapport à l'homopolymère PNIPAAm.¹⁸⁴ D'autres auteurs ont montré le même comportement en faisant varier la composition.¹⁸⁵

4.1.2.5 Incorporation de groupements aux extrémités des chaînes

L'incorporation de groupements hydrophiles ou hydrophobes aux extrémités de chaînes d'un polymère thermosensible est un moyen de modifier notablement sa LCST.¹⁸⁶ En effet, le phénomène d'agrégation des chaînes commence tout d'abord par les extrémités de chaînes du fait de leur grande mobilité.²⁸

Okano *et coll.* ont ainsi montré l'influence de l'incorporation de groupements hydrophiles et hydrophobes terminaux sur la LCST du PNIPAAm, par comparaison avec les résultats d'une copolymérisation statistique. Concernant l'incorporation d'entités hydrophobes, la LCST diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente (PNIPAAm- C_nH_{2n-1} , $n=3, 6, 8, 12, 18$).¹⁸⁷ Inversement, l'incorporation d'entités hydrophiles aux extrémités des chaînes de PNIPAAm tend à augmenter la LCST de façon très importante ($\sim 20^\circ\text{C}$).¹⁸⁸ Comme attendu, la variation de la LCST dépend toutefois de la nature chimique du groupement terminal. L'influence d'un groupement alcool est ainsi beaucoup plus importante que celle d'une fonction amine, ce qui est corrélé avec la possibilité de formation de liaisons hydrogène avec les molécules d'eau.

4.2 Systèmes polymères auto-assemblés à LCST

La modification de solubilité dans l'eau en fonction de la température a été mise à profit pour développer des systèmes micellaires à base de copolymères à blocs capables de s'assembler ou s'agréger de manière réversible.

4.2.1 Systèmes micellaires auto-assemblé par élévation de température

Dans un premier temps, on considère des copolymères à blocs portant un bloc hydrophile et un bloc à LCST. Pour des températures inférieures à la LCST du bloc thermosensible, le copolymère est sous forme de chaînes libres. L'augmentation de température provoque l'agrégation des blocs thermosensibles et la formation d'agrégats micellaires stabilisés par les blocs hydrophiles empêchant la précipitation macroscopique du système.

Différentes morphologies ont été mises en évidence selon la nature du bloc hydrophile associé au bloc thermosensible, généralement le PNIPAAm. Les structures cœur-écorce correspondent à la morphologie la plus répandue. A titre d'exemple, les copolymères à blocs PNIPAAm-*b*-PEO conduisent à des structures micellaires par agrégation des blocs PNIPAAm et stabilisation par les blocs PEO.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ D'autres systèmes doublement hydrophiles ont été développés.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Le poly(N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide) (PHPMA), par exemple a été utilisé lors de l'étude du copolymère PNIPAAm-*b*-PHPMA. La taille et la masse molaire des particules formées à partir de l'auto-assemblage des copolymères à blocs PNIPAAm-*b*-PHPMA diminuent avec la fraction de HPMA dans le copolymère¹⁹⁴.

Mc Cormick *et coll.* ont été les premiers à décrire la formation de vésicules polymères en chauffant une solution aqueuse de copolymères à double blocs hydrophiles, le PNIPAAm-*b*-poly(méthacrylamide de chlorure de N-(3-propylammonium)) (PNIPAAm-*b*-PAMPA) (Figure 38 B et C)¹⁹⁵. Ils ont montré que la vitesse de chauffe est un paramètre crucial pour l'obtention de telles vésicules. Pour obtenir une distribution en taille étroite, la solution doit être chauffée à $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$.

A une concentration de 5 mg/mL, une augmentation de la température de 25 à 45 °C sur 5 min conduit à une distribution en taille plus large (Figure 38 C). De plus, les auteurs ont mis en évidence que l'ajout d'un polyanion, le poly(2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonate de sodium) (PAMPS) permettait de « figer » la structure vésiculaire quelque soit la température, rendant impossible pour les chaînes PNIPAAm-*b*-PAMPA le retour à l'état d'unimères.

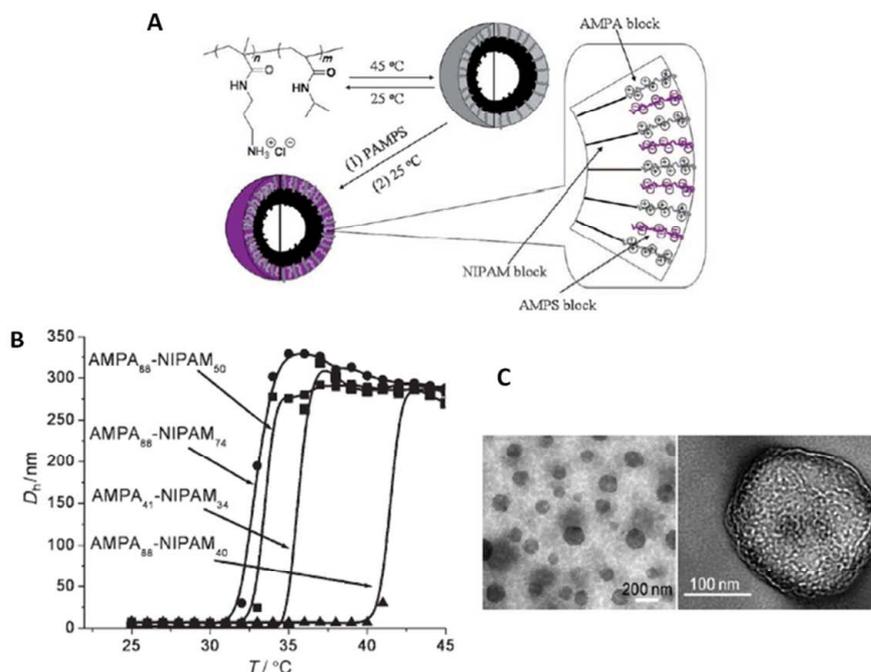


Figure 38. Représentation schématique des différentes conformations adoptées par les chaînes de PNIPAAm-*b*-PAMPS en fonction de la température et en présence d'un polyanion PAMPS (A), évolution des diamètres hydrodynamiques des objets formés à partir du PNIPAAm-*b*-PAMPS à 0.5% (w/w) dans l'eau en fonction de la température (vitesse de chauffe 0.1 °C/min) (B) et images de microscopie électronique à transmission des objets formés à partir de PNIPAAm₅₀-*b*-PAMPS₈₈ (vitesse de chauffe rapide) (C) ¹⁹⁵.

Dans l'optique de mieux comprendre les phénomènes de LCST, Agut *et coll.* ont étudié l'auto-assemblage induit par élévation de température d'un copolymère à blocs doublement hydrophile, la jeffamine-*b*-poly(L-acide glutamique) (Jeffamine-*b*-PGA) par diffusion de la lumière et par diffusion des neutrons (Figure 39 A et B).¹⁹⁶ La Jeffamine est un copolymère statique composée d'unités d'oxyde de propylène et d'oxyde d'éthylène et qui possède une LCST en solution aqueuse voisine de 30 °C. L'augmentation de la température induit l'agrégation des chaînes jeffamine et l'auto-assemblage en structure cœur-écorce. La combinaison des deux techniques de diffusion a montré que, bien que des objets soient formés dès 36 °C, à cette température le taux d'hydratation du cœur formé des chaînes de jeffamine vaut encore 80%, ce n'est qu'à 66 °C que la déshydratation du cœur est complète, le taux d'hydratation étant déterminé par le rapport des volumes des cœurs mesurés par diffusion des neutrons, en considérant qu'à 66 °C la déshydratation est complète et que le nombre d'agrégation est constant.

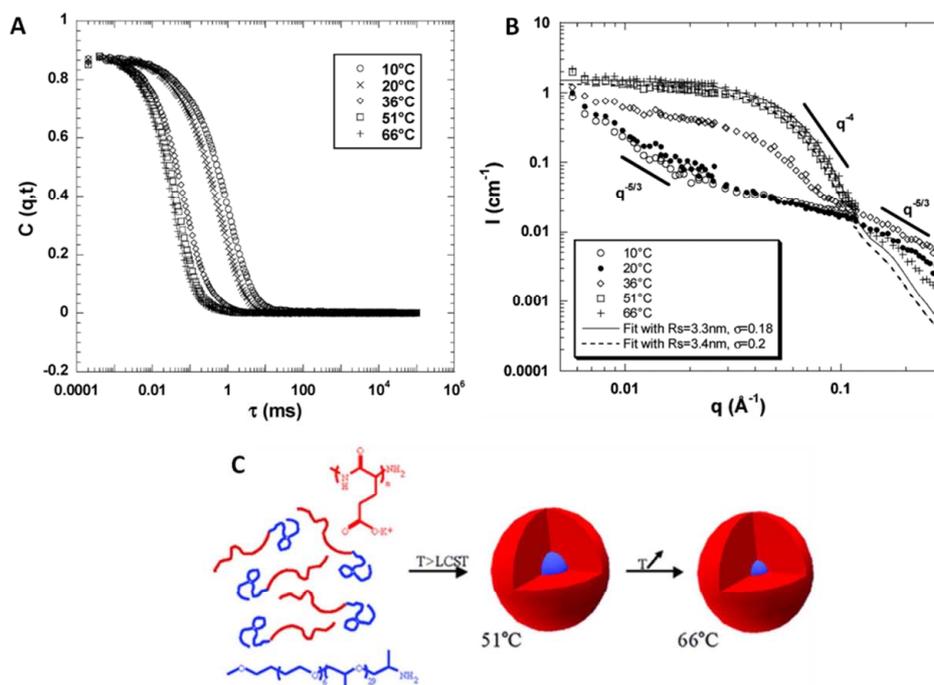


Figure 39. Courbes d'auto-corrélation $C(q, t)$ mesurées par DLS à 90° (A) et variation de l'intensité en diffusion des neutrons en fonction du vecteur d'onde q d'une solution aqueuse de Jeffamine-b-PGA30 (25 mg/mL, pH 11) ; Représentation schématique des différentes conformations adoptées par les chaînes de Jeffamine-b-PGA en fonction de la température.¹⁹⁶

4.2.2 Systèmes micellaires thermosensibles

La littérature présente également de nombreuses études sur des objets micellaires stabilisés par une couronne thermosensibles. Généralement, les micelles à couronne thermosensible sont issues de l'auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles, ou de copolymères possédant des blocs polyélectrolytes de charges opposés. Néanmoins, le problème majeur de ces systèmes est la probable agrégation induite par élévation de la température, celle-ci induisant la déshydratation de la couronne polymère stabilisante.

L'auto-assemblage en milieu aqueux du copolymère poly(ϵ -caprolactone)-*b*-PNIPAAm-*b*-poly(ϵ -caprolactone) (PCL-*b*-PNIPAAm-*b*-PCL) permet la formation de micelles dont le cœur est composé des segments hydrophobes de PCL et stabilisés par les blocs de PNIPAAm thermosensibles. L'intérêt de tels systèmes réside dans le fait que le cœur hydrophobe peut servir de réservoir pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes, tel que cela a été montré dans cette étude avec l'encapsulation d'acétate de prednisone. L'élévation de la température au-delà de la LCST du PNIPAAm induit un changement de structure de la micelle et accélère la libération des molécules encapsulées. Néanmoins, ce phénomène s'accompagne également d'une augmentation drastique de l'absorbance du milieu traduisant l'agrégation des particules.¹⁹⁷ Ce phénomène d'agrégation fut également observé par Wei *et coll.* lors de l'étude de l'auto-assemblage du copolymère poly(L-lactide-star)-*b*-PNIPAAm¹⁹⁸ ou par Kitan *et coll.* avec des particules d'or modifiées en surface par du poly(méthacrylate de 2-(2-méthoxyéthoxy) éthyle).¹⁹⁹ Ainsi, pour palier à ces problèmes des systèmes plus complexes ont été élaborés.

Shi *et coll.* ont étudié la formation de micelles sphériques à partir d'un mélange de poly(4-vinylpyridine)-*b*-PEO (P4VP-*b*-PEO) et de P4VP-*b*-PNIPAAm en solution aqueuse.²⁰⁰ L'auto-assemblage est induit en milieu acide par la présence d'un anion divalent (SO_4^{2-}) et conduit à la formation de micelles avec un cœur formé de P4VP et stabilisé par une écorce de PEO/PNIPAAm. De manière similaire, Voets *et coll.* ont étudiée l'auto-assemblage d'un mélange de copolymères à blocs : poly(iodure de N-méthyl-2-vinylpyridinium)-*b*-PEO (P2MVP-*b*-PEO) et de poly(acide acrylique)-*b*-PNIPAAm (PAA-*b*-PNIPAAm).²⁰¹ Dans les deux cas l'élévation de la température jusqu'à 50 °C résulte de la contraction des segments PNIPAAm tandis que les chaînes de PEO forment des « tunnels » semi-perméables. Bien que la solubilité du PEO est amoindrie par l'élévation de température, elle demeure suffisante pour assurer la stabilité colloïdale des objets en solution.

4.3 LCST aux interfaces

Les brosses thermosensibles résultant de l'adsorption ou du greffage de polymères thermosensibles sur un substrat solide sont considérées comme des surfaces « intelligentes » car elles voient leur balance hydrophile/hydrophobe modifiée en fonction de la température.²⁰² Dans la littérature, on trouve de nombreux exemples d'application, notamment en chromatographie²⁰³, en culture cellulaire²⁰⁴⁻²⁰⁷, pour la libération de principe actifs²⁰⁸⁻²¹⁰, pour l'adsorption sélective de protéines²¹¹⁻²¹³ ou bien en tant que détecteur de température²¹⁴.

Des études expérimentales²¹⁵⁻²¹⁹ et théoriques²²⁰, concernant la transition en température de brosses thermosensibles ont mis en évidence que la transition en température de tels matériaux s'opère sur des gammes de température plus larges que pour des chaînes thermosensibles en solution et que l'amplitude de cette transition dépend de la densité de greffage des chaînes ainsi que de leur longueur.

Comme cela est le cas en solution, le PNIPAAm est le polymère thermosensible le plus étudié aux interfaces solide/liquide. Alors qu'en solution ce polymère présente une LCST voisine de 32 °C, la transition en température observée pour les brosses de PNIPAAm débute à des températures moindres et la transition s'effectue sur une gamme de températures plus large (d'environ 29 °C à 40 °C).^{218, 221}

Yim *et coll.* ont étudié l'influence de la masse molaire et de la densité des chaînes sur les changements de conformations des chaînes de PNIPAAm dans une brosse.²²² En utilisant la réflectivité des neutrons, ils ont mis en évidence que pour des brosses très denses (0.3 chaînes/nm²), les changements de conformation étaient plus importants pour les chaînes de petite masse molaire que pour des longues chaînes. A l'inverse, il a été montré que pour des densités de greffage beaucoup plus faibles (0.06 chaînes/nm²) la tendance était inversée.²²³

Or, comme nous l'avons expliqué précédemment, la longueur des chaînes et la densité de greffage sont les deux paramètres déterminant la conformation que les chaînes adoptent à la surface d'un substrat (brosse ou champignon). D'après ces expériences, il apparaît que les changements de conformation sont les plus importants pour des densités de greffage intermédiaires. Minko a proposé une explication à ce phénomène étonnant.²²⁴ Pour de faibles densités de greffage, les chaînes adoptent une conformation proche de celle en solution et il en est de même pour leurs réponses vis-à-vis d'une élévation de température. A l'inverse, pour de fortes densités de greffage, les chaînes sont étirées du fait de la pression osmotique et la place disponible pour d'éventuels changements de conformation est faible. De ce fait, elles sont moins sensibles au changement de qualité du solvant et la hauteur de la brosse varie donc peu avec la température. Pour des densités de greffage intermédiaires, les « brosses » sont instables en mauvais solvant et forment des « clusters » à la surface pour minimiser les interactions polymère/solvant. En bon solvant, les brosses sont gonflées. Ainsi, la plus grande variation de conformation est atteinte pour des densités de greffage correspondant au seuil de formation des brosses, c'est-à-dire, quand les chaînes commencent à interagir les unes avec les autres.

Malham *et coll.* ont également étudié l'influence de la densité de greffage de chaînes de PNIPAAm sur l'amplitude de la transition en température de la brosse en mesurant les forces de surface (Figure 40A).²¹⁷ Ils ont clairement mis en évidence que le taux de gonflement, c'est-à-dire, le ratio entre la hauteur d'une brosse gonflée (à basse température) et celle d'une brosse contractée (à haute température) diminuait à mesure que la densité de greffage augmente (Figure 40B).

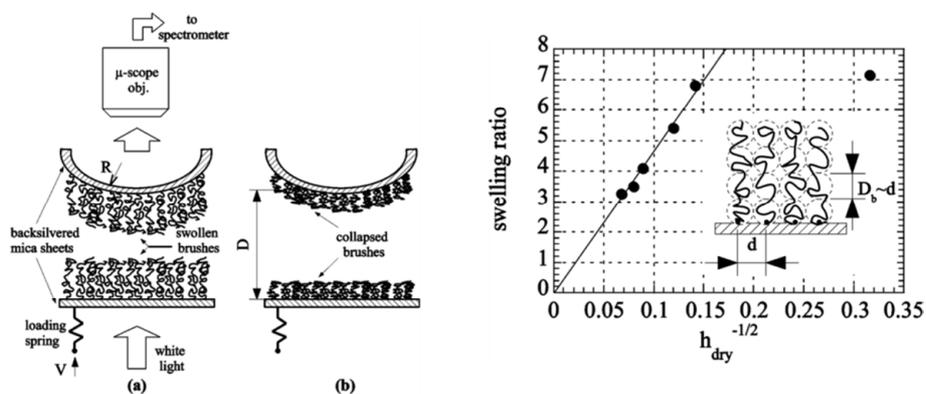


Figure 40. (A) Illustration schématique du montage expérimental permettant de mesurer les forces de surfaces entre deux brosses approchantes ; (B) évolution du taux de gonflement d'une brosse de PNIPAAm en fonction de $h_{dry}^{-1/2}$ (\approx distance entre deux chaînes).²¹⁷

L'étude de Jonas *et coll.* concernant la transition en température de brosses thermosensibles « en patch » corrobore également la dépendance de la transition par rapport aux nombre de degrés de liberté des chaînes.²²⁵ Effectivement, ils ont observé par microscopie à force atomique que plus le diamètre des nano-brosses diminuait (Figure 41A), plus la contraction était grande.

Ceci s'explique par le fait que plus le diamètre des broses est faible et plus l'écartement des chaînes (densité de monomères) augmente avec la surface. Les chaînes ont donc une entropie conformationnelle plus grande et se contractent plus facilement (Figure 41B).

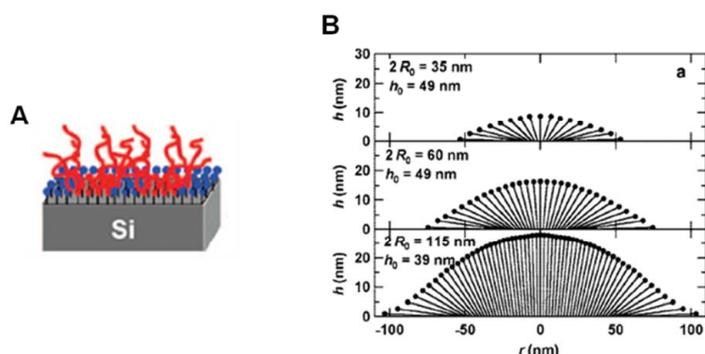


Figure 41. Illustration des nano-brosses thermosensibles (A) et orientation des chaînes dans la brosse en fonction du diamètre du patch (les points représentent les chaînes libres)²²⁵.

Laloyaux *et coll.* se sont intéressés au phénomène de contraction des broses thermosensibles et plus précisément à leur progressivité²¹⁶. Par des mesures d'angles de contact et de dissipation par microbalance à cristal de quartz, ils ont mis en évidence une séparation de phase dans la hauteur d'une brosse thermosensible qui apparaît lors de sa contraction. En particulier, les auteurs ont démontré, l'existence de deux températures de transition, une première, caractéristique de la contraction des segments polymère proches de la surface (T_{br}^{bulk}) et, une seconde, relative à la contraction des segments contenus dans la partie supérieure de la brosse (T_{br}^{surf}). (Figure 42) En outre, ils ont également montré que T_{br}^{bulk} est plus basse de 8 °C que T_{br}^{surf} , elle-même plus basse de 5 °C que la température de transition des chaînes en solution. L'apparition de ces deux régimes de transition s'explique par la dépendance de la qualité du solvant avec la concentration en monomère. D'après des modèles théoriques, la concentration en monomères décroît avec en s'éloignant de la surface. Ainsi, la contraction dans la brosse thermosensible débute dans la partie basse de la brosse où la densité en monomère est la plus grande.

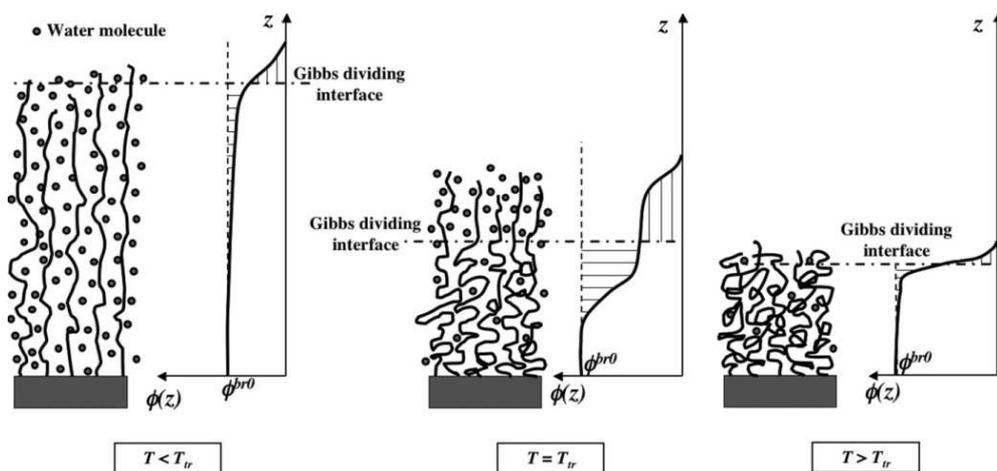


Figure 42. Représentation schématique d'une séparation de phase verticale observée lors de la contraction de brosses de polymère thermosensible.²¹⁶

Ceci explique pourquoi la contraction de brosses thermosensibles s'opère sur des gammes plus larges en température que dans le cas de chaînes polymères en solution où la concentration est homogène.

5 Conclusion

Il apparaît que les nanoparticules (NPs) hybrides magnétiques présentent de nombreux intérêts dans le domaine de la nanomédecine et ouvrent la voie à de nouveaux systèmes dits multifonctionnels combinant à la fois des propriétés de diagnostic et de thérapie, d'où le terme de théranostique qui leur est associé. La compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la reconnaissance des NPs a permis d'imaginer des stratégies permettant d'éviter cette élimination précoce. Les avancées dans le domaine de la chimie des matériaux et des polymères en particulier ont également permis de développer des matériaux « intelligents » capables de franchir les barrières biologiques, de cibler des zones d'intérêt et d'y libérer des molécules thérapeutiques sous l'effet d'un stimulus externe. En outre, la présence d'un agent de contraste permet de visualiser les zones ciblées afin d'avoir un diagnostic précis.

C'est dans le but d'offrir de nouvelles stratégies de diagnostic et de thérapie pour des pathologies impliquant le franchissement de la barrière hémato-encéphalique que cette thèse s'est inscrite. L'objectif était de concevoir des NPs hybrides sensibles à l'IRM, furtives, dotées de propriétés de ciblage et contenant un principe actif capable d'être libéré par hyperthermie sous l'effet d'un champ magnétique. Ainsi, nous avons choisi de fonctionnaliser par voie non-covalente des NPs inorganiques magnétiques, jouant le rôle d'agents de contraste pour l'IRM et d'inducteur de chaleur, avec des copolymères à blocs double hydrophiles dérivés du poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(L-Lysine).

Les étapes qui ont jalonné la mise au point du vecteur multifonctionnel ont été la synthèse des copolymères, l'étude de leur adsorption sur le substrat considéré, la capacité d'encapsulation d'un principe actif dans la couronne polymère, et enfin, la fonctionnalisation de cette dernière par des peptides de ciblage et des agents de fluorescence. Pour finir, l'efficacité du ciblage de ces NPs a été évaluée *in vivo*.

6 Références

1. C. Khemtong, C. W. Kessinger and J. Gao, *Chemical Communications*, 2009, 3497-3510.
2. C. H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras and A. Ostman, *Nature Reviews Cancer*, 2004, **4**, 806-813.
3. D. E. Owens and N. A. Peppas, *Int. J. Pharm.*, 2006, **307**, 93-102.
4. G. P. Stathopoulos, T. Boulikas, M. Vougiouka, G. Deliconstantinos, S. Rigatos, E. Darli, V. Viliotou and J. G. Stathopoulos, *Oncology Reports*, 2005, **13**, 589-595.
5. F. Lu, S.-H. Wu, Y. Hung and C.-Y. Mou, *Small*, 2009, **5**, 1408-1413.
6. H. Lee, H. Fonge, B. Hoang, R. M. Reilly and C. Allen, *Molecular Pharmaceutics*, 2010, **7**, 1195-1208.
7. E. Igarashi, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, **229**, 121-134.
8. F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar and O. C. Farokhzad, *Molecular Pharmaceutics*, 2008, **5**, 505-515.
9. F. Danhier, O. Feron and V. Preat, *Journal of Controlled Release*, 2010, **148**, 135-146.
10. M. O. Oyewumi, R. A. Yokel, M. Jay, T. Coakley and R. J. Mumper, *Journal of Controlled Release*, 2004, **95**, 613-626.
11. R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Kuwata, M. Mutoh, N. Ishiguro, N. Utoguchi, A. Shinohara, M. Eriguchi, H. Yanagie and K. Maruyama, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, **346**, 143-150.
12. J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F. X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer and O. C. Farokhzad, *Biomaterials*, 2007, **28**, 869-876.
13. Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones and J. Dobson, *Journal of Physics D-Applied Physics*, 2003, **36**, R167-R181.
14. J. Dobson, *Drug Development Research*, 2006, **67**, 55-60.
15. C. Alexiou, R. J. Schmid, R. Jurgons, M. Kremer, G. Wanner, C. Bergemann, E. Huenges, T. Nawroth, W. Arnold and F. G. Parak, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2006, **35**, 446-450.
16. T. Neuberger, B. Schopf, H. Hofmann, M. Hofmann and B. von Rechenberg, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, **293**, 483-496.
17. G. Loch-Neckel and J. Koeppe, [*The blood-brain barrier and drug delivery in the central nervous system*], 2010.
18. P. Ballabh, A. Braun and M. Nedergaard, *Neurobiology of Disease*, 2004, **16**, 1-13.
19. I. Brasnjevic, H. W. M. Steinbusch, C. Schmitz and P. Martinez-Martinez, *Progress in Neurobiology*, 2009, **87**, 212-251.
20. G. Tosi, L. Costantino, B. Ruozi, F. Forni and M. A. Vandelli, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2008, **5**, 155-174.
21. W. Kamphorst, A. G. de Boer and P. J. Gaillard, *Journal of Clinical Pathology*, 2002, **55**, 158.
22. S. P. Vyas, A. Singh and V. Sihorkar, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2001, **18**, 1-76.
23. R. Gabathuler, *Neurobiology of Disease*, 2010, **37**, 48-57.
24. H. L. Wong, N. Chattopadhyay, X. Y. Wu and R. Bendayan, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**, 503-517.
25. C. Sanson, Université de Bordeaux 1, 2010.
26. F. Ahmed, R. I. Pakunlu, A. Brannan, F. Bates, T. Minko and D. E. Discher, *Journal of Controlled Release*, 2006, **116**, 150-158.
27. C. D. H. Alarcon, S. Pennadam and C. Alexander, *Chemical Society Reviews*, 2005, **34**, 276-285.
28. E. S. Gil and S. M. Hudson, *Progress in Polymer Science*, 2004, **29**, 1173-1222.
29. H. Cabral and K. Kataoka, *Science and Technology of Advanced Materials*, 2010, **11**, 014109.

30. A. Potineni, D. M. Lynn, R. Langer and M. M. Amiji, *Journal of Controlled Release*, 2003, **86**, 223-234.
31. D. Shenoy, S. Little, R. Langer and M. Amiji, *Molecular Pharmaceutics*, 2005, **2**, 357-366.
32. H. Devalapally, D. Shenoy, S. Little, R. Langer and M. Amiji, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2007, **59**, 477-484.
33. S. F. Medeiros, A. M. Santos, H. Fessi and A. Elaissari, *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, **403**, 139-161.
34. D. T. Auguste, K. Furman, A. Wong, J. Fuller, S. P. Armes, T. J. Deming and R. Langer, *Journal of Controlled Release*, 2008, **130**, 266-274.
35. J. E. Chung, M. Yokoyama, M. Yamato, T. Aoyagi, Y. Sakurai and T. Okano, *Journal of Controlled Release*, 1999, **62**, 115-127.
36. J. E. Chung, M. Yokoyama and T. Okano, *Journal of Controlled Release*, 2000, **65**, 93-103.
37. C. Cheng, H. Wei, B. X. Shi, H. Cheng, C. Li, Z. W. Gu, S. X. Cheng, X. Z. Zhang and R. X. Zhuo, *Biomaterials*, 2008, **29**, 497-505.
38. C. Cheng, H. Wei, J. L. Zhu, C. Chang, H. Cheng, C. Li, S. X. Cheng, X. Z. Zhang and R. X. Zhuo, *Bioconjugate Chemistry*, 2008, **19**, 1194-1201.
39. N. Y. Rapoport, D. A. Christensen, H. D. Fain, L. Barrows and Z. Gao, *Ultrasonics*, 2004, **42**, 943-950.
40. N. Rapoport, W. G. Pitt, H. Sun and J. L. Nelson, *Journal of Controlled Release*, 2003, **91**, 85-95.
41. N. Rapoport, *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, **277**, 155-162.
42. J. M. Stern, J. Stanfield, W. Kabbani, J.-T. Hsieh and J. A. Cadegdu, *The Journal of Urology*, 2008, **179**, 748-753.
43. C. Brazel, *Pharmaceutical Research*, 2009, **26**, 644-656.
44. S.-M. Lee, H. Park and K.-H. Yoo, *Advanced Materials*, 2010, **22**, 4049-4053.
45. G. Chuto and P. Chaumet-Riffaud, *Médecine Nucléaire*, 2010, **34**, 370-376.
46. M. H. Falk and R. D. Issels, *International Journal of Hyperthermia*, 2001, **17**, 1-18.
47. A. Jordan, R. Scholz, K. Maier-Hauff, M. Johannsen, P. Wust, J. Nadobny, H. Schirra, H. Schmidt, S. Deger, S. Loening, W. Lanksch and R. Felix, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2001, **225**, 118-126.
48. E. Duguet, S. Vasseur, S. Mornet and J. M. Devoisselle, *Nanomedicine*, 2006, **1**, 157-168.
49. S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst and R. N. Muller, *Chemical Reviews*, 2008, **108**, 2064-2110.
50. A. Ito, K. Tanaka, H. Honda, S. Abe, H. Yamaguchi and T. Kobayashi, *The Society for Biotechnology, Japan*, 2003, **96**, 364-369.
51. C. Barcena, A. K. Sra and J. Gao, in *Nanoscale Magnetic Materials and Applications*, eds. J. P. Liu, E. Fullerton, O. Gutfleisch and D. J. Sellmyer, Springer-Verlag, New-York, 2009, ch. 20, pp. 591-625.
52. S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset and E. Duguet, *Journal of Materials Chemistry*, 2004, **14**, 2161-2175.
53. C. Corot, P. Robert, J. M. Idee and M. Port, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**, 1471-1504.
54. M. Johannsen, U. Gneveckow, K. Taymoonan, B. Thiesen, N. Waldofener, R. Scholz, C. H. Cho, A. Jordan, P. Wust and S. A. Loening, *Eur. Urol. Suppl.*, 2007, **6**, 201-201.
55. A. Jordan and K. Maier-Hauff, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2007, **7**, 4604-4606.
56. E. Pollert, O. Kaman, P. Veverka, M. Veverka, M. Marysko, K. Zaveta, M. Kacenska, I. Lukes, P. Jendelova, P. Kaspar, M. Burian and V. Herynek, *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 2010, **368**, 4389-4405.
57. S. Vasseur, E. Duguet, J. Portier, G. Goglio, S. Mornet, E. Hadová, K. Knížek, M. Marysko, P. Veverka and E. Pollert, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2006, **302**, 315-320.
58. E. O. Wollan and W. C. Koehler, *Physical Review*, 1955, **100**, 545.

59. R. Epherre, E. Duguet, S. Mornet, E. Pollert, S. Louguet, S. Lecommandoux, C. Schatz and G. Goglio, *Journal of Materials Chemistry*, 2011.
60. M. Kacenska, O. Kaman, J. Kotek, L. Falteisek, J. Cerny, D. Jirak, V. Herynek, K. Zacharovova, Z. Berkova, P. Jendelova, J. Kupcik, E. Pollert, P. Veverka and I. Lukes, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 157-164.
61. O. V. Melnikov, O. Y. Gorbenko, M. N. Āarkelova, A. R. Kaul, V. A. Atsarkin, V. V. Demidov, C. Soto, E. J. Roy and B. M. Odintsov, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, **91A**, 1048-1055.
62. C. Sanson, O. Diou, J. Thévenot, E. Ibarboure, A. Soum, A. Brûlet, S. Miraux, E. Thiaudière, S. Tan, A. Brisson, V. Dupuis, O. Sandre and S. b. Lecommandoux, *ACS Nano*, 2011, null-null.
63. S. Purushotham and et al., *Nanotechnology*, 2009, **20**, 305101.
64. T.-Y. Liu, S.-H. Hu, K.-H. Liu, R.-S. Shaiu, D.-M. Liu and S.-Y. Chen, *Langmuir*, 2008, **24**, 13306-13311.
65. M. Goutayer, Université Pierre & Marie Curie - Paris 6, 2008.
66. T. F. Massoud and S. S. Gambhir, *Genes Dev.*, 2003, **17**, 545-580.
67. V. Dominik Weishaupt, *How Does MRI Work?*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.
68. R. B. Lauffer, *Chemical Reviews*, 1987, **87**, 901-927.
69. H. Ai, C. Flask, B. Weinberg, X. T. Shuai, M. D. Pagel, D. Farrell, J. Duerk and J. Gao, *Advanced Materials*, 2005, **17**, 1949-1952.
70. X. Yang, S. Pilla, J. J. Grailer, D. A. Steeber, S. Gong, Y. Chen and G. Chen, *Journal of Materials Chemistry*, 2009, **19**, 5812-5817.
71. Z.-R. Lu, F. Ye and A. Vaidya, *Journal of Controlled Release*, 2007, **122**, 269-277.
72. J. Mobley and T. Vo-Dinh, in *Biomedical Photonics Handbook*, ed. T. Vo-Dinh, CRC Press. p., 2003, ch. Chapter 2.
73. F. Leblond, S. C. Davis, P. A. Valdés and B. W. Pogue, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2010, **98**, 77-94.
74. J. V. Frangioni, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, **7**, 626-634.
75. J. Cheon and J.-H. Lee, *Accounts of Chemical Research*, 2008, **41**, 1630-1640.
76. Z. Medarova, W. Pham, C. Farrar, V. Petkova and A. Moore, *Nat Med*, 2007, **13**, 372-377.
77. N. Kohler, C. Sun, A. Fichtenholtz, J. Gunn, C. Fang and M. Zhang, *Small*, 2006, **2**, 785-792.
78. V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**, 1532-1555.
79. D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit and R. Langer, *Nat Nano*, 2007, **2**, 751-760.
80. M. Liong, J. Lu, M. Kovochich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi and J. I. Zink, *ACS Nano*, 2008, **2**, 889-896.
81. J. Kim, J. E. Lee, S. H. Lee, J. H. Yu, J. H. Lee, T. G. Park and T. Hyeon, *Advanced Materials*, 2008, **20**, 478-483.
82. X. Yang, J. J. Grailer, I. J. Rowland, A. Javadi, S. A. Hurley, V. Z. Matson, D. A. Steeber and S. Gong, *ACS Nano*, 2010, **4**, 6805-6817.
83. R. Guo, L. Zhang, H. Qian, R. Li, X. Jiang and B. Liu, *Langmuir*, 2010, **26**, 5428-5434.
84. J. Luo, K. Xiao, Y. Li, J. S. Lee, L. Shi, Y.-H. Tan, L. Xing, R. Holland Cheng, G.-Y. Liu and K. S. Lam, *Bioconjugate Chemistry*, 2010, **21**, 1216-1224.
85. N. Nasongkla, E. Bey, J. Ren, H. Ai, C. Khemtong, J. S. Guthi, S.-F. Chin, A. D. Sherry, D. A. Boothman and J. Gao, *Nano Letters*, 2006, **6**, 2427-2430.
86. J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces / Jacob N. Israelachvili*, Academic Press, London ; San Diego ;, 1991.
87. J. Lyklema, *Fundamentals of interface and colloïd science*, San Diego, 1991.
88. H. Yotsumoto and R. H. Yoon, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1993, **157**, 434-441.
89. J. F. Joanny, L. Leibler and P. G. De Gennes, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 1979, **17**, 1073-1084.
90. W. Liang, T. F. Tadros and P. F. Luckham, *Langmuir*, 1994, **10**, 441-446.

91. A. K. Kenworthy, K. Hristova, D. Needham and T. J. McIntosh, *Biophysical Journal*, 1995, **68**, 1921-1936.
92. P. G. De Gennes, *Macromolecules*, 1982, **15**, 492-500.
93. Y. Almog and J. Klein, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1985, **106**, 33-44.
94. S. Minko, in *Polymer Surfaces and Interfaces*, ed. M. Stamm, Springer Berlin Heidelberg, 2008, pp. 215-234.
95. P. Kingshott, H. Thissen and H. J. Griesser, *Biomaterials*, 2002, **23**, 2043-2056.
96. J. L. Dalsin, L. Lin, S. Tosatti, J. Vörös, M. Textor and P. B. Messersmith, *Langmuir*, 2004, **21**, 640-646.
97. T. McPherson, A. Kidane, I. Szleifer and K. Park, *Langmuir*, 1998, **14**, 176-186.
98. R. J. Green, M. C. Davies, C. J. Roberts and S. J. B. Tandler, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, **42**, 165-171.
99. K. D. Pavey and C. J. Olliff, *Biomaterials*, 1999, **20**, 885-890.
100. J. P. Bearer, S. Terrettaz, R. Michel, N. Tirelli, H. Vogel, M. Textor and J. A. Hubbell, *Nature Materials*, 2003, **2**, 259-264.
101. G. L. Kenausis, J. Voros, D. L. Elbert, N. Huang, R. Hofer, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, J. A. Hubbell and N. D. Spencer, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 3298-3309.
102. S. Pasche, S. M. De Paul, J. Vörös, N. D. Spencer and M. Textor, *Langmuir*, 2003, **19**, 9216-9225.
103. P. M. Claesson, E. Blomberg, O. Paulson and M. Malmsten, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1996, **112**, 131-139.
104. I. Langmuir, *Journal of the American Chemical Society*, 1916, **38**, 2221-2295.
105. L. Qi, A. Sehgal, J. C. Castaing, J. Fresnais, J. F. Berret and J. P. Chapel, *Redispersible Hybrid Nanopowders: Cerium Oxide Nanoparticle Complexes with Phosphonated-PEG Oligomers*, 2008.
106. G. J. Fler, M. A. Cohen Stuart, J. M. H. M. Scheutjens, T. Cosgrove and B. Vincent, Chapman & Hall Inc, London, 1993.
107. J. Rubio and J. A. Kitchener, *J. Colloid Interface Sci.*, 1976, **57**, 132-142.
108. S. Chibowski, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1990, **134**, 174-180.
109. M. A. C. Stuart, J. M. H. M. Scheutjens and G. J. Fler, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 1980, **18**, 559-573.
110. V. Hlady, J. Lyklema and G. J. Fler, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1982, **87**, 395-406.
111. M. Malmsten and B. Lindman, *Langmuir*, 1990, **6**, 357-364.
112. M. A. Cohen Stuart, G. J. Fler and B. H. Bijsterbosch, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1982, **90**, 310-320.
113. N. G. Hoogeveen, M. A. C. Stuart and G. J. Fler, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996, **182**, 133-145.
114. J. Fresnais, C. Lavelle and J. F. Berret, *Journal of Physical Chemistry C*, 2009, **113**, 16371-16379.
115. P. Chodanowski and S. Stoll, *Journal of Chemical Physics*, 2001, **115**, 4951-4960.
116. C. S. Peyratout and L. Dahne, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2004, **43**, 3762-3783.
117. H. Ai, S. A. Jones and Y. M. Lvov, *Cell Biochem. Biophys.*, 2003, **39**, 23-43.
118. S. A. Sukhishvili, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2005, **10**, 37-44.
119. B. G. De Geest, N. N. Sanders, G. B. Sukhorukov, J. Demeester and S. C. De Smedt, *Chemical Society Reviews*, 2007, **36**, 636-649.
120. W. M. de Vos, A. de Keizer, M. A. C. Stuart and J. M. Kleijn, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010, **358**, 6-12.
121. S. T. Dubas and J. B. Schlenoff, *Macromolecules*, 2001, **34**, 3736-3740.

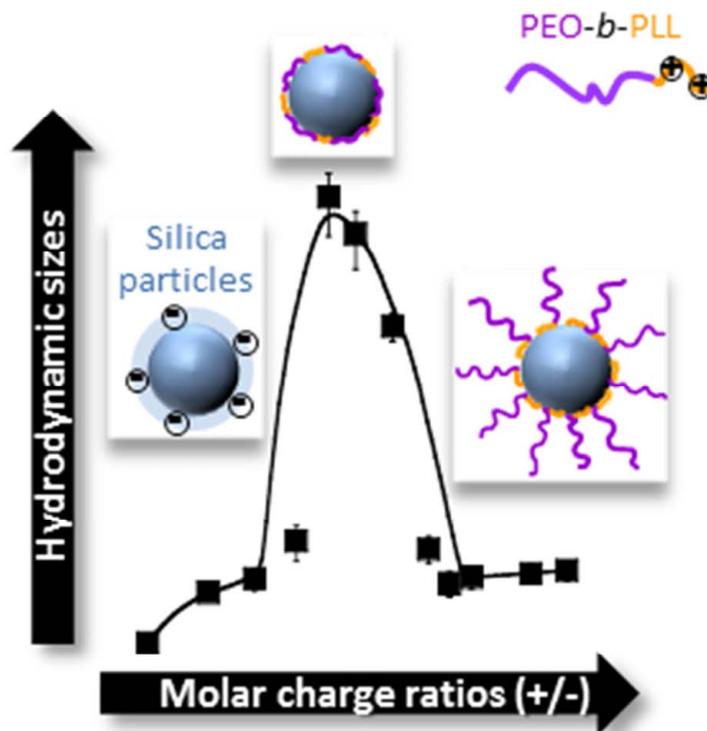
122. C. Amiel, M. Sikka, J. W. Schneider, Y. H. Tsao, M. Tirrell and J. W. Mays, *Macromolecules*, 1995, **28**, 3125-3134.
123. A. Johner and J. F. Joanny, *Macromolecules*, 1990, **23**, 5299-5311.
124. H. D. Bijsterbosch, M. A. C. Stuart and G. J. Fleer, *Macromolecules*, 1998, **31**, 9281-9294.
125. J. C. Meiners, A. QuintelRitzi, J. Mlynek, H. Elbs and G. Krausch, *Macromolecules*, 1997, **30**, 4945-4951.
126. J. P. Spatz, S. Sheiko and M. Moller, *Macromolecules*, 1996, **29**, 3220-3226.
127. J. C. Meiners, H. Elbs, A. Ritzi, J. Mlynek and G. Krausch, *Journal of Applied Physics*, 1996, **80**, 2224-2227.
128. B. Mahltig, J. F. Gohy, R. Jerome, C. Bellmann and M. Stamm, *Colloid and Polymer Science*, 2000, **278**, 502-508.
129. P. G. de Gennes, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1987, **27**, 189-209.
130. S. Alexander, *J. Phys. - Paris*, 1977, **38**, 983-987.
131. S. Alexander, *J. Phys. - Paris*, 1977, **38**, 977-981.
132. P. G. De Gennes, *Macromolecules*, 1980, **13**, 1069-1075.
133. A. Halperin and E. B. Zhulina, *Macromolecules*, 1991, **24**, 5393-5397.
134. M. Daoud and J. P. Cotton, *J. Phys. - Paris*, 1982, **43**, 531-538.
135. R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin and R. Langer, *Science*, 1994, **263**, 1600-1603.
136. M. M. Frank and L. F. Fries, *Immunology Today*, 1991, **12**, 322-326.
137. H. Carstensen, R. H. Muller and B. W. Muller, *Clinical Nutrition*, 1992, **11**, 289-297.
138. R. H. Muller, K. H. Wallis, S. D. Troster and J. Kreuter, *Journal of Controlled Release*, 1992, **20**, 237-246.
139. M. E. Norman, P. Williams and L. Illum, *Biomaterials*, 1992, **13**, 841-849.
140. M. Malmsten, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998, **207**, 186-199.
141. J. M. Harris and R. B. Chess, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, **2**, 214-221.
142. G. Storm, S. O. Belliot, T. Daemen and D. D. Lasic, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1995, **17**, 31-48.
143. P. Kingshott and H. J. Griesser, *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 1999, **4**, 403-412.
144. A. Halperin, *Langmuir*, 1999, **15**, 2525-2533.
145. S. I. Jeon and J. D. Andrade, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1991, **142**, 159-166.
146. S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade and P. G. Degennes, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1991, **142**, 149-158.
147. I. Szleifer, *Biophysical Journal*, 1997, **72**, 595-612.
148. P. Vermette and L. Meagher, *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 2003, **28**, 153-198.
149. F. Fang and I. Szleifer, *Langmuir*, 2002, **18**, 5497-5510.
150. N. L. Abbott, D. Blankschtein and T. A. Hatton, *Macromolecules*, 1992, **25**, 3932-3941.
151. S. R. Sheth and D. Leckband, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, **94**, 8399-8404.
152. S. R. Sheth, N. Efremova and D. E. Leckband, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2000, **104**, 7652-7662.
153. N. V. Efremova, S. R. Sheth and D. E. Leckband, *Langmuir*, 2001, **17**, 7628-7636.
154. A. Halperin and M. Kröger, *Langmuir*, 2009, **25**, 11621-11634.
155. E. P. K. Currie, J. Van der Gucht, O. V. Borisov and M. A. C. Stuart, *Pure Appl. Chem.*, 1999, **71**, 1227-1241.
156. S. Tugulu and H.-A. Klok, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 906-912.
157. L. D. Taylor and L. D. Cerankowski, *Journal of Polymer Science, Part a: Polymer Chemistry*, 1975, **13**, 2551-2570.
158. H. Nuhn and H.-A. Klok, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 2755-2763.
159. H. G. Schild, *Progress in Polymer Science*, 1992, **17**, 163-249.
160. Y. Qiu and K. Park, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **53**, 321-339.

161. P. Alexandridis and T. A. Hatton, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 1995, **96**, 1-46.
162. T. Nishi and T. K. Kwei, *Polymer*, 1975, **16**, 285-290.
163. V. Butun, S. P. Armes and N. C. Billingham, *Polymer*, 2001, **42**, 5993-6008.
164. V. Butun, N. C. Billingham and S. P. Armes, *Journal of the American Chemical Society*, 1998, **120**, 12135-12136.
165. P. Y. Lin, C. Clash, E. M. Pearce, T. K. Kwei and M. A. Aponte, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 1988, **26**, 603-619.
166. D. Christova, R. Velichkova, W. Loos, E. J. Goethals and F. Du Prez, *Polymer*, 2003, **44**, 2255-2261.
167. R. Hoogenboom, H. M. L. Thijs, D. Wouters, S. Hoepfner and U. S. Schubert, *Soft Matter*, 2008, **4**, 103-107.
168. S. Bekiranov, R. Bruinsma and P. Pincus, *Physical Review E: Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 1997, **55**, 577.
169. E. E. Dormidontova, *Macromolecules*, 2002, **35**, 987-1001.
170. *United States Pat.*, 2006.
171. E. E. Dormidontova, *Macromolecules*, 2001, **35**, 987-1001.
172. V. A. Baulin and A. Halperin, *Macromolecules*, 2002, **35**, 6432-6438.
173. T. Drobek, N. D. Spencer and M. Heuberger, *Macromolecules*, 2005, **38**, 5254-5259.
174. G. Karlstroem, *The Journal of Physical Chemistry*, 1985, **89**, 4962-4964.
175. A. S. Hoffman, P. S. Stayton, V. Bulmus, G. Chen, J. Chen, C. Cheung, A. Chilkoti, Z. Ding, L. Dong, R. Fong, C. A. Lackey, C. J. Long, M. Miura, J. E. Morris, N. Murthy, Y. Nabeshima, T. G. Park, O. W. Press, T. Shimoboji, S. Shoemaker, H. J. Yang, N. Monji, R. C. Nowinski, C. A. Cole, J. H. Priest, J. M. Harris, K. Nakamae, T. Nishino and T. Miyata, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, **52**, 577-586.
176. J.-S. Park and K. Kataoka, *Macromolecules*, 2006, **39**, 6622-6630.
177. J.-F. Lutz and A. Hoth, *Macromolecules*, 2005, **39**, 893-896.
178. D. Fournier, R. Hoogenboom, H. M. L. Thijs, R. M. Paulus and U. S. Schubert, *Macromolecules*, 2007, **40**, 915-920.
179. M. S. Jones, *European Polymer Journal*, 1999, **35**, 795-801.
180. M. Kyong Yoo, Y. Kiel Sung, Y. Moo Lee and C. Su Cho, *Polymer*, 1998, **39**, 3703-3708.
181. M. Irie and D. Kunwatchakun, *Macromolecules*, 1986, **19**, 2476-2480.
182. T. Yoshida, M. Doi, S. Kanaoka and S. Aoshima, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 2005, **43**, 5704-5709.
183. S.-i. Yusa, S. Yamago, M. Sugahara, S. Morikawa, T. Yamamoto and Y. Morishima, *Macromolecules*, 2007, **40**, 5907-5915.
184. L. Deng, K. Shi, Y. Zhang, H. Wang, J. Zeng, X. Guo, Z. Du and B. Zhang, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, **323**, 169-175.
185. X. Zhang, J. Li, W. Li and A. Zhang, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 3557-3567.
186. Y. Xia, N. A. D. Burke and H. D. H. Stöver, *Macromolecules*, 2006, **39**, 2275-2283.
187. J. E. Chung, M. Yokoyama, K. Suzuki, T. Aoyagi, Y. Sakurai and T. Okano, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1997, **9**, 37-48.
188. J. E. Chung, M. Yokoyama, T. Aoyagi, Y. Sakurai and T. Okano, *Journal of Controlled Release*, 1998, **53**, 119-130.
189. M. D. C. Topp, P. J. Dijkstra, H. Talsma and J. Feijen, *Macromolecules*, 1997, **30**, 8518-8520.
190. W. Zhang, L. Shi, K. Wu and Y. An, *Macromolecules*, 2005, **38**, 5743-5747.
191. J. Virtanen, S. Holappa, H. Lemmetyinen and H. Tenhu, *Macromolecules*, 2002, **35**, 4763-4769.
192. B. Liu and S. Perrier, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 2005, **43**, 3643-3654.

193. A. J. Convertine, B. S. Lokitz, Y. Vasileva, L. J. Myrick, C. W. Scales, A. B. Lowe and C. L. McCormick, *Macromolecules*, 2006, **39**, 1724-1730.
194. C. Konak, D. Oupicky, V. Chytrý, K. Ulbrich and M. Helmstedt, *Macromolecules*, 2000, **33**, 5318-5320.
195. Y. Li, B. S. Lokitz and C. L. McCormick, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, **45**, 5792-5795.
196. W. Agut, A. Brûlet, D. Taton and S. Lecommandoux, *Langmuir*, 2007, **23**, 11526-11533.
197. C. Chang, H. Wei, C. Y. Quan, Y. Y. Li, J. Liu, Z. C. Wang, S. X. Cheng, X. Z. Zhang and R. X. Zhuo, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 2008, **46**, 3048-3057.
198. H. Wei, X. Z. Zhang, W. Q. Chen, S. X. Cheng and R. X. Zhuo, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, **83A**, 980-989.
199. H. Kitano, H. Kago and K. Matsuura, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, **331**, 343-350.
200. R. Ma, B. Wang, Y. Xu, Y. An, W. Zhang, G. Li and L. Shi, *Macromolecular Rapid Communications*, 2007, **28**, 1062-1069.
201. I. K. Voets, P. M. Moll, A. Aqil, C. Jerome, C. Detrembleur, P. de Waard, A. de Keizer and M. A. C. Stuart, *Journal of Physical Chemistry B*, 2008, **112**, 10833-10840.
202. R. I. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu and H.-A. Klok, *Chemical Reviews*, 2009, **109**, 5437-5527.
203. K. Hosoya, K. Kimata, T. Araki, N. Tanaka and J. M. J. Frechet, *Analytical Chemistry*, 1995, **67**, 1907-1911.
204. Y. Hou, A. R. Matthews, A. M. Smitherman, A. S. Bulick, M. S. Hahn, H. Hou, A. Han and M. A. Grunlan, *Biomaterials*, 2008, **29**, 3175-3184.
205. K. Kato, E. Uchida, E.-T. Kang, Y. Uyama and Y. Ikada, *Progress in Polymer Science*, 2003, **28**, 209-259.
206. T. Okano, A. Kikuchi, Y. Sakurai, Y. Takei and N. Ogata, *Journal of Controlled Release*, 1995, **36**, 125-133.
207. E. Wischerhoff, S. Glatzel, K. Uhlig, A. Lankenau, J.-F. o. Lutz and A. Laschewsky, *Langmuir*, 2009, **25**, 5949-5956.
208. N. Andhariya, B. Chudasama, R. Mehta and R. Upadhyay, *J. Nanopart. Res.*, 2010, 1-12.
209. S. Purushotham, P. E. J. Chang, H. Rumpel, I. H. C. Kee, R. T. H. Ng, P. K. H. Chow, C. K. Tan and R. V. Ramanujan, *Nanotechnol.*, 2009, **20**, 305101.
210. H. Wang, Y. An, N. Huang, R. Ma, J. Li and L. Shi, *Macromol. Rapid Commun.*, 2008, **29**, 1410-1414.
211. H. Kitano, T. Kondo, H. Suzuki and K. Ohno, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, **345**, 325-331.
212. K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa and T. Okano, *Biomaterials*, 2011, **32**, 619-627.
213. N. Shamim, L. Hong, K. Hidajat and M. S. Uddin, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, **304**, 1-8.
214. J. Hu and S. Liu, *Macromolecules*, 2010, **43**, 8315-8330.
215. H. Suzuki, H. M. Nurul, T. Seki, T. Kawamoto, H. Haga, K. Kawabata and Y. Takeoka, *Macromolecules*, 2010, **43**, 9945-9956.
216. X. Laloyaux, B. Mathy, B. Nysten and A. M. Jonas, *Langmuir*, 2009, **26**, 838-847.
217. I. B. Malham and L. Bureau, *Langmuir*, 2009, **26**, 4762-4768.
218. J. Raula, J. Shan, M. Nuopponen, A. Niskanen, H. Jiang, E. I. Kauppinen and H. Tenhu, *Langmuir*, 2003, **19**, 3499-3504.
219. T. Wu, Y. Zhang, X. Wang and S. Liu, *Chemistry of Materials*, 2007, **20**, 101-109.
220. E. B. Zhulina, O. V. Borisov, V. A. Pryamitsyn and T. M. Birshtein, *Macromolecules*, 1991, **24**, 140-149.
221. Q. He, A. Küller, M. Grunze and J. Li, *Langmuir*, 2007, **23**, 3981-3987.

222. H. Yim, M. S. Kent, S. Satija, S. Mendez, S. S. Balamurugan, S. Balamurugan and C. P. Lopez, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 2004, **42**, 3302-3310.
223. H. Yim, M. S. Kent, S. Mendez, G. P. Lopez, S. Satija and Y. Seo, *Macromolecules*, 2006, **39**, 3420-3426.
224. S. Minko, *Polym. Rev. (Philadelphia, PA, U. S.)*, 2006, **46**, 397-420.
225. A. M. Jonas, Z. Hu, K. Glinel and W. T. S. Huck, *Nano Letters*, 2008, **8**, 3819-3824.

Chapitre II. A physico-chemical investigation of poly(ethylene oxyde)-*block*-poly(L-lysine) copolymer adsorption onto silica nanoparticles



Le cœur du système de vectorisation utilisé dans ce projet est constitué d'une particule magnétique enrobée par une couche de silice. Dans ces conditions, il nous a paru opportun d'utiliser des nanoparticules modèles de silice pour étudier les mécanismes d'adsorption des copolymères à blocs de type poly(oxyde d'éthylène)-*block*-poly(L-Lysine) (PEO-*b*-PLL). Sachant que le PEO est connu pour développer une forte affinité avec les groupements silanols à la surface de la silice, le choix de ce copolymère peut paraître quelque peu étonnant dans la mesure où il serait légitime de penser que les chaînes de copolymères s'adsorberont de façon non sélective, le bloc PLL chargé positivement ayant lui-même une très forte affinité avec les fonctions SiO^- à la surface de la silice. Cependant nous allons voir que les mécanismes d'adsorption sont un peu plus complexes et qu'en particulier l'adsorption sélective du bloc PLL peut être obtenue dans des conditions définies de concentration en copolymère. Plus que l'utilisation de méthodes analytiques sophistiquées nous avons privilégié la méthodologie scientifique pour mettre en évidence les différentes étapes de l'adsorption du copolymère à la surface des nanoparticules. Ainsi, l'étude de l'adsorption des homopolymères correspondants nous a permis de comprendre précisément comment le copolymère s'adsorbait. Les isothermes d'adsorption obtenus par une méthode de déplétion consistant à évaluer la quantité de copolymère non adsorbée sur la silice ainsi que la diffusion dynamique de la lumière ont été les deux principales techniques employées. Par ailleurs, la calorimétrie de titration isotherme s'est révélée être une technique relativement bien adaptée à l'étude de phénomènes d'adsorption interfaciaux tel que l'adsorption de polymères sur des colloïdes. Les faibles énergies mises en jeu ont pu être quantifiées et utilisées pour affiner notre modèle d'adsorption du PEO-*b*-PLL sur la silice. Enfin, à l'issue de cette étude nous proposons un protocole type pour adsorber le copolymère sur les nanoparticules dans des conditions garantissant une excellente stabilité colloïdale.

1 Introduction

Poly(ethylene oxide) PEO has become an essential component in the design of various colloidal devices for biomedical applications. PEO prolongs the circulation half-life of therapeutic proteins, liposomes or nanoparticles and reduces their immunogenicity by providing a steric barrier against interactions with plasma proteins, opsonins and cells of the mononuclear phagocyte system.¹⁻³ Strategies to immobilize PEO on colloid surfaces may be classified into covalent and non-covalent approaches. The covalent coupling of PEO on nanoparticles, which basically involves chemical protocols similar to those of proteins Pegylation has been extensively reviewed.⁴⁻⁷ It usually requires a multi-step synthesis with extended reaction time and often leads to relatively low grafting densities because of steric repulsions between PEO polymer chains unless specific conditions are used, as for instance the grafting of PEO chains under cloud point conditions.^{5, 8, 9} An alternative and more versatile approach to obtain surfaces with a high-density PEO brush is the physisorption of PEO containing copolymers. Block or grafted copolymers afford the opportunity to create unique adsorbed layers with a good control over the density and the thickness via the selective adsorption of one block. In this non-covalent approach, the adsorbing block (anchor block) sticks to the surface, while the other is extended into solution (buoy block).¹⁰⁻¹² The surface of colloids such as metal oxides or polymer latexes being often negatively charged in neutral aqueous environment, the adsorption of copolymers containing PEO and polycationic segments represents an interesting route for grafting PEO onto solid surfaces to reduce bio-adhesion. For instance, Textor and Spencer have extensively studied the adsorption of poly(L-lysine)-*graft*-poly(ethylene oxyde) (PLL-*g*-PEO), a copolymer made of PEO chains grafted onto a polycationic PLL backbone, on various metal oxides and the resistance mechanisms to protein adhesion.¹³⁻¹⁶ At neutral pH, the positively charged PLL backbone ($pK_a \sim 10.5$) acts as an anchoring group through electrostatic interactions with the surface while PEO side chains stretch into the solution providing both colloidal stability and protein repellence properties. The density of PEO chains at the particle surface can be controlled by the PEO grafting ratio. High resistance to nonspecific protein adsorption from blood serum and cell adhesion are obtained through a proper choice of this ratio. Additionally, PEO chains can be end-functionalized with various ligands such as peptides or biotin groups affording the possibility to create bioactive surfaces.^{13, 14, 17}

Surprisingly, linear block copolymers of PEO and PLL (PEO-*b*-PLL) which share obvious structural similarities with PLL-*g*-PEO have been less described as surface modifiers. Recently, Park *et al.* have improved the gene transduction efficiency of adenovirus by coating them with PLL-*g*-PEO and PEO-*b*-PLL copolymers.¹⁸ The modification with PEO-*b*-PLL showed superior gene expression over PLL-*g*-PEO, possibly due to the formation of a denser layer of PEO blocks at the virus surface. Actually, most of the research on PEO-*b*-PLL applications is carried out in the field of gene delivery where these block copolymers are used for their ability to form polyion complex micelles (PIC) with nucleic acids such as plasmids DNA^{19, 20} or more recently short interfering RNA molecules.²¹

The present work intends to investigate the adsorption mechanisms of PEO-*b*-PLL copolymers onto silica nanoparticles that are a good example of hydrophilic and negatively charged colloids at neutral pH. An interesting feature of this polymer-colloid system is that both PLL and PEO chains have affinity for silica surface. Indeed, positively charged amine groups of PLL can bind silanolate groups through electrostatic interactions while electron donor groups of PEO segments can interact with silanol groups through hydrogen bonding.²²⁻²⁴ Regarding the quite large field of copolymers at interfaces this situation is rare and to the best of our knowledge Hoogeven et al. were the first to describe the adsorption of a charged block copolymer with two adsorbing blocks.²⁵ Authors studied the adsorption of a diblock copolymer consisting of uncharged water-soluble dihydroxypropyl methacrylate (HMA) and positively charged dimethylaminoethyl methacrylate (AMA) onto titania and silica surfaces. One could expect that the higher affinity of the charged block with the surface would favor a typical anchor-buoy conformation of the copolymer chains but authors rather evidenced the formation of a mixed layer of both blocks. In this layer, the charged block sticks to the surface, whereas the conformation of the neutral block depends on the amount of space left. Hence, for low adsorbed amounts of copolymer, the neutral block adopts a flat conformation, whereas it can form loops and tails at high adsorbed amounts.

Here, the whole study is intentionally restricted to a limited number of experimental parameters in order to get the most accurate picture of the adsorption mechanisms of the PEO-*b*-PLL copolymer onto silica nanoparticles. Hence, a model linear block copolymer, namely PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ with a low polydispersity index ($\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.1$) will be used for adsorption experiments in 100 mM phosphate buffer at pH 7.4. The adsorption of corresponding homopolymer blocks will be also investigated in similar conditions. Using common physico-chemical techniques including adsorption isotherm measurements, dynamic light scattering, microelectrophoresis and isothermal titration calorimetry (ITC), we attempt to answer both questions: how PEO-*b*-PLL copolymers adsorb onto silica particles and how are the particles stabilized?

2 Materials and methods

2.1 Materials

Tetraethoxysilane (TEOS 99%, Aldrich) and ammonium hydroxide (30% in water, Aldrich) were purchased in their reagent grades and used without further purification. Dimethylformamide (DMF) (Scharlau, 99.9%) was dried over CaH₂ and cryodistilled prior to use. Amino-terminated PEO ($\overline{M}_n = 5000$ g/mol, $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1.02$) purchased from Rapp polymer was dissolved in dioxane and lyophilized to remove water traces. ϵ -trifluoroacetyl L-lysine *N*-carboxyanhydride (TFA L-Lys NCA) (Isochem, +96%) and 4-(2-hydroxy-1-naphthylazo)benzenesulfonic acid sodium salt also referred as acid orange II or C.I. acid orange 7 (Aldrich) were used as received.

2.2 Synthesis and characterization of silica nanoparticles

The synthesis of spherical and size-monodisperse silica nanoparticles was performed following an existing method described in the literature.²⁶ Briefly, 250 mL of absolute ethanol and 17.7 mL of ammonium hydroxide were introduced in a 500 mL round flask under stirring at 300 rpm to get a homogeneous mixture. 20 mL of TEOS were rapidly introduced in the medium and the reaction was carried out during 2 hrs in a bath sonicator filled with cold water. 150 mL of mQ water was added to the reaction mixture, then ammonium hydroxide and ethanol were evaporated and the medium dialyzed against water. The final concentration in silica was determined by thermogravimetric analysis. The hydrodynamic diameter of silica particles in phosphate buffer (7.4, 100 mM) was 82 nm with a polydispersity index of 0.04 as measured by dynamic light scattering (Malvern Nanosizer). The zeta potential was $-41 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$ in the same solvent conditions. A surface charge density of -12.7 C/g silica was determined by potentiometric titration according to the procedure described by Sonnerfeld et al.²⁷ (See supporting information)

2.3 Polymer and block copolymer synthesis and characterization

Detailed information about the synthesis of PLL homopolymer and PEO-*b*-PLL copolymer as well as characterization procedures can be found in previous references.^{28, 29} Briefly, PEO-*b*-PLL copolymer was synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of TFA L-Lys NCA initiated by an amino end-functionalized PEO macroinitiator. 1-azido-3-aminopropane compound was synthesized following an already published procedure and used as aminated initiator for the synthesis of poly(TFA L-lysine) homopolymer.^{30, 31} The degree of polymerization (\overline{DP}) of the poly(TFA L-lysine) segment within the block copolymer was determined from the molar ratio of TFA lysine and ethylene oxide units obtained by ¹H NMR analysis (Brücker AC 400 spectrometer) in deuterated DMSO.

For poly(TFA L-lysine) homopolymer, the determination of \overline{DP} by $^1\text{H-NMR}$ was only possible after deprotection of the trifluoroacetyl groups since in DMSO the peaks of the initiator were hidden by those of the polymer. Molecular weight distribution and polydispersity index ($\text{PDI} = M_w/M_n$) were determined by size-exclusion chromatography performed in DMF with LiBr (1 g/L) at 60°C as eluent (0.8 mL/min) using a Waters apparatus (Alliance GPCV2000) equipped with a refractometric detector and two PL gel 5 μm Mixed-C columns calibrated with polystyrene standards. The removal of labile trifluoroacetyl (TFA) protecting groups of L-lysine was achieved by treatment with KOH (1.5 equiv.) in THF at room temperature (RT) during 24 hrs. Once the reaction completed, THF was removed by rotary evaporation and the product precipitated in cold diethyl ether and finally dried overnight under dynamic vacuum (See supporting information). The final structure and composition of both synthesized compounds are depicted in Figure 1. We will consider in the following a PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ (PDI = 1.1) copolymer and a PLL₂₂ (PDI = 1.2) homopolymer. It is worth noting that both these compounds could not directly be solubilized in 100 mM phosphate buffer (PB) at pH 7.4 because of remaining traces of KOH. Therefore, the polymer powder was first dispersed in PB buffer and after overnight stirring the pH was adjusted to 7.4 with a 1 M HCl solution. A potentiometric titration of the copolymer evidenced that the protonation degree of the lysine moieties was close to 100% at pH 7.4. Besides, a \overline{DP} of 9.6 for the lysine block was derived from conductivity measurement, which was in good agreement with NMR analysis (See supporting information).

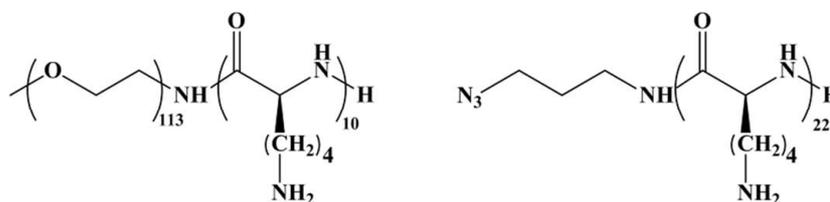


Figure 1. Structure of synthesized PEO-*b*-PLL copolymer and PLL homopolymer

2.4 Complexation profile of PEO-*b*-PLL onto silica nanoparticles

Interactions between silica nanoparticles and PEO-*b*-PLL copolymer were monitored by dynamic light scattering (DLS) using an ALV laser goniometer, which consists of a 35 mW HeNe linear polarized laser with a wavelength of 632.8 nm and an ALV-5000/EPP Multiple Tau Digital correlator with 125 ns initial sampling time. Measurements were carried out at a single angle of 90° at 25°C. 2.5 mL of silica suspension at 21 g/L in 100 mM PB at pH 7.4 were introduced in a 20 mm diameter cylindrical glass cell. Increasing amounts of block copolymer solution in the same buffer were directly added to the silica suspension in the cell. After each addition, the solution was magnetically stirred for 10 min prior to DLS analysis. Data were recorded with the ALV correlator control software, the counting time being set to 60 sec for each sample.

Mean hydrodynamic diameters were determined using the cumulant analysis method.³² In the range of polymer/particle ratios that have been investigated, the maximal volume of PEO-*b*-PLL copolymer solution added to silica nanoparticles was 1.25 mL, which corresponded to a final polymer concentration of 5.4 g/L and a dilution factor of 1.5 for the particle suspension.

2.5 Polymer and copolymer adsorption measurements

The adsorption isotherm of PEO-*b*-PLL copolymer on silica nanoparticles (2.8 g/L) was determined in 100 mM PB buffer (pH 7.4). To 700 μ L of copolymer in PB varying in concentration, 700 μ L of silica suspension at 5.6 g/L were quickly added. After 24 hrs stirring at RT, nanoparticles were centrifuged (11092 g, 30 min, 10°C) and the supernatant containing free (unadsorbed) copolymer was removed and spectrophotometrically analyzed (see below). Competitive adsorption experiments from PEO/PLL mixtures were performed in the same way. Molar compositions of the mixture were chosen to be the same as for block copolymer adsorption experiments, especially by taking into account that PLL homopolymer is twice larger than PLL block in the copolymer. For the displacement adsorption experiment, silica particles were coated at first by PEO. Two equivalent volumes of PEO solution at 3.55 g/L and silica particles at 8.8 g/L were mixed together to get a final concentration of 0.4 g PEO/g particles, which corresponded to the plateau concentration in the PEO adsorption isotherm on silica particles (See supporting information). After overnight stirring, the excess of PEO was removed by extensive dialysis against 100 mM PB pH 7.4 (5 days, MWCO 50,000 g/mol). The particles were diluted by a factor of 1.6 after dialysis. Also, a residual concentration of 0.6 g/L of PEO was determined and was systematically subtracted to the amount of free PEO determined in the following. Two equivalent volumes of PEO coated silica particles and PLL solution varying in concentration were rapidly mixed together. After 24 hrs, nanoparticles were centrifuged (11092 g, 30 min, 10 °C) and the supernatant was analyzed (see below).

Depending on the type of polymers two different protocols were applied to determine the concentration of free polymer from depleted supernatants. In both competition and displacement studies, size-exclusion chromatography was used to measure the concentration of PEO homopolymer by integrating its eluting peak. The polymer separation was performed on two serially connected Aquagel-OH 30 and 40 columns. The detection was operated by a differential refractometer (Optilab rEX, Wyatt). A degassed 100 mM PB buffer pH 7.4 was used as eluent. The flow rate was maintained at 0.8 mL/min, and the amount of sample injected was 100 μ L. A calibration curve was obtained by plotting the area of the PEO eluting peaks vs. the concentration of PEO from 0 to 5 g/L (See supporting information). The titration of PLL homopolymer in competition and displacement adsorption studies as well as PEO-*b*-PLL copolymer was carried out spectrophotometrically using an anionic dye, the 4-(4-hydroxy-1-naphthylazo) benzenesulfonic acid (Acid Orange 7)^{33, 34}. A 10^{-4} M solution of the dye in $1.7 \cdot 10^{-2}$ M acetic acid was prepared.

A calibration curve was established by mixing 200 μL of polymer solution varying in concentration from 0 to 125 mg/L with 1300 μL of dye solution (See supporting information). After 24 hrs of stirring, the absorbance of the solution was measured at $\lambda = 485 \text{ nm}$ using a Spectramax M2^e (Molecular Devices) UV-visible spectrophotometer. The concentration of free PLL or PEO-*b*-PLL in supernatants was obtained with the same protocol using the calibration curve. The quite high concentration in acetic acid in the dye solution ensured a full protonation of lysine residues of PLL and PEO-*b*-PLL in supernatants.

2.6 Electrophoretic mobility measurement

The electrophoretic mobility of bare and PEO-*b*-PLL coated silica nanoparticle suspensions ($[\text{silica}] = 2.8 \text{ g/L}$) was measured as a function of the adsorbed polymer amount using a Malvern ZetaSizer Nano ZS instrument. The electrophoretic mobility (μ) was converted to the zeta potential (ζ) using the Smoluchowski approximation. All the measurements were the average of at least five runs performed at 25 $^{\circ}\text{C}$.

2.7 TEM and SEM analysis

The surface morphology of bare and hybrid nanoparticles were observed using a transmission and a scanning electron microscopes (TEM and SEM). TEM images were obtained with a Hitachi H7650 microscope working at 80 kV equipped with a GATAN Orius 10.5 megapixel camera. For the sample preparation, one droplet of the nanoparticle solution ($[\text{silica}] = 2.8 \text{ g/L}$) was deposited on a copper grid (200 mesh) coated with carbon film. After 1 min, excess liquid was blotted away with a piece of filter paper and grids were air-dried at room temperature. SEM observations were performed with a JEOL JSM-6700F NT scanning electron microscope operating at 5 kV. 25 μL of particle suspension ($[\text{silica}] = 0.28 \text{ g/L}$) were deposited on a sample holder, air-dried for 48 hrs at RT and coated with gold in a cathode evaporator under an argon atmosphere.

2.8 ITC measurements

Microcalorimetric titrations were performed in a NanoITC (TA Instruments). The sample cell (950 μL) was filled with a silica suspension at 4.6 g/L in 100 mM PB buffer at pH 7.4. The syringe was filled with polymer solutions at 1.2 g/L in the same buffer. The first injection was set to a volume of 2 μL followed by 49 injections of 5 μL each at 300-second intervals. The heats of dilution of polymer solutions were determined in blank experiments in which the polymer solutions were injected into the sample cell containing only PB buffer. The dilution heats were then subtracted to obtain the binding heats.

3 Results and discussion

3.1 Adsorption of PEO-*b*-PLL copolymer onto silica particles

Interactions of PEO-*b*-PLL copolymers with the surface of silica nanoparticles were evaluated by means of dynamic light scattering in 100 mM phosphate buffer at pH 7.4. At first sight, one could expect that electrostatic interactions between cationic lysine units and anionic silanolate groups might drive their mutual complexation. Therefore, we plotted a complexation profile representing the variation of the normalized hydrodynamic radius (R_H/R_{H0}) where R_{H0} is the radius of the bare particles ($R_{H0} = 41$ nm) as a function of the molar charge ratio (Z) between cationic and anionic groups (Figure 2). Potentiometric titration allowed to determine the charge surface of silica particles at pH 7.4 whereas a combination of potentiometry and conductivity measurements were used to correctly evaluate the number of protonated amine groups within the copolymer at pH 7.4. Importantly, the complexation was performed in a sequential manner, starting from a single suspension of bare silica particles and adding increasing amounts of copolymer to reach the next charge ratio. This way of proceeding guarantees the consistency of the R_H/R_{H0} variation, especially when colloidal instabilities leading to particles aggregation occur. The complexation profile evidences that particle sizes are increased even at low charge ratio ($Z = 0.01$) meaning that a little amount of added block copolymer strongly interacts with the silica surface modifying the particle colloidal state. Figure 2 also shows a marked particle aggregation starting at low charge ratio ($Z = 0.1$) followed by a redispersion of the particles from $Z = 1$. The fact that the system aggregates far below the theoretical isoelectric point ($Z = 1$) means that non electrostatic interactions have to be accounted for. Presumably, hydrogen bonding between ether groups of PEO and silanol groups at the silica surface may cause the flocculation at an early stage. The redispersion of particles seems to occur with a remarkable ease from $Z = 1$ even if they remain aggregated to some extent when an excess of copolymer is added ($R_H/R_{H0} = 4.8$ at $Z = 1$). This point is discussed later. TEM and SEM analyses performed on samples at various molar charge ratios confirm the different colloidal states observed by DLS (Figure 3 and Figure 4).

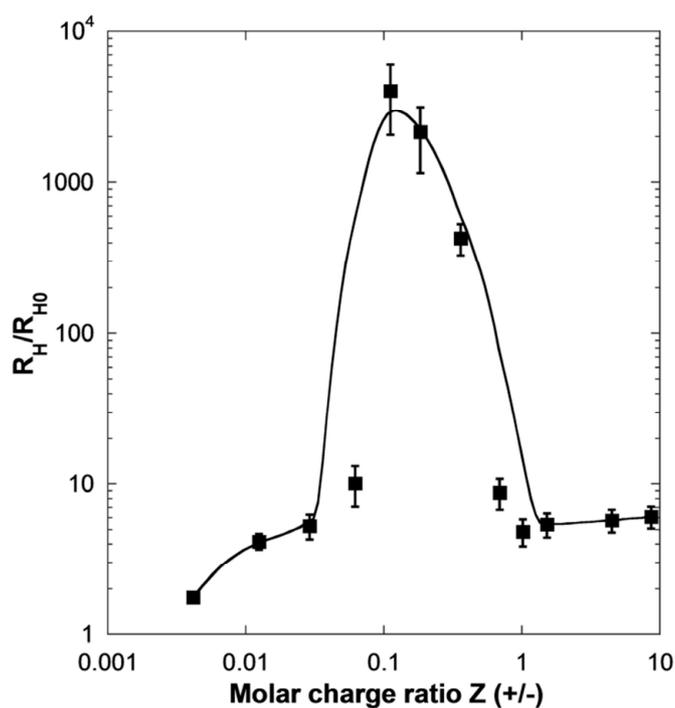


Figure 2. Variation of the normalized hydrodynamic radius of the silica particles as a function of the amount of added PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ copolymer expressed in terms of charge ratio between cationic lysine and anionic silanolate groups. Experimental conditions: [silica]₀ = 21 g/L, 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. The solid line serves to guide the eye only.

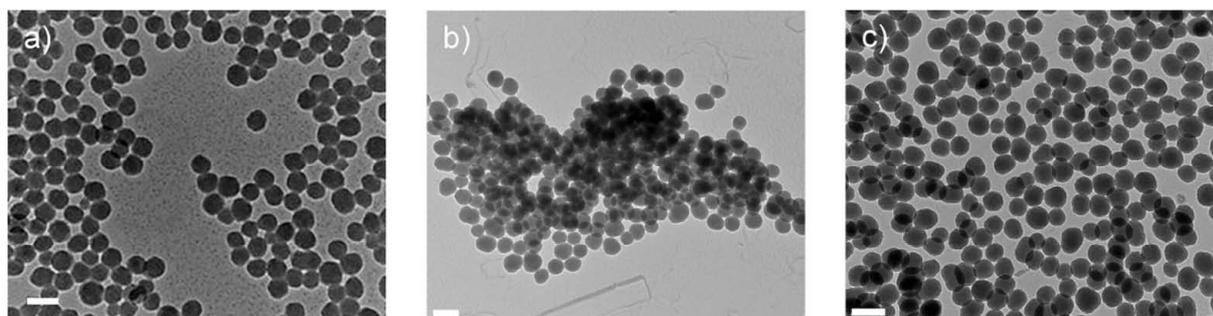


Figure 3. TEM images of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated silica particles at different charge ratios: Z = 0, bare particles (a), Z = 0.1 (b), Z = 7 (c) (scale bar: 100 nm)

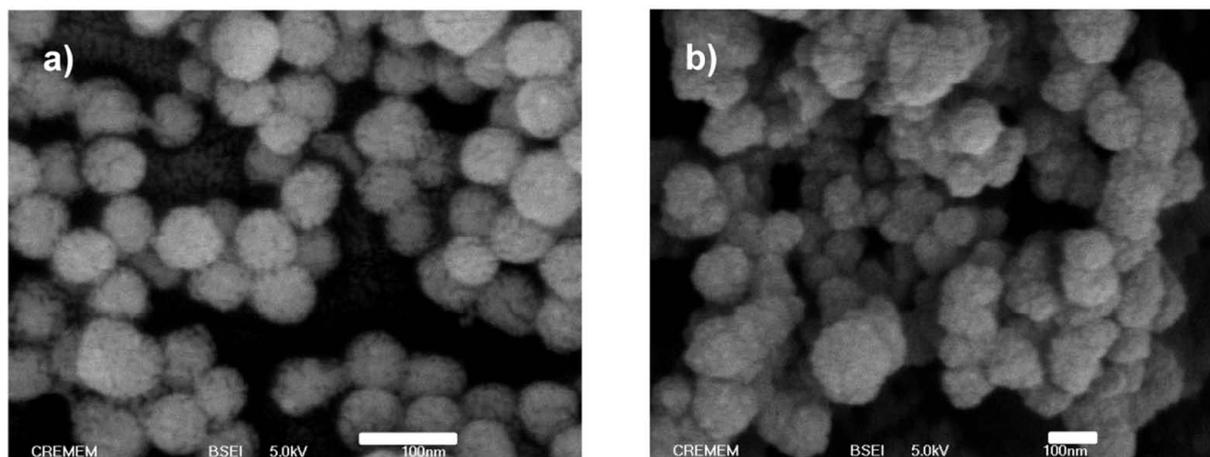


Figure 4. SEM images of bare silica particles (a) and PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated particles at Z = 7 (b) (scale bar: 100nm)

The profile of complexation clearly evidences two Z-value domains where particles are relatively well stabilized separated from a domain where they flocculate. In order to get a better understanding of copolymer interactions with silica surface, the adsorption isotherm of the copolymer as well as the variation of the potential zeta (ζ) of particles were determined (Figure 5). The two values of the molar charge ratio, Z = 0.1 and Z = 1, delimiting the flocculation domain are also reported in Figure 5. The strong decrease of ζ in absolute value at low copolymer concentration originates from ion pairing between SiO⁻ groups and protonated lysine moieties. However, the adsorption of neutral polymers such as PEO onto charged particles is also known to decrease ζ as the result of an outward displacement of the slipping plane.³⁵ Thus, the co-adsorption of both blocks most likely explains why particles are almost uncharged at low charge ratios (Z < 1). Interestingly, whereas the variation of ζ flattens out between Z = 0.1 and Z = 1, the plateau onset on the adsorption isotherm is around Z = 1.5, which means that more copolymer is adsorbed without significantly varying the charge surface of silica particles. Indeed, the amount of adsorbed copolymer in the flocculation domain (0.1 < Z < 1) is quite high, around 50% of the plateau adsorbed mass. Hence, the formation of large aggregates does not impede further adsorption of copolymer, providing the stirring allows the diffusion of the macromolecules to the particle surface.

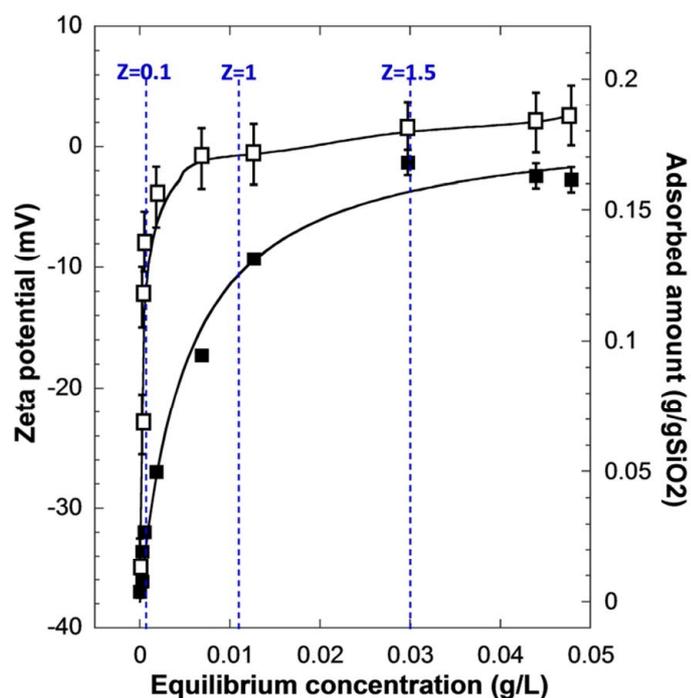


Figure 5. Adsorption isotherm of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ (■) and zeta potential variations of silica nanoparticles (□) as a function of the equilibrium concentration. The onset ($Z = 0.1$) and the end ($Z = 1$) of the flocculation domain are also plotted. Experimental conditions: $[\text{silica}]_0 = 2.8 \text{ g/L}$, 100 mM phosphate buffer, pH 7.4.

From all above experiments, the following mechanism for the adsorption of PEO-*b*-PLL onto silica nanoparticles in phosphate buffer at pH 7.4 may be proposed. At low Z ratios ($Z < 0.1$), where the block copolymer is in default, both blocks adsorbed onto silica surface, the PLL segment by electrostatic interactions with SiO^- groups and the PEO block through hydrogen bonding with SiOH groups.³⁶ Copolymer molecules probably have extended, flat conformation due to polymer-substrate interactions as it has been reported for low molecular weight PLL³⁷ and PEO³⁸. The amount of adsorbed copolymer at $Z = 0.1$ was quite low, about 25% of the plateau concentration in the isotherm, but the zeta potential almost already reached its minimal absolute value. Therefore, this is in agreement with the flat conformation of the adsorbed copolymer molecules as it allows the full coverage of the particle surface with a minimum amount of copolymer. However, this thin layer of copolymer did not prevent the flocculation of particles since neither electrostatic nor steric repulsion forces could stabilize them. As a consequence the system experienced a marked colloidal destabilization with the formation of large particle aggregates (Figure 3.b). When more copolymer was added the flocs start to redisperse, traducing that the conformation of the copolymer at the interface had changed. At this stage where less than 50% of the total mass of copolymer was adsorbed, two possibilities or a combination of them could explain this redispersion. At first, incoming copolymer molecules might adsorb only through their lysine blocks and keep their PEO segments free in solution to provide steric stability.

This behavior which assumes a preferential interaction of lysine blocks with silica surface over PEO ones would be also in agreement with the reduced space left at the particle surface. Secondly, new copolymer molecules might also displace already adsorbed PEO segments to some extent. This second hypothesis would suggest that all adsorbed copolymer molecules adopt an anchor-buoy conformation with PLL blocks sticking to the surface and free PEO chains protruding into bulk solution. These two possibilities were independently studied through competitive and displacement adsorption experiments with homopolymers. (See next section).

Despite the strong disaggregation occurring between $Z=0.1$ and $Z=1$, the final colloidal state deduced from the profile of complexation remains slightly aggregated ($R_H/R_{H0}=6$ at $Z=10$). The main reason of this remanent aggregation has to be correlated to the protocol of particle coating. Actually, the slow and sequential addition of copolymer onto particles forces the system to pass through the isoelectric point (IEP) associated with the flocculation of the particles. Therefore and probably for kinetic reasons, this aggregation state is not fully reversible in a reasonable time even in the presence of an excess of copolymer. This hypothesis was verified by comparing the two possible orders of addition of components. Hydrodynamic sizes and polydispersity indexes of copolymer coated particles were determined for various Z ratios ($Z > 1$) either by slowly adding the copolymer to the particles (addition order 1, as for the profile of complexation) or the opposite (addition order 2) (Table 1). The particles were stable whatever the order of addition but a significant difference in the degree of aggregation was observed. The addition of copolymer to particles systematically led to higher sizes and polydispersity indexes since the system experienced a flocculation state before its redispersion. Conversely, when particles were added to an excess of copolymer the IEP was quickly bypassed and the particles were almost not aggregated. It is also believed that this order of addition should allow the preferential adsorption of PLL blocks over PEO blocks, hence favoring the anchor-buoy copolymer conformation at the particle surface.

Table 1. Hydrodynamic diameters and polydispersity indexes (PDI) of silica particles coated with PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ at different molar charge ratios ($Z = +/-$). The copolymer was added to the particles solution (addition order 1) or the particles were added to the copolymer in excess (addition order 2). Experimental conditions: $[silica]_0 = 2.8$ g/L, 100 mM phosphate buffer, pH 7.4.

		D_H (nm)	PDI
Bare silica particles		82	0.04
$Z \approx 4$	Addition order 1	179	0.19
	Addition order 2	130	0.13
PEO-<i>b</i>-PLL coated silica particles	$Z \approx 6$ Addition order 1	158	0.18
	Addition order 2	122	0.12
$Z \approx 10$	Addition order 1	148	0.17
	Addition order 2	120	0.13

3.2 Adsorption of homo-PEO and homo-PLL onto silica particles: competitive and displacement experiments

Competitive and displacement adsorption experiments performed with PEO₁₁₃ and PLL₂₂ homopolymers may provide additional information on the copolymer adsorption mechanism, especially in the flocculation domain where the conformation of adsorbed copolymer is supposed to evolve. Such experiments are well documented in the literature, but mostly deal with the adsorption of different molecular weight fractions of a same polymer. It was established that high molecular weight polymers adsorb preferentially and can displace lower ones initially adsorbed.³⁹⁻⁴² For polyelectrolytes, a high ionic strength is required to promote the exchange of small molecules by larger ones while at low ionic strength the exchange rate is low and the adsorbed layer is mostly composed of small molecules.⁴³⁻⁴⁷ Only a few studies deal with competitive and/or displacement experiments with chemically different polymers such as two neutral homopolymers^{38, 48}, two polyelectrolytes⁴⁷ or a neutral polymer and a polyelectrolyte.⁴⁹⁻⁵¹ The number and strength of segment-surface contacts per chains as well as the charge density and the ionic strength in case of polyelectrolytes are the main parameters determining the exchangeability in the adsorption layer.⁵¹

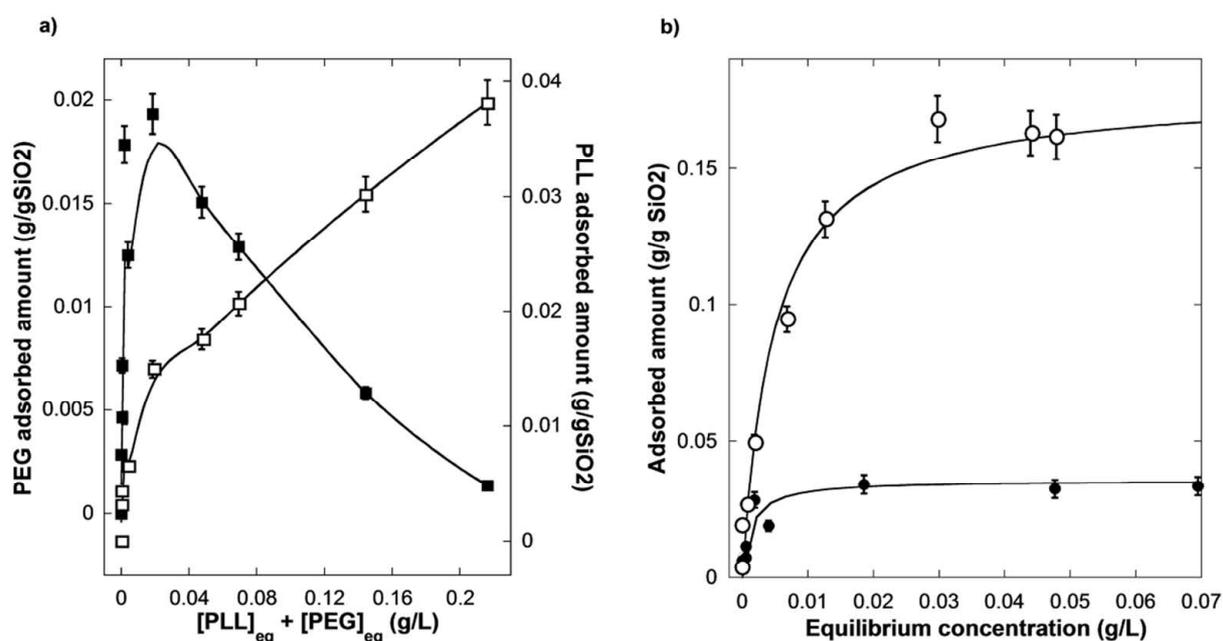


Figure 6. (a) Competitive adsorption of PEO₁₁₃ (■) and PLL₂₂ (□) homopolymers from a PEO₁₁₃:PLL₂₂ mixture (1:1 molar ratio). (b) Adsorption isotherms of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ copolymer (○) and an equimolar mixture of homopolymers (●). Experimental conditions: [silica]₀ = 2.8 g/L, 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. The solid lines serve to guide the eye only.

Competitive adsorption experiments were carried out by adsorbing increasing concentrations of a mixture of PEO and PLL homopolymers in the same molar ratio as in the copolymer, namely a 1:1 molar composition (Figure 6.a).

Each point corresponds to an independent experiment performed in same conditions as for the adsorption isotherm of the copolymer. This allows us to mimic to some extent the copolymer adsorption from the behavior of a homopolymer mixture. Figure 6.a shows that both PEO and PLL chains adsorbed with a high affinity at low concentrations of the mixture ($C_{\text{mix, eq}} < 0.005$ g/L), the highest amount of adsorbed PEO being simply related to the initial composition of the homopolymer mixture. In this range of concentrations, particles already flocculated (results not shown), which indicates that both polymers probably adsorbed in a flat conformation without any capacity of colloidal stabilization through overcharging or steric effects as mentioned before.⁵² At higher concentrations ($C_{\text{mix, eq}} > 0.005$ g/L), PLL was preferentially adsorbed and almost no adsorption of PEO occurred at $C_{\text{mix, eq}} = 0.22$ g/L, which denotes a higher affinity of PLL blocks for the silica surface. Interestingly, the amount of adsorbed PEO steadily decreased while the amount of adsorbed PLL increased. Therefore, in addition to SiO^- groups, PLL can bind to the same adsorbing sites of PEO (silanol groups) with a higher interaction strength. Hydrogen bonding between carbonyl functions located on the polypeptide backbone and silanols is most likely at the origin of this strong binding. For instance, it has been reported that PLL adsorbs on silica at pH 4 where the dissociation of the silanol groups is negligible, provided the ionic strength of the medium is not too low (> 10 mM).^{53, 54}

Extrapolating the above results to the copolymer adsorption, this competitive experiment confirms that both blocks stick to the surface at low copolymer concentration ($C_{\text{copo, eq}} < 0.005$ g/L) leading to the flocculation of particles (Figure 2 and Figure 6). At higher concentrations the preferential adsorption of PLL over PEO indicates that the block copolymer must progressively adsorb through its lysine block, which is in line with the first hypothesis previously stated. This also demonstrates that the copolymer must adopt an anchor-buoy conformation when particles are added to an excess of copolymer solution (Table 1, addition order 2). A quite high concentration of copolymer should be required ($C_{\text{copo, eq}} = 0.22$ g/L which is equivalent to $Z = 2.9$) to fully cover the particles solely with PLL blocks. Another way to analyze the results from the competitive experiment is to compare adsorption isotherms of block copolymer and mixture of homopolymers (Figure 6.b). At low concentrations, both isotherms overlap confirming that both blocks of the copolymer are adsorbed in a flat conformation like homopolymers. By increasing the surface coverage, the amount of adsorbed copolymer gets higher than this of the homopolymer, which demonstrates that the copolymer chains become adsorbed through their lysine blocks, PEO blocks being less and less adsorbed. Considering that PLL blocks are completely stuck to the silica surface at the isotherm plateau, one calculates that $3.0 \cdot 10^{-4}$ and $2.6 \cdot 10^{-4}$ mole of lysine residues ($M=128$ g/mol) is adsorbed per gram of particles for PLL and block copolymer, respectively. This is a strong indication that both lysine blocks indeed adopt a similar flat conformation. The slight difference might be due to the steric hindrance caused by non adsorbing PEO blocks of the copolymer that limit the accessibility of incoming lysine blocks to the surface.

The competitive experiment evidenced the preferential adsorption of PLL blocks over PEO ones, but did not demonstrate the occurrence of PEO desorption (hypothesis 2). In order to test this hypothesis, increasing concentrations of PLL were added on silica particles precoated with PEO.

The amounts of adsorbed PLL and desorbed PEO were independently determined (see materials and methods section). Figure 7 unambiguously shows the exchangeability between adsorbed PEO chains and added PLL molecules. All PEO chains are desorbed from the surface at $C_{\text{PLL, eq}} = 0.055 \text{ g/L}$. This confirms the much higher interaction strength of PLL over PEO and also suggests that a similar behavior should occur with the block copolymer. For the overall displacement adsorption, one calculates that ~ 4 PLL chains adsorb for one PEO chain that desorbs. This supports the hypothesis that PLL chains not only adsorb through electrostatic interactions with SiO^- groups but also by hydrogen bonds with silanol groups initially bound to PEO residues.

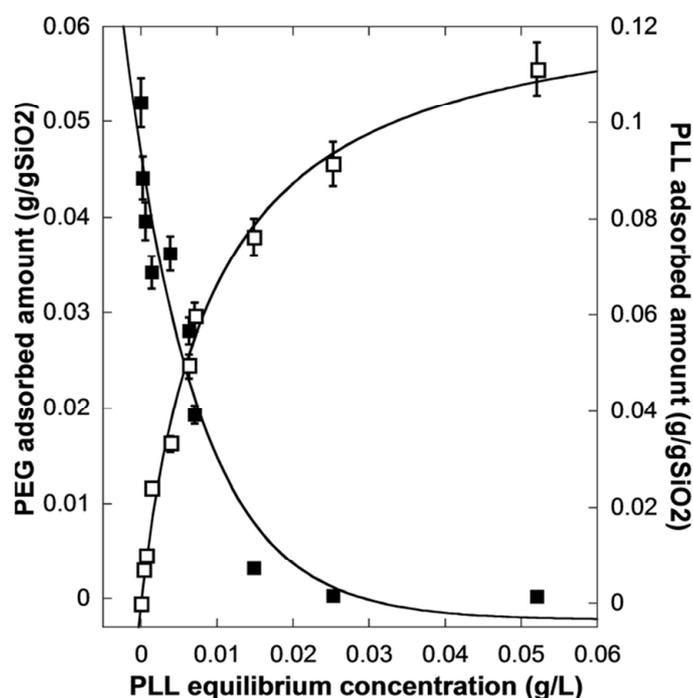


Figure 7. Displacement adsorption behavior of PEO₁₁₃ by addition of PLL₂₂ on PEO₁₁₃ precoated silica particles. Residual concentrations of PEO at silica surface (■) and adsorbed concentrations of PLL (□) are determined at different concentrations of PLL. Experimental conditions: [silica]₀ = 1.73 g/L, 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. The solid lines serve to guide the eye only.

3.3 Microcalorimetry study

Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to quantify adsorption energies of PEO, PLL and PEO-*b*-PLL with silica particles (Figure 8). All experiments were performed by slowly adding polymer solutions to the silica suspension in the sample cell.

Therefore, this reproduced the conditions previously used for the complexation profile. ITC is an effective technique to determine relevant thermodynamic parameters (ΔH , ΔS , ΔG , K_B) from the adsorbed or released heat due to interactions between components. The determination of the thermodynamic parameters by a fitting procedure requires to know the number of binding sites on both the polymer and at the particle surface.

As multiple interactions may occur between polymer chains and colloid surface, this number is not easy to evaluate. The situation is even complicated by charge regulation effects causing a modification of the surface charge upon adsorption of polyelectrolytes.⁵⁵ In a recent work on polymer adsorption onto silica particles, Chiad *et al.* simply considered the molar ratio between polymer and SiO₂.⁵⁶ Beyond the difficulty to correctly evaluate the number of active sites, the flocculation of the particles when the polymer or block copolymer was slowly added to the particle suspension was a major concern. For all previous experiments the stirring speed was fast enough to maintain the flocs in a dispersed state and therefore the accessibility of the polymer chains to the surface was not really affected. The situation is rather different in the ITC instrument since the stirring speed was low and the size of the stirrer quite small. We simulated the PEO adsorption onto silica particles in a transparent 2mL microtube using the same tiny paddle stirrer and stirring speed as in the ITC instrument (Figure 9). We clearly noticed that particles quickly flocculated upon addition of PEO evidencing that stirring conditions were not strong enough to maintain the flocs in suspension and to allow the diffusion of polymer chains to the interface. As a consequence ITC thermograms reached a plateau for PEO and PEO-*b*-PLL concentrations far below to those found at the plateau on adsorption isotherms (Table 2). Surprisingly, a good agreement between both types of measurement was found for PLL. Actually, a close observation of the suspension of PLL coated particles revealed that flocs are less dense than for PEO coated particles and therefore stirring conditions in the ITC instrument were probably sufficient to disperse them.

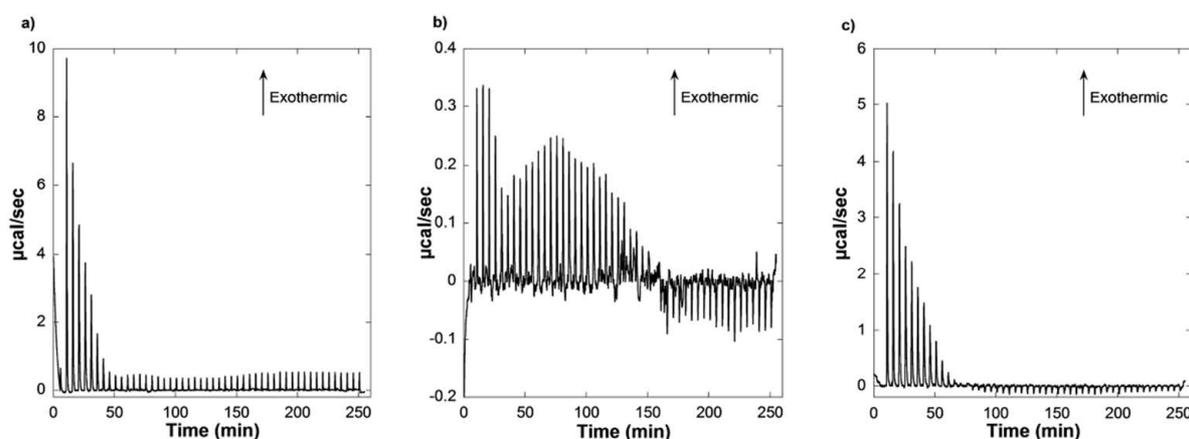


Figure 8. ITC thermograms of polymer adsorption on silica nanoparticles : PEO₁₁₃ (a), PK₂₂ (b), PEO₁₁₃-*b*-PK₁₀ (c). Experimental conditions: [silica]_{cell} = 4.6 g/L, [polymer]_{syringe}=1.2 g/L, 100 mM phosphate buffer, pH 7.4.

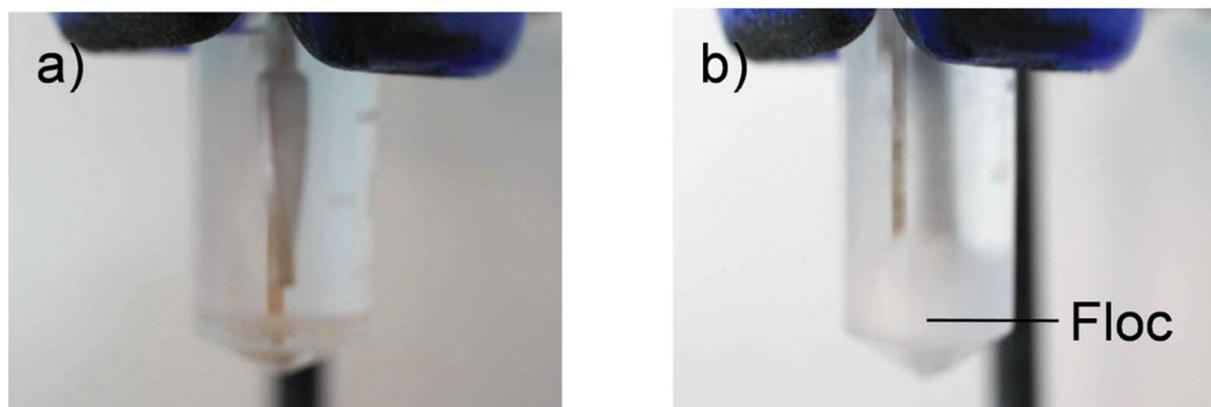


Figure 9. PEO adsorption onto silica particles using same sample volume and stirring conditions as in the ITC instrument. Snapshots were taken before (a) and immediately after (b) addition of 100 μL of 1.2 g/L PEO solution onto silica suspension (4.6 g/L).

Table 2. Polymer concentrations at the plateau onset in ITC and adsorption isotherm experiments.

	Polymer concentrations ^a (g polymer /g particles)	
	ITC	Adsorption isotherms
PEO	0.016	0.96
PLL	0.042	0.053
PEO-<i>b</i>-PLL	0.018	0.178

^a the values refer to initial (added) polymer concentrations and not to equilibrium concentrations

In these conditions, ITC measurements were exploited by considering the heat released at the early stage of the adsorption process when it may be assumed that all polymer or copolymer chains were adsorbed at silica surface as indicated by the high affinity adsorption isotherms found for PEO, PLL and PEO-*b*-PLL (Figure 5 and Figure 6.a). Therefore, the change in enthalpy upon adsorption of polymers onto silica surface was derived from the integration of the second peak on thermograms (Figure 8), the intensity of the first peak being insignificant due to the long delay prior to equilibration and the ensuing diffusion from the top of the syringe to the cell. For PEO₁₁₃ the enthalpy of adsorption per residue is negative as expected for a mechanism driven by hydrogen bonding (Table 3). However, the enthalpy, in absolute value, is rather low compared to the typical energy of a hydrogen bond (10-50 kJ/mol) indicating that only a fraction of ethylene oxide residues (5-25%) bind to silanol groups. This result can be explained by considering that the full adsorption of PEO chains would considerably reduced their configurational (translational) entropy. Hence, even lower adsorption enthalpies should be measured with PEO of lower molecular weights as the loss in configurational entropy is supposed to increase when polymer chains get shorter.⁵⁷ As a matter of fact adsorption enthalpies of 1.8 and 0.1 kJ/mol per ethylene oxide residues were determined in similar conditions with PEO of 2000 and 300 g/mol, respectively (data not shown).

For PLL₂₂, the very low enthalpy of adsorption per lysine residues was unexpected with regard to displacement and competitive adsorption experiments that have shown the preferential adsorption of PLL over PEO. Therefore, this supports the occurrence of substantial entropic effects related to the release of counterions or water molecules upon interaction of PLL chains with silica surface. In terms of electrostatic interactions the adsorption of polyelectrolyte chains onto oppositely charged surface is similar to the complexation of oppositely charged polyelectrolytes. In the latter case, it is known that the increase in entropy largely drives the complexation for highly charged polyelectrolytes.⁵⁸ Recently, in a study on the thermodynamics of plasmid DNA condensation by PEO-*b*-PLL copolymers, Kim *et al.* reported positive enthalpies of complexation (+ 0.08 kJ/mol lysine for PEO₂₇₃-*b*-PLL₂₀ in 100 mM NaCl), the condensation being driven by large negative values of TΔS.²⁰ Here, the slight exothermicity measured upon PLL adsorption on silica particles may reflect the contribution of hydrogen bonds in addition to electrostatic interactions. Figure 8 also shows two distinct regimes of PLL adsorption which may correspond to two different polymer layers: a first one where PLL chains are tightly bound to the surface through ions pairing and a second one where PLL has the possibility to form some loops and tails.⁵⁹ Considering that block copolymers adsorb in a similar fashion as homopolymers, which is expected at the very beginning of the particle titration, the theoretical value of the adsorption should be -2.3 kJ/mol. The lower actual value (-1.5 kJ/mol) suggests that lysine blocks hinder the full adsorption of PEO blocks to some extent. (Table 3).

Table 3. Enthalpy of polymer adsorption derived from the heat released at the second injection in ITC measurements (Values derived from literature are mentioned in brackets).

Polymer	ΔH _{adsorption} (kJ/mol monomer)
PEO ₁₁₃	-2.5 (-3 ⁶⁰ and -2.5 ⁶¹)
PLL ₂₂	-0.2 (-1 ⁶²)
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀	-1.5

Displacement adsorption experiments with PEO and PLL homopolymers were also conducted on ITC in a similar manner as described previously (Figure 10). In a first step, silica particles were coated by PLL or PEO by adding the right amount of homopolymer to get the plateau concentration on adsorption isotherms. In a second step, PEO or PLL polymer, respectively, was slowly added to the particle suspension. Interactions of PEO with PLL coated particles were almost negligible since only a single peak of low intensity was detected at the first injection (Figure 10). Conversely, Figure 10.b shows that interactions of PLL chains with PEO coated particles were endothermic (ΔH = 0.7 kJ per mole of PLL residues), which is in line with an entropy driven desorption of PEO chains. This indicates that added PLL could indeed displace adsorbed PEO chains despite the initial aggregated state of the particles, hence confirming the high affinity of PLL with silica surface.

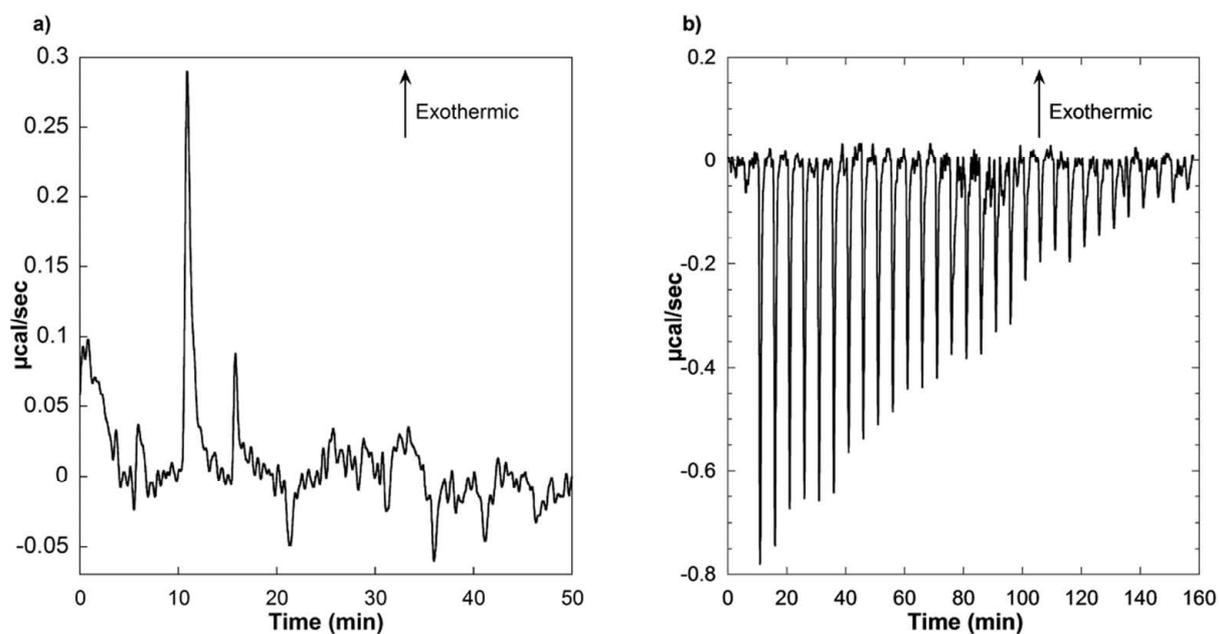


Figure 10. Displacement adsorption experiments followed by ITC. Titration of PLL coated silica particles by PEO (a). Titration of PEO coated particles by PLL (b). Experimental conditions: $[\text{silica}]_{\text{cell}} = 4.6 \text{ g/L}$, $[\text{polymer}]_{\text{syringe}} = 1.2 \text{ g/L}$, 100 mM phosphate buffer, pH 7.4.

4 Conclusion

The adsorption behavior of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ copolymer at the surface of silica nanoparticles has been investigated from the adsorption behavior of PEO₁₁₃ and PLL₂₂. Both homopolymers easily adsorb onto silica, PEO through hydrogen bonding with silanol groups and PLL through a combination of electrostatic interactions as well as hydrogen bonds involving carbonyl groups in the polypeptide backbone. However, competitive and displacement adsorption experiments clearly support the preferential adsorption of PLL despite its much lower degree of polymerization compared to PEO. It is proposed that entropic effects related to the release of counterions upon complexation of PLL with SiO⁻ groups favour its adsorption. PEO and PLL probably adsorb in a relatively flat conformation owing to their relatively low molecular weight and strong interactions with silica. As a consequence, PLL and PEO coated particles are unstable from a colloidal viewpoint and a marked flocculation was noticed in each case. Thanks to these data, the behavior of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated particles may be better understood. The striking point is the order of addition of the components. When particles are added in an excess of copolymer, a rapid saturation of the surface by PLL blocks may favour a typical anchor-buoy (PLL-PEO) conformation of the copolymer at the interface and therefore an improved colloidal stability through steric forces. When the block copolymer solution is gradually added to the particle suspension, both blocks have the possibility to adsorb in flat conformation in a similar fashion to homopolymers. As the formation of a thin layer of copolymer at the particle surface does not prevent the flocculation, the particles are rapidly destabilized. The return to a colloidal state can be achieved by adding an excess of copolymer since lysine blocks progressively desorb PEO blocks. However, the system remains aggregated to some extent, which evidences that the flocculation is not completely reversible in these conditions. True equilibrium conformations as those probably obtained by adding the particles to the copolymer might only be achieved in presence of a very large excess of copolymer.⁶¹ Hence, the first way to proceed is definitively the best one with regard to the colloidal behavior of the copolymer coated particles and their use for various applications.

5 References

1. G. Storm, S. O. Belliot, T. Daemen and D. D. Lasic, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1995, **17**, 31-48.
2. U. Wattendorf and H. P. Merkle, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 4655-4669.
3. K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer and U. Schubert, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6288-6308.
4. D. Bhadra, S. Bhadra, P. Jain and N. K. Jain, *Pharmazie*, 2002, **57**, 5-29.
5. C. Delgado, G. E. Francis and D. Fisher, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, 1992, **9**, 249-304.
6. M. Hamidi, A. Azadi and P. Rafiei, *Drug Delivery*, 2006, **13**, 399 - 409.
7. J. M. Harris and R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2003, **2**, 214-221.
8. P. Kingshott, H. Thissen and H. J. Griesser, *Biomaterials*, 2002, **23**, 2043-2056.
9. J. L. Dalsin, L. Lin, S. Tosatti, J. Vörös, M. Textor and P. B. Messersmith, *Langmuir*, 2004, **21**, 640-646.
10. G. Hadziioannou, S. Patel, S. Granick and M. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 2869-2876.
11. H. J. Taunton, C. Toprakcioglu and J. Klein, *Macromolecules*, 1988, **21**, 3333-3336.
12. M. Tirrell, S. Patel and G. Hadziioannou, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 4725-4728.
13. N.-P. Huang, J. Vörös, S. M. De Paul, M. Textor and N. D. Spencer, *Langmuir*, 2001, **18**, 220-230.
14. S. Tosatti, S. M. D. Paul, A. Askendal, S. VandeVondele, J. A. Hubbell, P. Tengvall and M. Textor, *Biomaterials*, 2003, **24**, 4949-4958.
15. S. Pasche, J. Vörös, H. J. Griesser, N. D. Spencer and M. Textor, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 17545-17552.
16. G. L. Kenausis, J. Voros, D. L. Elbert, N. Huang, R. Hofer, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, J. A. Hubbell and N. D. Spencer, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 3298-3309.
17. S. VandeVondele, J. Vörös and J. A. Hubbell, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **82**, 784-790.
18. J. W. Park, H. Mok and T. G. Park, *J. Controlled Release*, 2010, **142**, 238-244.
19. K. Itaka, K. Yamauchi, A. Harada, K. Nakamura, H. Kawaguchi and K. Kataoka, *Biomaterials*, 2003, **24**, 4495-4506.
20. W. Kim, Y. Yamasaki, W.-D. Jang and K. Kataoka, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 1180-1186.
21. J. DeRouchey, C. Schmidt, G. F. Walker, C. Koch, C. Plank, E. Wagner and J. O. Rädler, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 724-732.
22. B. Wind and E. Killmann, *Colloid Polym. Sci.*, 1998, **276**, 903-912.
23. Z. Fu and M. M. Santore, *Langmuir*, 1997, **13**, 5779-5781.
24. Z. Fu and M. M. Santore, *Colloids Surf., A*, 1998, **135**, 63-75.
25. N. G. Hoogeveen, M. A. C. Stuart and G. J. Fleer, *Faraday Discuss.*, 1994, **98**, 161-172.
26. C. A. R. Costa, C. A. P. Leite and F. Galembeck, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 4747-4755.
27. J. Sonnefeld, A. Göbel and W. Vogelsberger, *Colloid Polym. Sci.*, 1995, **273**, 926-931.
28. W. Agut, A. Brulet, D. Taton and S. Lecommandoux, *Langmuir*, 2007, **23**, 11526-11533.
29. J. Rodriguez-Hernandez, M. Gatti and H.-A. Klok, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 249-258.
30. B. Carboni, A. Benalil and M. Vaultier, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 3736-3741.
31. W. Agut, R. Agnaou, S. Lecommandoux and D. Taton, *Macromol. Rapid Commun.*, 2008, **29**, 1147-1155.
32. D. E. Koppel, *J. Chem. Phys.*, 1972, **57**, 4814-4820.
33. B. D. Gummow and G. A. F. Roberts, *Makromol. Chem.*, 1985, **186**, 1239-1244.
34. G. G. Maghami and G. A. F. Roberts, *Makromol. Chem.*, 1988, **189**, 2239-2243.
35. L. K. Koopal, V. Hlady and J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.*, 1988, **121**, 49-62.
36. S. Mathur and B. M. Moudgil, *J. Colloid Interface Sci.*, 1997, **196**, 92-98.
37. H. M. Eckenrode and H. L. Dai, *Langmuir*, 2004, **20**, 9202-9209.
38. M. Kawaguchi, A. Sakai and A. Takahashi, *Macromolecules*, 1986, **19**, 2952-2955.

39. G. J. Howard and S. J. Woods, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 1972, **10**, 1023-1028.
40. C. V. Linden and R. V. Leemput, *J. Colloid Interface Sci.*, 1978, **67**, 63-69.
41. K. Furusawa, K. Yamashita and K. Konno, *J. Colloid Interface Sci.*, 1982, **86**, 35-42.
42. M. A. Cohen Stuart, G. J. Fleer and B. H. Bijsterbosch, *J. Colloid Interface Sci.*, 1982, **90**, 310-320.
43. A. W. M. de Laat and G. L. T. van den Heuvel, *Colloids Surf., A*, 1995, **98**, 53-59.
44. A. W. M. de Laat, G. L. T. van den Heuvel and M. R. Böhmer, *Colloids Surf., A*, 1995, **98**, 61-71.
45. D. R. Bain, M. C. Cafe, I. D. Robb and P. A. Williams, *J. Colloid Interface Sci.*, 1982, **88**, 467-470.
46. R. Ramachandran and P. Somasundaran, *J. Colloid Interface Sci.*, 1987, **120**, 184-188.
47. U. S. Adam and I. D. Robb, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1983, **79**, 2745-2753.
48. G. P. Van der Beek, M. A. C. Stuart and T. Cosgrove, *Langmuir*, 1991, **7**, 327-334.
49. A. W. M. de Laat and G. L. T. van den Heuvel, *Colloids Surf., A*, 1993, **70**, 179-187.
50. M. Kawaguchi, H. Kawaguchi and A. Takahashi, *J. Colloid Interface Sci.*, 1988, **124**, 57-62.
51. N. G. Hoogeveen, M. A. C. Stuart and G. J. Fleer, *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, **182**, 146-157.
52. M. A. Cohen Stuart, T. Cosgrove and B. Vincent, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1985, **24**, 143-239.
53. B. C. Bonekamp and J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.*, 1986, **113**, 67-75.
54. M. Jiang, I. Popa, P. Maroni and M. Borkovec, *Colloids Surf., A*, 2010, **360**, 20-25.
55. J. K. Wolterink, L. K. Koopal, M. A. C. Stuart and W. H. Van Riemsdijk, *Colloids Surf., A*, 2006, **291**, 13-23.
56. K. Chiad, S. H. Stelzig, R. Gropeanu, T. Weil, M. Klapper and K. Müllen, *Macromolecules*, 2009, **42**, 7545-7552.
57. Z. Fu and M. M. Santore, *Langmuir*, 1998, **14**, 4300-4307.
58. Z. Ou and M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.*, 2006, **124**, 154902-154911.
59. B. C. Bonekamp, *Colloids Surf.*, 1989, **41**, 267-286.
60. P. Trens and R. Denoyel, *Langmuir*, 1993, **9**, 519-522.
61. F. Lafuma, K. Wong and B. Cabane, *J. Colloid Interface Sci.*, 1991, **143**, 9-21.
62. J. K. West, R. Latour and L. L. Hench, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 1997, **37**, 585-591.

6 Annexes

6.1 Chemical characterization of the block-copolymer PEO₁₁₃-*b*-PLL_n and homopolymer PLL_m

6.1.1 NMR analysis of PEO-*b*-PLL and PLL (protected and unprotected) polymers

¹H and ¹³C NMR spectra of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and PLL₂₂ with protected and unprotected lysine segments are shown in Figure S1, Figure S2, and Figure S3. Protons of the deprotected amine groups were not distinguishable from the noise of the baseline as they were probably exchanged with D₂O (Figure S2).

The degree of polymerization (\overline{DP}) of the poly(TFA L-lysine) block within the copolymer was determined by comparing the peak integrations of end methyl group of PEO block (-CH₃, $\delta = 3.217$ ppm) with ϵ -methylene protons of the lysine side chains (-CH₂, $\delta = 3.106$ ppm) or with the 6 equivalent β , γ , δ -methylene protons of the lysine side chains (-CH₂)₃, $\delta = 1.1 - 2$ ppm). This allowed us to determine a \overline{DP} of 10 for the PLL block (Figure S1).

The removal of labile trifluoroacetyl (TFA) protecting groups of L-lysine was characterized by ¹H and ¹³C NMR analysis. The ¹³C-NMR analysis of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ in D₂O with DCI conformed the disappearance of the signal of the fluorinated carbon (-CF₃, $\delta = 110-120$ ppm) (Figure S3). From the NMR analysis of PLL in D₂O with DCI, a lysine length of 22 units was derived by considering the protons of the initiator in α position from the azide group (-CH₂, $\delta = 3.24$ ppm) and the proton on the α -carbon or the ϵ -methylene protons of the lysine side chains (CH₂, $\delta = 4.281$ ppm, -CH₂, $\delta = 2.948$ ppm) (Figure S2 b).

Carbonyl groups of the polypeptide backbone were not observed on ¹³C NMR spectrum of PEO-*b*-PTFALL in d₆-DMSO (Figure S3). Indeed, it was supposed that PTFALL blocks could form a secondary structure (α -helix or β -sheet) through hydrogen bonding between CO and NH groups. Once deprotected, in D₂O with DCI PLL chains probably adopted a more coil-like molecular conformation. This conformational transition was characterized by a shift of the ϵ -methylene protons of the lysine side chains from $\delta = 3.106$ ppm to $\delta = 2.704$ ppm on ¹H NMR spectra¹ (Figure S1 and Figure S2a) as well as by the appearance of the carbonyl group peak of the peptide bond at $\delta = 172$ ppm on ¹³C NMR spectra (Figure S3).

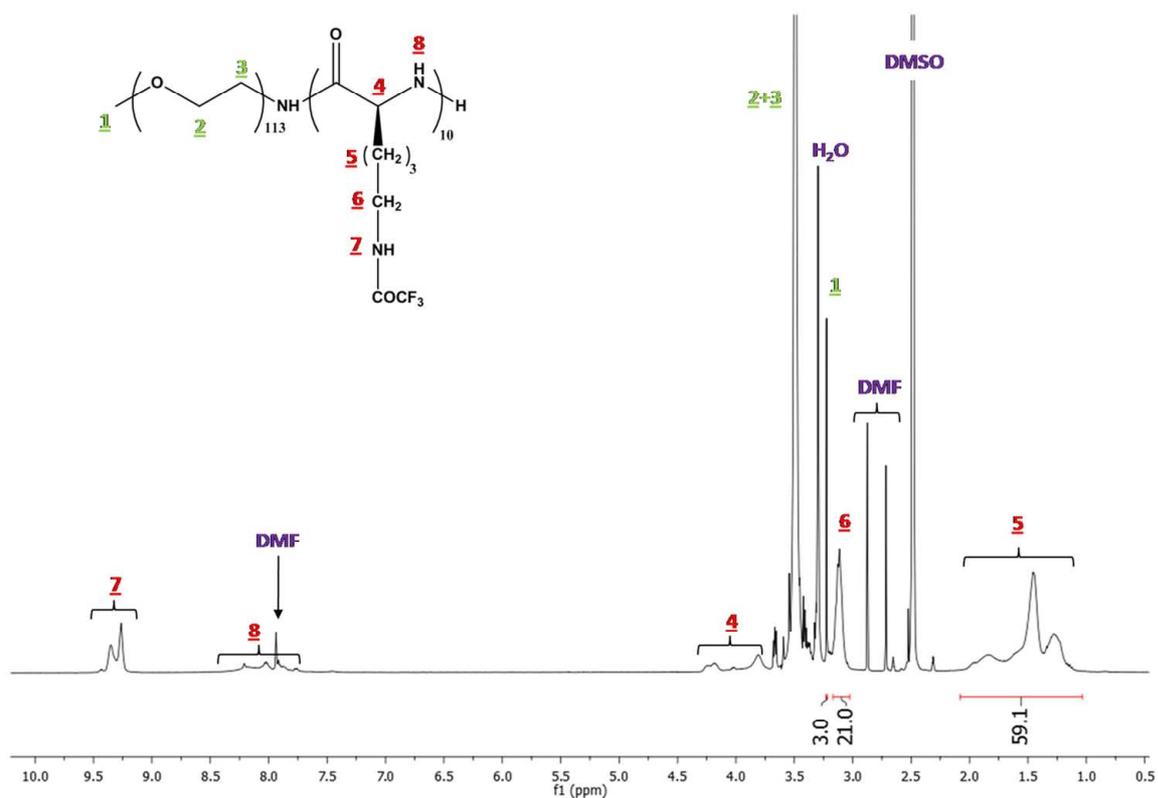
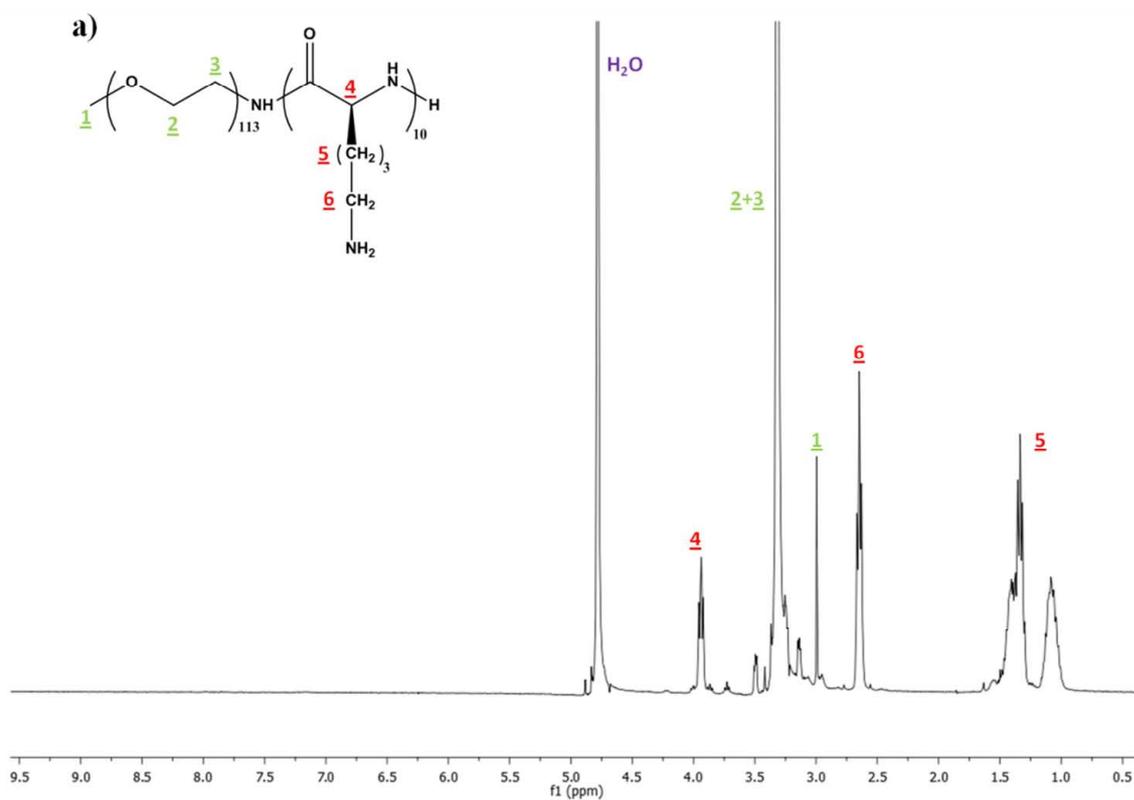


Figure S1. ^1H NMR spectrum of PEO₁₁₃-*b*-PTFALL₁₀ in d_6 -DMSO



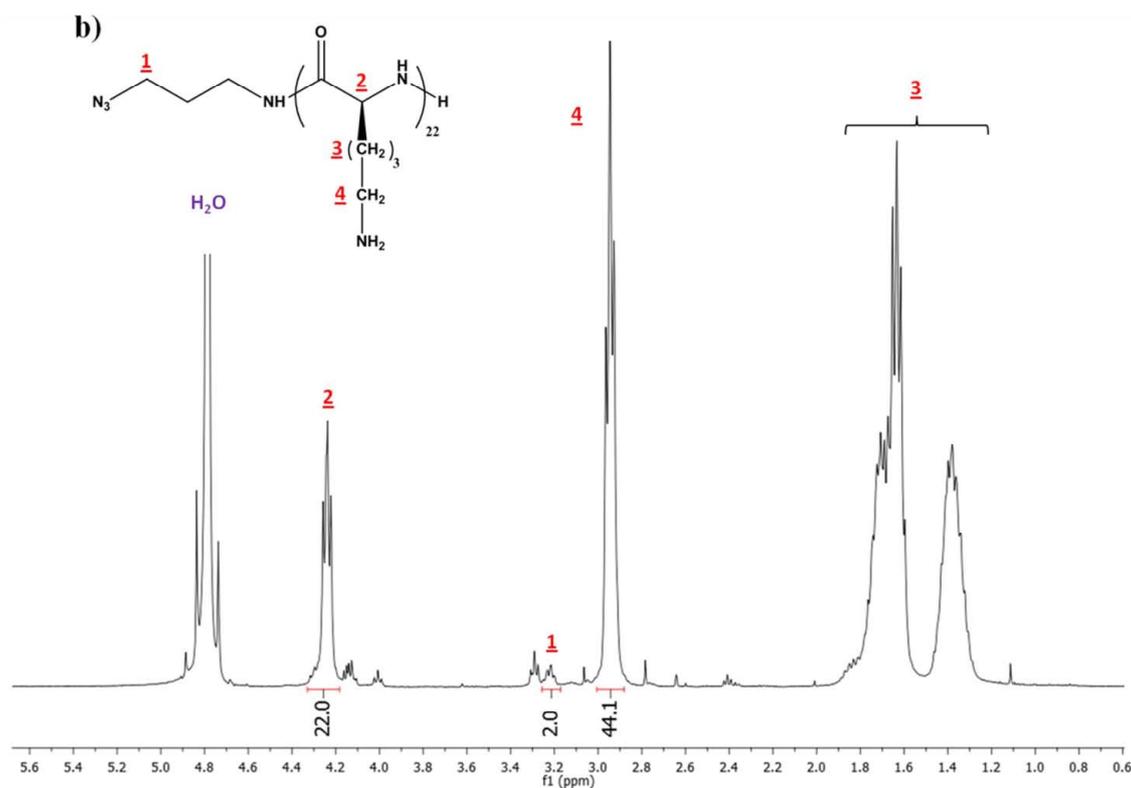


Figure S2. ¹H NMR spectra of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ (a) and PLL₁₀ (b) in D₂O with DCI

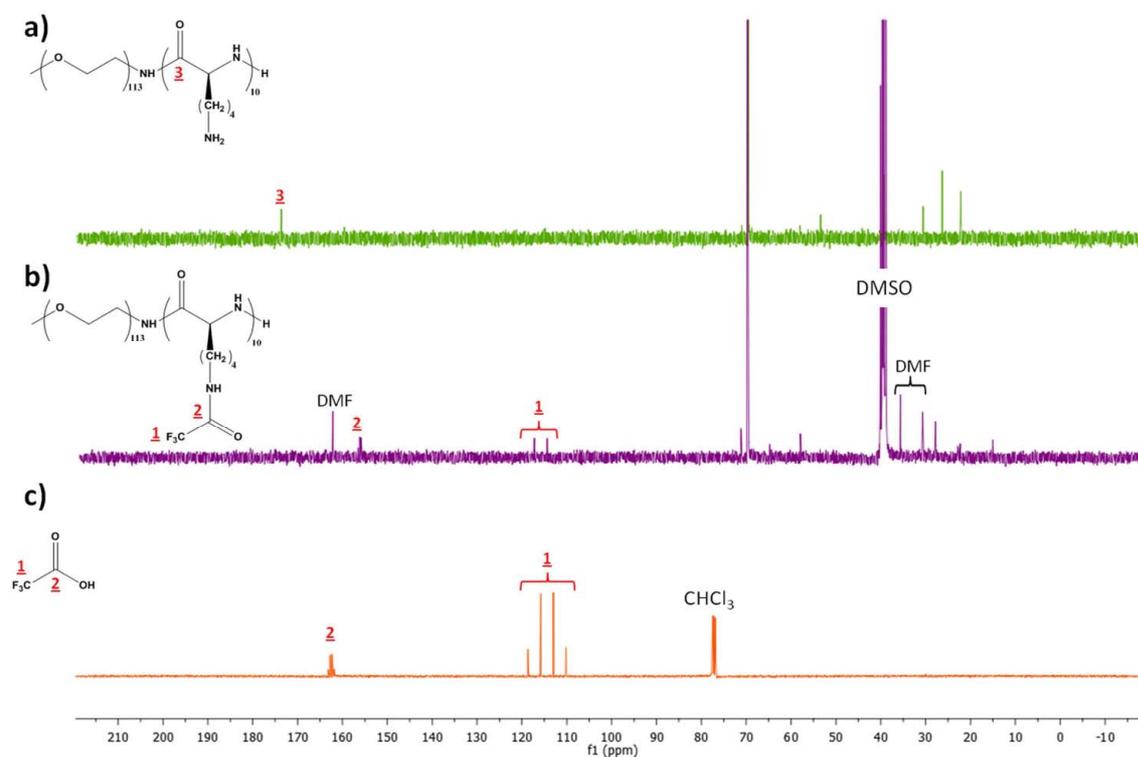


Figure S3. Overlay of ¹³C NMR spectra of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ in D₂O with DCI (a), PEO₁₁₃-*b*-PTFALL₁₀ in d₆-DMSO (b) and TFA in CDCl₃ (c)

6.1.2 Titration of PEO-b-PLL copolymer solutions

Conductimetric and potentiometric titrations of the diblock copolymer were conducted to determine the \overline{DP} of the lysine block as well as the protonation degree of the lysine units at pH 7.4 (Figure S4). 31 mg of PEO-b-PLL were dissolved at 0.2% (w/w) in water with 5 mM of NaCl and the pH was adjusted to 3.0 after overnight stirring by addition of a 0.1 M HCl solution. Titration experiments were carried out using 0.1 M volumetric NaOH standard. To avoid any diffusion of salt from the pH probe, the copolymer solution was divided into two equal volumes, so pH and conductivity variations were independently monitored, respecting an equilibration time of 4 min after NaOH addition.

The conductive species contained in the solution are H^+ , Na^+ , Cl^- , OH^- and the NH_3^+ beard by the pendant chains of the lysine block (PLL⁺). Thus, the conductivity may be expressed as followed :

$$\Lambda = C_{H^+}\lambda_{H^+} + C_{Na^+}\lambda_{Na^+} + C_{Cl^-}\lambda_{Cl^-} + C_{OH^-}\lambda_{OH^-} + C_{PLL^+}\lambda_{PLL^+}$$

where C_i is the ions concentration in the solution and λ_i is the molar conductivity corresponding to each ion. Table 1 gathered the different molar conductivities.

Table 1. Molar conductivity of various ions

	H^+	Na^+	Cl^-	HO^-
Molar conductivity ($mS.m^2.mol^{-1}$)	34.98	5.01	7.63	19.86

During the titration, the concentrations of conductive species evolve except for the one of Cl^- which remains constant. Before titration, a large excess of HCl was added to ensure the full protonation of lysine block. In the first part of the diagram (A) the titration of the excess of HCl occurs resulting in a decrease of the free H^+ concentration and in an increase of the Cl^- concentration. As the molar conductivity of H^+ is higher than the one of Na^+ , the total conductivity is decreasing. At $V=V_{\Lambda 1}$ no more free H^+ remain in solution. In the second part of the diagram (B), the titration of the lysine residues occurs. The concentration of PLL⁺ decreases and Na^+ still continues to increase. Since, the resulting conductivity increases, the molar conductivity of PLL⁺ is expected to be lower than the one of Na^+ . When all lysine residues are deprotonated ($V>V_{\Lambda 2}$, part C), the addition of NaOH results in a drastically increase of the conductivity as the concentration of OH^- increases.

The conductivity is corrected taking into the polymer dilution.

$$\Lambda^i = \Lambda_{measured}^i \times \frac{V_{NaOH}^i + V_0}{V_0}$$

where $\Lambda_{measured}^i$ is the read conductivity, V_0 is the initial volume and V_{NaOH}^i is the NaOH solution volume of added at the step i.

A \overline{DP} of 9.6 was derived for the lysine block using the following equation :

$$\overline{DP}(PLL) = \frac{n_{OH^-} \times M_{PEO}}{(m_{PEG-b-PLL} - M_{LL} * n_{OH^-})} = \frac{n_{OH^-} \times 5000}{(m_{PEG-b-PLL} - 129 * n_{OH^-})}$$

where $m_{PEO-b-PLL}$ is the mass of block copolymer and n_{OH^-} the amount of added NaOH between the two inflexion points $V_{\Delta 1}$ and $V_{\Delta 2}$ (Figure S4). This value of \overline{DP} was in good agreement with previous NMR analysis.

Potentiometric titration was used to evaluate the ionization degree of the lysine units at pH 7.4. The high value of pKa (≈ 10.5) did not allow to determine the inflexion point corresponding to the full neutralization of the protonated lysine groups. However, one could consider that almost all lysine groups were protonated at pH 7.4 since the first inflexion point corresponding to the neutralization of the excess of hydrochloric acid was close to pH 7.4.

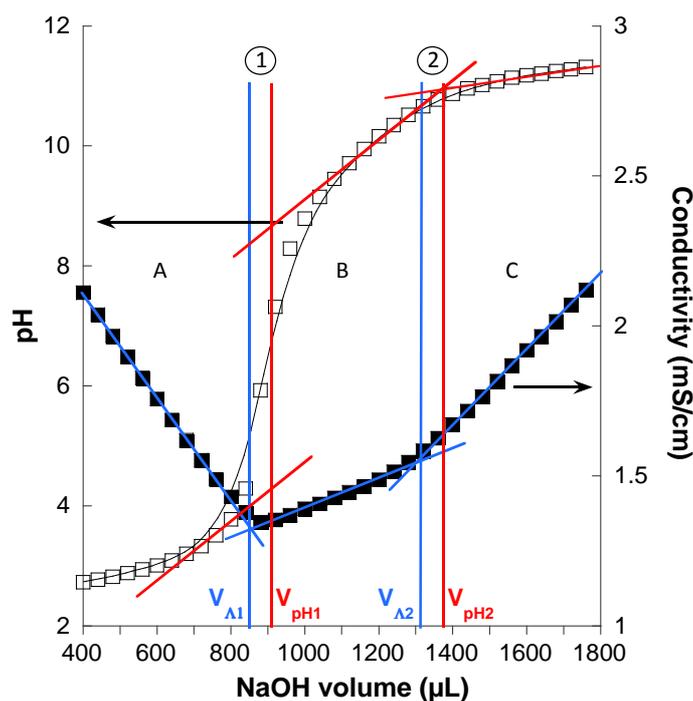


Figure S4. pH-metric and conductimetric titration of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ (0.2% w/w) at room temperature – blue lines refer to the conductimetric titration and red lines to the potentiometric titration

6.2 Silica particles titration

The surface charge of silica particles was determined by potentiometric titration according to the procedure described by Sonnerfeld *et al.*² 111 mg of silica particles were dissolved in a aqueous solution containing 0.1 M or 0.255 M of NaCl, this latter concentration in salt having the same ionic strength as a 0.1 M phosphate buffer. The pH was adjusted to 8.2 by adding 35 μ L of 1 M NaOH solution. An equivalent volume of 1 M NaOH was also added to water with 0.1 M and 0.255 M NaCl (blank solutions) and the resulting pH was around 11. Both solutions were titrated with a 0.1 M volumetric HCl standard applying an equilibration time of 4 minutes between each addition of HCl solution. For each pH, the surface charge density per mass unit (σ_0) was obtained from the comparison between the added volume of acid in the blank V_{HCl}^B and in the sample V_{HCl}^S , according to the following equation :

$$\sigma_0 = \frac{F_A \times C_{HCl}}{m_{SiO_2}} \times (V_{HCl}^S - V_{HCl}^B)$$

where F_A is the faraday constant and C_{HCl} the concentration of the volumetric HCl standard.

The surface charge of silica particles was determined between pH 4 and pH 8. In this range of pH values, V_{HCl}^B was derived by fitting the plot with a power law (Figure S5). Figure S6 represents the surface charge density of silica particles for both concentrations in NaCl. As previously reported, oxide surface charge density is dependent on the ionic strength. As the salt concentration increases, σ_0 increases due to the condensation of counterions which promote the dissociation of silanol groups.²⁻⁴ At pH 7.4 and 0.255 M in NaCl, the silica surface charge density is -12.7 C/g.

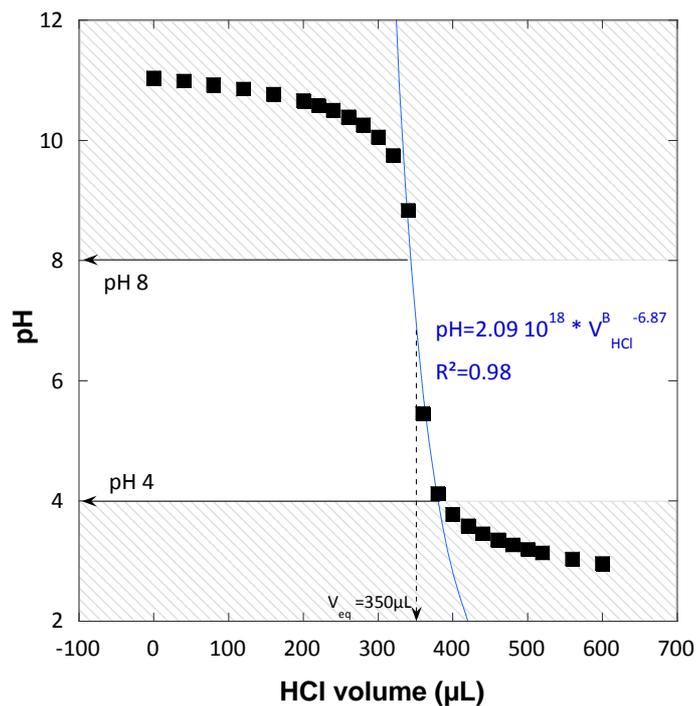


Figure S5. Acid titration of the blank solution with 0.255 M NaCl

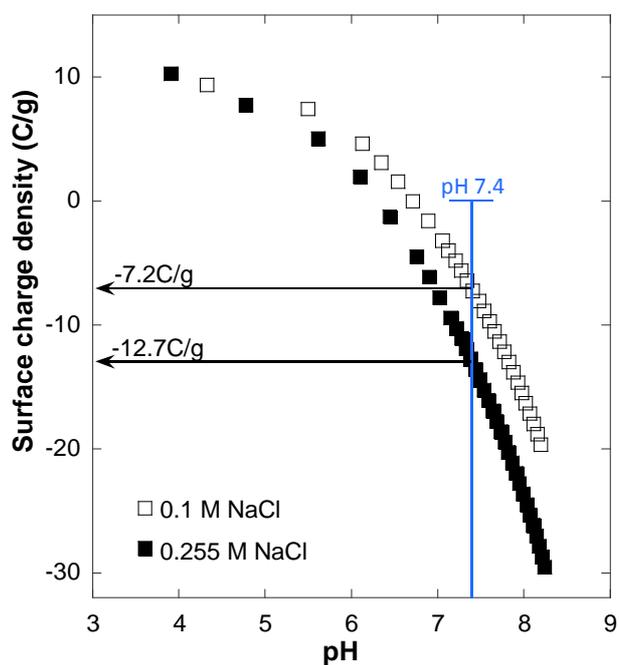


Figure S6. Surface charge density of silica particles as a function of pH for two different values of ionic strength.

6.3 Polymer titration

6.3.1 PEO titration

Size-exclusion chromatography was used to determine the concentration of PEO homopolymer for competitive and displacement experiments. The polymer separation was performed on two serially connected Aquagel-OH 30 and 40 columns. The detection was operated by a differential refractometer (Optilab rEX, Wyatt). A degassed 100 mM PB buffer pH 7.4 was used as eluent. The flow rate was maintained at 0.8 mL/min, and the amount of sample injected was 100 μ L. A calibration curve obtained by integration of PEO eluting peaks (Figure S7) (between elution times of 24.5 and 29.3 min) showed a good linearity up to PEO concentrations of 5 g/L (Figure S8).

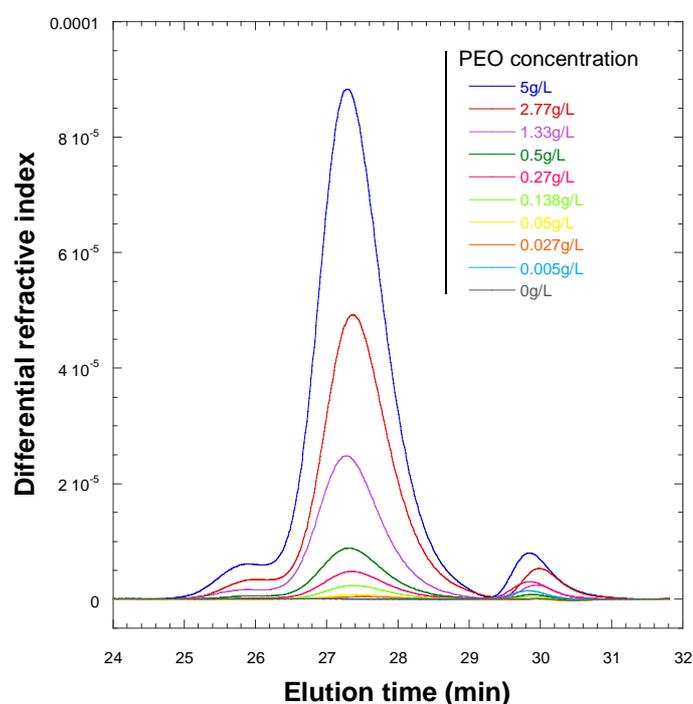


Figure S7. Size exclusion chromatograms of PEO₁₁₃ at various concentrations in 100 mM PB pH 7.4.

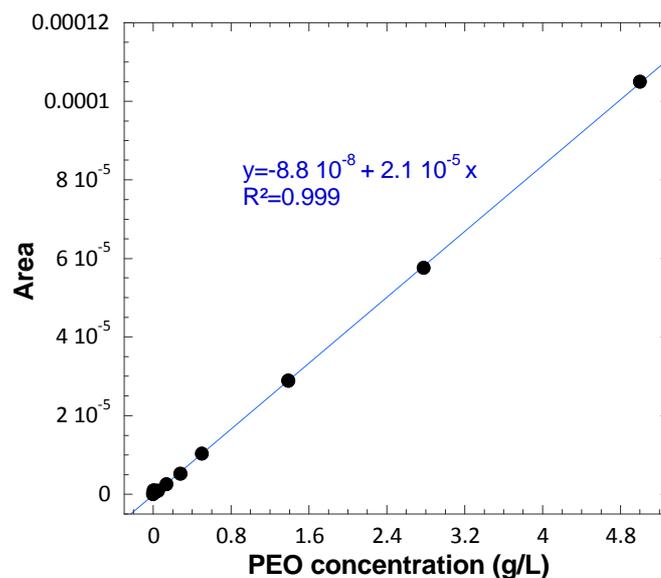


Figure S8. Area of the eluting peaks as a function of PEO concentration.

6.3.2 PLL and PEO-*b*-PLL titration

The titration of PLL homopolymer as well as PEO-*b*-PLL copolymer was carried out spectrophotometrically using an anionic dye, the 4-(4-hydroxy-1-naphthylazo)benzenesulfonic acid (Acid Orange 7) (Figure S9).^{5,6} In acid conditions, the sulfonate group of the dye binds with protonated amine functions. The UV-Visible spectrum of Acid Orange 7 displays a characteristic band at 485 nm whose absorbance is proportional to the free (unbound) concentration of dye in the medium.

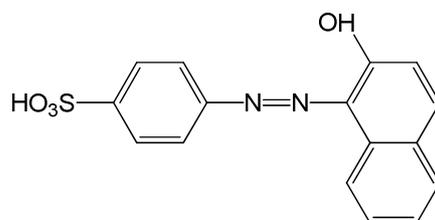


Figure S9. Chemical structure of Acid Orange 7

A 10^{-4} M solution of Acid Orange 7 was prepared in $1.7 \cdot 10^{-2}$ M acetic acid solution. 1.3 mL of this solution were mixed with 0.2 mL of polymer solution varying in concentration in 100 mM PB (pH 7.4). After 24 hrs stirring, the absorbance of the solution was measured at $\lambda = 485$ nm using a Molecular Devices UV-visible spectrophotometer (Figure S10). The quite high concentration of acetic acid in the dye solution ensured a full protonation of lysine residues of PLL and PEO-*b*-PLL in supernatants. As seen in Figure S11, the optical density (OD) at 485nm decreased linearly with the $n\text{NH}_3^+/n\text{SO}_3^-$ molar ratio up to unity. When this ratio exceeded 1 the OD_{485} started to diverge and could no longer be used to determine the concentration of amine groups in PLL and PEO-*b*-PLL solutions. Hence, this colorimetric method is valuable as long as there is an excess of dye in polymer solutions.

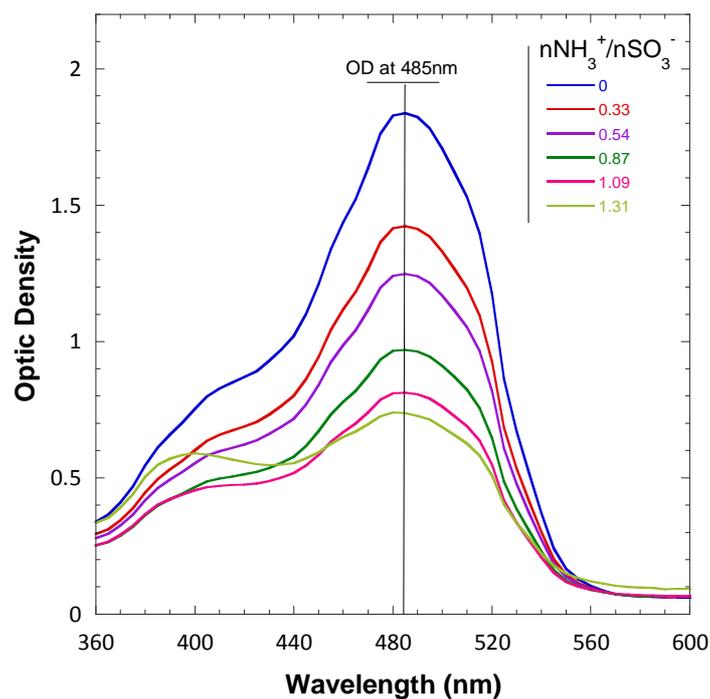


Figure S10. Absorbance spectrum of Acid Orange 7 as a function of polymer (PLL or PEO-b-PLL) concentrations expressed in term of $n\text{NH}_3^+ / n\text{SO}_3^-$ molar ratio values.

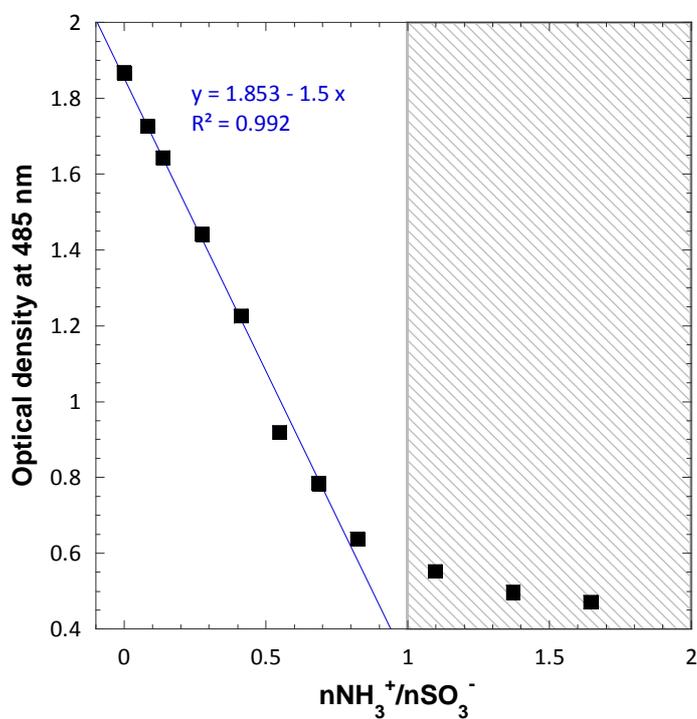


Figure S11. Absorbance at 485nm of Acid Orange 7/Polymer mixtures varying in $n\text{NH}_3^+ / n\text{SO}_3^-$ molar ratios

6.4 Adsorption isotherm of PEO onto silica particles

The adsorption isotherm of PEO₁₁₃ on silica nanoparticles (2.8 g/L) was determined in 100 mM PB buffer (pH 7.4) (Figure S12.). To 700 μ L of copolymer varying in concentration from 0 to 3.6 g/L, 700 μ L of silica suspension at 5.6 g/L were quickly added. After 24 hrs stirring at RT, nanoparticles were centrifuged (11092 g, 30 min, 10 $^{\circ}$ C) and the supernatant containing free (unadsorbed) polymer was removed. The concentration of PEO in supernatants was determined by SEC as described previously (Figure S8). The isotherm features a rather sharp increase of the adsorbed polymer amount at low concentration until a plateau is reached. This trend, characteristic of a Langmuir type adsorption isotherm, suggests a rather high affinity of the PEO towards silica surface. The maximal amount of adsorbed PEO is 33 mg/g SiO₂.

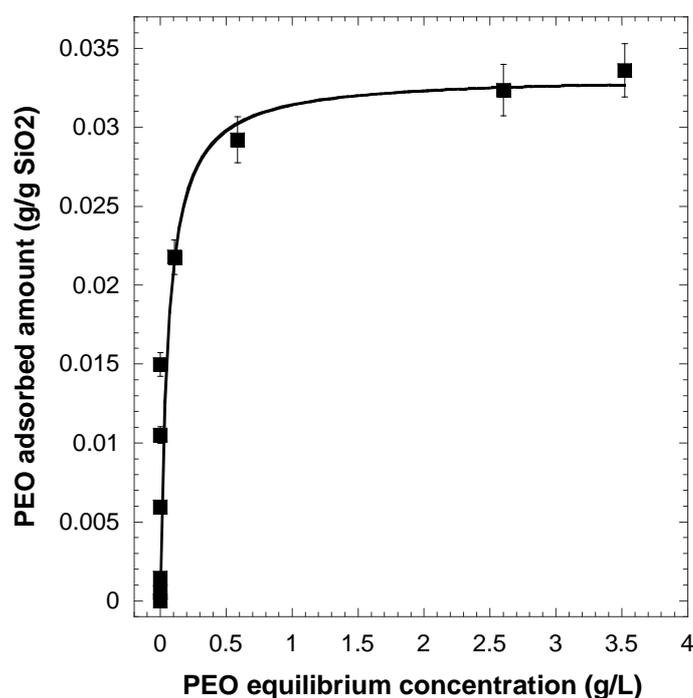
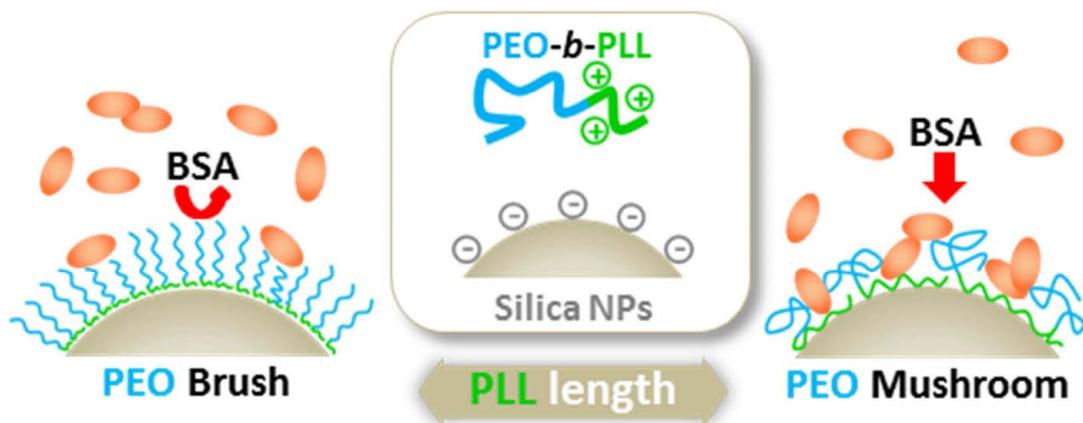


Figure S12. PEO₁₁₃ adsorption isotherm on silica particles in 100 mM PB at pH 7.4 – [Silica]₀ = 2.8 g/L

6.5 References

1. A. Harada, S. Cammas and K. Kataoka, *Macromolecules*, 1996, **29**, 6183-6188.
2. J. Sonnefeld, A. Göbel and W. Vogelsberger, *Colloid Polym. Sci.*, 1995, **273**, 926-931.
3. V. Shubin, *J. Colloid Interface Sci.*, 1997, **191**, 372-377.
4. S.-C. Liufu, H.-N. Xiao and Y.-P. Li, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, **285**, 33-40.
5. G. G. Maghami and G. A. F. Roberts, *Makromol. Chem.*, 1988, **189**, 2239-2243.
6. B. D. Gummow and G. A. F. Roberts, *Makromol. Chem.*, 1985, **186**, 1239-1244.

Chapitre III. Controlling the grafting density of PEO chains at silica particle surface by adsorption of PEO-*block*-poly(L-Lysine) copolymers : role of the anchor size block and the ionic strength



La première partie de ce projet de thèse a permis d'établir le mécanisme d'adsorption d'un copolymère PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ sur des nanoparticules de silice. Malgré la forte affinité des deux blocs avec la surface de la silice, c'est le bloc PLL qui par une combinaison supposée de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques avec la silice s'adsorbe préférentiellement, le bloc PEO assurant la stabilité stérique des particules. Il est à présent d'intérêt de considérer l'influence de la composition et de la masse molaire du copolymère sur le mécanisme d'adsorption du copolymère en vue de sélectionner le système le plus adapté à l'élaboration de particules multifonctionnelles. C'est pourquoi cinq copolymères ayant des longueurs de blocs PLL et PEO variables vont à présent être étudiés dans les mêmes conditions d'adsorption que précédemment. Les isothermes d'adsorption et la diffusion dynamique de la lumière seront à nouveau les techniques privilégiées car elles donnent accès à de nombreuses grandeurs nécessaires pour comprendre la structure et la conformation de la couche de copolymère adsorbé. En particulier, nous ferons appel aux modèles établis par de Gennes et Alexander pour définir les régimes conformationnels des copolymères à la surface des particules. L'influence de la force ionique sur la quantité de copolymère adsorbée sera également étudiée car il est établi que c'est un paramètre de première importance dans le cas de l'adsorption de polyélectrolytes sur des surfaces chargées. La stabilité des particules sera évaluée en fonction de la force ionique du milieu et aussi en présence d'une protéine modèle. Nous espérons pouvoir établir une relation entre la conformation des copolymères adsorbés et la stabilité des particules dans des conditions données. Outre l'aspect fondamental que revêt ce type d'étude il est à nouveau important par rapport à la finalité du projet d'acquérir le maximum d'informations sur les propriétés colloïdales des particules modifiées dans diverses conditions physicochimiques.

1 Introduction

The use of nanoparticles has grown rapidly over the past decade especially in biomedical applications where the control of the interactions between nanoparticle surface and biomolecules in biological fluids are of great importance. It is well-established that the protein adsorption is influenced by parameters such as the surface chemical composition, the roughness and the porosity of the particles. The nonspecific protein adsorption onto particles is usually achieved by coating them with a biocompatible layer of polysaccharides¹⁻³, phospholipids^{4,5} or poly(ethylene oxide) (PEO),⁶⁻¹¹ the latter being the most widely used so far.^{12,13} The ability of PEO coated particles to repel proteins from their surface has been attributed to the flexibility of PEO chains and to their high hydration^{14,15}. The thickness of the PEO layer must be large enough to screen protein-particle interactions and the PEO grafting density must be sufficient to block the protein diffusion to the particle surface. According to the scaling theory proposed by de Gennes and Alexander¹⁶⁻¹⁹, the grafting density of polymer chains at an interface characterizes whether the chains adopt a brush or a mushroom conformation, the brush conformation being the most efficient to create a steric barrier at the particle surface. In most reports, the grafting density and the thickness of the PEO layer are not controlled and the brush conformation is often only assumed.

In a previous work we showed that the adsorption of double hydrophilic poly(ethylene oxide)-*block*-poly(L-lysine) (PEO-*b*-PLL) copolymers onto silica nanoparticles is a convenient way to form a PEO layer with stabilizing properties at the particle surface²⁰. At low surface coverage, both PEO and PLL blocks adsorb with a more or less flat conformation whereas at higher surface coverage the stronger affinity of PLL with silanols and silanolate groups is sufficient to desorb PEO blocks from the surface. Interestingly, we demonstrated that the addition of silica particles into a large excess of copolymer solution is the preferred method to obtain an adsorbed PEO layer in close-to-equilibrium conditions.

Starting from the same type of diblock copolymers and the same approach of particle coating, the present work aims at studying at first how the structure of the PEO layer at the surface of silica nanoparticles can be controlled in terms of thickness and grafting density of PEO chains. Especially, we wish to study how the chemical composition of the block copolymers as well as the experimental adsorption conditions, mostly the ionic strength of the medium, can achieve such a control. Then, the colloidal properties of the PEO coated nanoparticles will be evaluated with regard to their stability at different ionic strengths and in presence of bovine serum albumine (BSA) protein. We expect that a close correlation does exist between the structure of the PEO layer and the interactions of the particles with proteins.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Dimethylformamide (DMF) (Scharlau, 99.9%) was dried over molecular sieves (3 and 4 Å) and cryodistilled prior to use. Amino-terminated PEO ($\overline{M}_n = 5000$ g/mol) purchased from Rapp polymere was dissolved in dioxane and lyophilized to remove water traces. ϵ -trifluoroacetyl L-lysine *N*-carboxyanhydride (TFA-Lys NCA) (Isochem, +96%) and acid orange II (Aldrich) were used as received. Silica particles (Ludox TM-50, Aldrich) and bovine serum albumine (99%, Aldrich) were purchased in their reagent grades and used without further purification.

2.2 Polymers synthesis

Detailed information about the synthetic route to PLL homopolymer and PEO-*b*-PLL copolymer as well as characterization procedures can be found in previous references.²¹⁻²³ Briefly, PEO-*b*-PLL diblock copolymer was synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of TFA L-Lys NCA initiated by an amino end-functionalized PEO macroinitiator. 1-azido-3-aminopropane compound was synthesized following an already published procedure and used as aminated initiator for the synthesis of poly(TFA L-lysine) homopolymer.²⁴ The degree of polymerization (DP) of the poly(TFA L-lysine) segment within the block copolymer was determined from the molar ratio of TFA lysine and ethylene oxide units obtained by ¹H NMR analysis (Brücker AC 400 spectrometer) in deuterated DMSO. For the poly(TFA L-lysine) homopolymer, the determination of the DP by ¹H-NMR is possible only after deprotection of the trifluoroacetyl groups since the peaks of the initiator were hidden by those of the polymer in DMSO. The molecular weight distribution and the polydispersity index ($pdi = \overline{M}_w / \overline{M}_n$) were determined by size-exclusion chromatography performed in DMF with LiBr (1 g/L) as eluent (0.8 mL/min) at 60°C using a Waters apparatus (Alliance GPCV2000) equipped with a refractometric detector and calibrated with polystyrene standards. The removal of the labile trifluoroacetyl (TFA) protecting groups of L-lysine was achieved by treatment with KOH (1.5 equiv.) in THF at RT during 24 hrs. Once the reaction completed, the THF was removed by rotary evaporation and the product was precipitated in cold diethyl ether and dried over night under dynamic vacuum. The full deprotection was confirmed by ¹³C-NMR in D₂O with DCI through the disappearance of the signal of the fluorinated carbon (CF₃: $\delta = 110-120$ ppm) and by ¹H-NMR through the shift of the ϵ -methylene protons of the lysine side chains (ϵ -CH₂: $\delta = 2.704$ ppm).²⁵ Also, a shift of the carbonyl signal of the peptide bond was observed by ¹³C-NMR by comparing the protected lysine form ($\delta = 157$ ppm) with the deprotected one ($\delta = 165$ ppm), which is consistent with a helix-to-coil transition. The chemical structure of PLL homopolymer and PEO-*b*-PLL copolymer are depicted in Figure 1. Main structural parameters related to the polymers synthesized in this work are presented in Table 1.

It is worth noting that both PLL and PEO-*b*-PLL compounds cannot directly be solubilized in 10 mM phosphate buffer (PB) at pH 7.4 because of remaining traces of KOH. Therefore, the polymer powder was dispersed at first in buffer and the pH was adjusted to 7.4 with a 1 M HCl solution after overnight stirring.

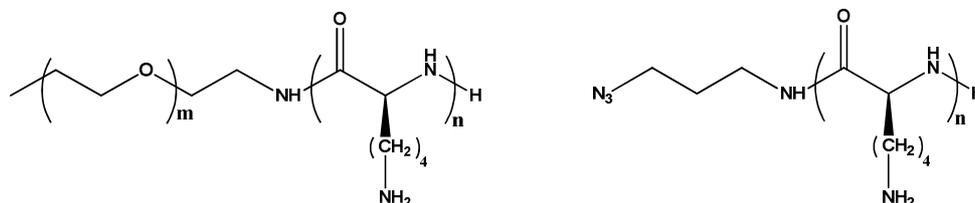


Figure 1. Chemical structure of PEO_n-*b*-PLL_m copolymer and PLL homopolymer

Table 1. Chemical compositions and molar masses of PEO_n-*b*-PLL_m block copolymers and PLL homopolymer

	DP(PEO)	DP(PLL)	pdi	Mn
	-	-	-	g/mol
PLL ₂₂	-	22	1.20	2700
PEO ₄₅ - <i>b</i> -PLL ₁₀	45	10	1.20	3300
PEO ₄₅ - <i>b</i> -PLL ₃₇	45	37	1.20	6800
PEO ₄₅ - <i>b</i> -PLL ₁₀₀	45	100	1.15	14900
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀	113	10	1.10	6300
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₂₇₀	113	270	1.05	39800

2.3 Small Angle Neutron Scattering (SANS)

Ludox silica particles were characterized by SANS measurement to determine accurately the particle specific surface. It was performed on the PACE spectrometer at the Laboratoire Léon Brillouin (CEA-Saclay, France). Three configurations were used: the first one with a sample-to-detector distance of $D = 4.7$ m and a neutron wavelength of $\lambda = 12$ Å to cover q ranges of $3.48 \times 10^{-3} - 3.7 \times 10^{-2}$ Å⁻¹; the second one with $D = 4.7$ m and $\lambda = 6$ Å to cover q ranges of $6.91 \times 10^{-3} - 7.36 \times 10^{-2}$ Å⁻¹, and the last one with $D = 1$ m and $\lambda = 6$ Å to cover q ranges of $3.66 \times 10^{-2} - 3.7 \times 10^{-1}$ Å⁻¹. All full angular averaging of the cells at constant q was realized for the scattering patterns. Particles were analyzed at 10 mg/mL in D₂O in a 5 mm thick quartz cell.

2.4 Adsorption isotherms

Adsorption isotherms of PLL, PEO-*b*-PLL and BSA onto silica particles were performed according to a depletion method, which relies on the measurement of the amount of remaining polymer (protein) in the supernatant, leading to the amount of polymer (protein) effectively adsorbed at the particle surface. Polymer or protein solutions were added to a dispersion of nanoparticles (2.8 g/L for polymer adsorption and 1 g/L for BSA adsorption) in PB (pH 7.4, 10 mM). After 24 hrs of stirring at room temperature (RT) nanoparticles were centrifuged (11092 rpm, 30 min, 10°C),

The titration of PLL and PEO-*b*-PLL in supernatants was carried out using the 4-(2-Hydroxy-1-naphthylazo)benzenesulfonic acid (Acid Orange II) as titration dye^{26, 27}. A 10⁻⁴ M solution of the dye in 0.017 M acetic acid was prepared. To 200 µL of supernatant, 1.3 mL of dye solution was added. After 24 hrs, the absorbance was measured at $\lambda_{\max} = 485$ nm using a Molecular Devices UV-vis spectrophotometer. Quantification was performed from the calibration curve of solutions of acid orange II in 0.017 M acetic acid. BSA in supernatant was titrated at 280 nm in quartz cuvette using a calibration curve ranging from 0 to 2.10⁻⁵ M of BSA.

2.5 Formation of PEO-*b*-PLL coated silica nanoparticles

PEO-coated NPs were prepared by mixing equivolumes of block copolymer solution in PB (7.4, 10 mM) with silica in the same buffer (2 g/L). After 24 hrs of gentle stirring, suspension was centrifuged (2291 g, 30 min, 10 °C) and resuspended in PB to remove the excess of unadsorbed block copolymers. The polymer concentration in the stock solution depends on the copolymer (Table 2).

Table 2. Copolymer and silica concentrations used for the preparation of hybrids nanoparticles

	Starting solution		Final suspension
	C _{PEO-<i>b</i>-PLL} g/L	C _{Silica} g/L	m _{PEO-<i>b</i>-PLL} /m _{SiO₂} g/g
PEO ₄₅ - <i>b</i> -PLL ₃₇	9	2	4.5
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀	6	2	3
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₂₇₀	9	2	4.5

Salt stability and BSA interaction studies are based on simple mixing of PEO-*b*-PLL coated silica NPs (≈ 1 gSiO₂/L) with NaCl or BSA solutions both varying in concentration.

2.6 Dynamic light scattering (DLS) and static light scattering (SLS) analysis

Hydrodynamic sizes of silica nanoparticles coated with copolymer and/or BSA protein were determined by DLS analysis at 25°C using a Malvern ZetaSizer Nano ZS instrument with a detection at 90°. Mean hydrodynamic diameters and their distributions were determined using the cumulant analysis method. SLS experiments were performed using an ALV laser goniometer, which consisted of a 35 mW HeNe linear polarized laser with a wavelength of 632.8 nm and an ALV-5000/EPP Multiple Tau digital correlator with 125 ns initial sampling time. Samples were kept at constant temperature (25 °C) during all the experiments. The accessible scattering angle range was from 40° up to 140°. 2 mL of particle suspension (0.3% w/w in PB) were immersed in a filtered toluene bath and dilutions were directly performed in 20 mm diameter cylindrical glass cells. Scattered intensities were acquired during 20 seconds at each angle and the whole data were analyzed with ALVstat software. The differential refractive index increments dn/dc of bare and PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated silica particles in PB buffer were measured over a concentration range of 0.8–4 mg/mL by means of a differential refractometer (Wyatt Optilab rEX) operating at a wavelength of 658 nm and at 25 °C.

2.7 Microelectrophoresis

Electrophoretic mobilities of PEO-coated silica nanoparticles coated with PEO-*b*-PLL and/or BSA were measured using a Malvern ZetaSizer Nano ZS instrument. In this study, the electrophoretic mobility (μ) was converted to the zeta potential (ζ) using the Smoluchowski approximation. All the measurements were at least the average of five runs performed at 25 °C.

2.8 Isothermal titration calorimetry (ITC)

Binding experiments of copolymer coated particles with BSA protein were performed on a ITC₂₀₀ from MicroCal, which operated at a constant temperature of 298 K. To carry out a binding experiment, 205 μ L of hybrid particles suspensions (0.1% w/w in 10 mM PB pH 7.4) were placed in the sample cell. The syringe was filled with the BSA solution (1.5 mM in 10 mM PB pH 7.4). The first injection was set to a very small volume of 1 μ L and was not taken into account in the ITC analysis, due to possible dilution effect occurring during the equilibration time preceding the first injection.^{28, 29} It was followed by 38 injections of 1 μ L each. To ensure that the thermodynamic equilibrium was reached between two consecutive injections, the equilibration time was set to 300 s. The heats of dilution of BSA solutions were determined in blank experiments in which the BSA solutions were injected into the sample cell containing only PB buffer. The dilution heats were then subtracted to obtain the binding heats.

3 Results and discussion

3.1 Adsorption of PEO-b-PLL copolymers onto silica nanoparticles

As previously reported, the adsorption of PEO-*b*-PLL onto silica particles may be used as a non-covalent strategy to produce pegylated particles²⁰. When the adsorption is performed in presence of a large excess of copolymer, PLL blocks are well adsorbed at the silica surface whereas PEO blocks stretch into solution, giving rise to a typical anchor-buoy conformation of the adsorbed copolymer. The thickness of the copolymer layer as well as the PEO grafting density being two essential parameters regarding the colloidal properties of the particles, a full physicochemical investigation of the adsorption of PEO-*b*-PLL copolymers with different block lengths (Table 1) and at various ionic strengths was performed.

The adsorption isotherms of five PEO-*b*-PLL copolymers on silica nanoparticles, obtained through the so-called depletion method (see experimental section), are plotted in Figure 2. All copolymers give rise to the same trend, namely a sharp increase of the adsorbed amount at very low concentrations of copolymer until a plateau is reached. This trend, which is characteristic of a Langmuir type adsorption isotherm, suggests a rather high affinity of the block copolymer towards silica surface. Indeed, the Langmuir model is typically used to describe the adsorption behavior of species that adsorb strongly on surfaces at small concentrations and then reach a saturated condition at higher concentrations. The Langmuir adsorption equation was used to fit the experimental data:

$$C_{\text{Ads}} = \frac{kC_{\text{Ads}}^{\text{Max}} C_{\text{eq}}}{1 + kC_{\text{eq}}}$$

where $C_{\text{Ads}}^{\text{Max}}$ is the maximum mass of surface-adsorbed copolymer chains, C_{eq} is the equilibrium concentration in copolymer and k the adsorption constant ($=k_{\text{adsorption}}/k_{\text{desorption}}$) (see values in Table 3).

The maximal amount of adsorbed copolymer was also expressed as a grafting density with regard to the specific surface of the particles. Although ludox silica particles are usually considered as nonporous, it was reported that the size of the pores is around 7 nm in diameter.³⁰ Since pores contribute to small angle scattering, the specific surface was evaluated using SANS technique from which a specific surface of 87 m²/gSiO₂ was determined. Whatever the degree of polymerization of the PEO blocks, results in Table 3 evidence that the grafting density decreased when the length of PLL blocks increased. The close correlation between the PLL length and the grafting density (or the adsorbed mass) of the copolymer chains confirms that copolymer chains preferentially adsorb through their PLL blocks, the shorter their length the higher their grafting density. The increase of the adsorption constant with the PLL length is also in line with such a preferential adsorption.

The highest grafting density was found for PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ copolymer ($\sigma = 0.75$ chain/nm²). For comparison, Babu *et al.* recently reported a grafting density of 2 chains/nm² via controlled radical polymerization technique.³¹ Such a high grafting density is unusual for a covalent approach as most of studies reported grafting densities lower than 1 chain/nm² either through “grafting from” or “grafting to” methods. We previously demonstrated that PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ adsorb through its PLL blocks in a relatively flat conformation by charge compensation between cationic lysine residues and dissociated silanol groups at the surface of the particles.³² Therefore we expect a similar behaviour with larger PLL blocks. Afshar-Rad *et al.* reported that even for PLL with a polymerization degree around 600 the polymer is still adsorbing in a flat conformation on negatively charged surfaces.³³ Importantly, the length of the PEO block does not influence greatly the adsorption process as PEO₄₅-*b*-PLL₁₀ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ copolymers have nearly the same grafting density and adsorption constant (Table 3). This also confirms that PEO-*b*-PLL copolymers adsorb with a buoy(PLL)-anchor (PEO) conformation at the silica surface. However, one may notice that the grafting density of the PEO₄₅-*b*-PLL₁₀₀ was somewhat high by comparison with the two PEO₄₅-based copolymers having shorter PLL blocks (Table 3). This has probably to do with the fact that the adsorption of copolymers containing large PLL blocks generates less steric hindrance for further adsorption of copolymer molecules since the distance between PEO blocks at the particle surface is increased. Such a behavior can be rationalized by considering the coverage ratio of PEO-*b*-PLL copolymers at the particle surface. For this purpose, the adsorption of a homopolymer of PLL containing 22 lysine units was used as reference to calculate the maximal number of lysine units that possibly adsorb onto silica nanoparticles. The coverage ratio, derived for each copolymer, corresponds to the ratio of the actual number of adsorbed lysine units within PLL blocks of different lengths to the number of adsorbed lysine residues in homo PLL. Again, this derivation was performed assuming that PLL blocks adsorb in flat conformation.³³⁻³⁵ Clearly, the coverage ratio decreases as the grafting density increases supporting the fact that adsorbed chains with a high grafting density hinder to some extent further adsorption of copolymer molecules (Table 3). Hence, even if PEO₄₅-*b*-PLL₁₀ or PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ have grafting densities higher than 0.6 chains/nm², only ~ 50% of the particle surface accessible to lysine residues is really covered by adsorbed PLL blocks.

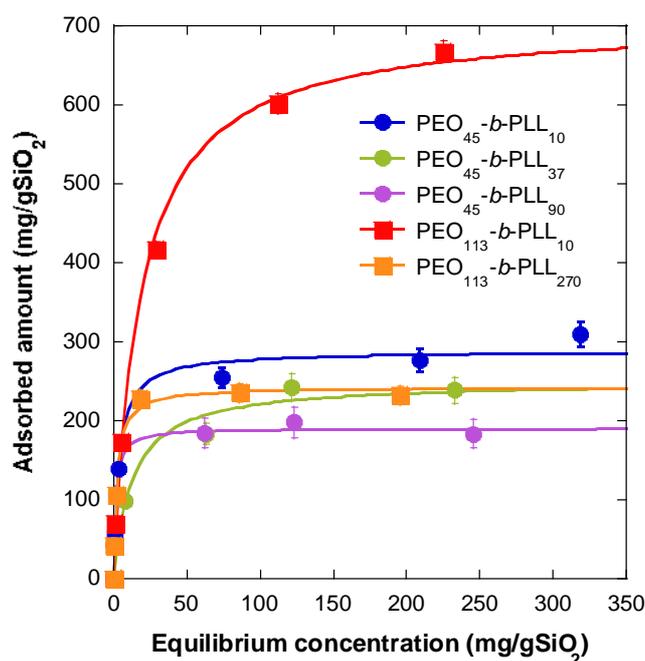


Figure 2. Adsorption isotherms of PEO-*b*-PLL block copolymers onto silica nanoparticles in PB (7.4, 10 mM). Lines serve to guide the eye only.

Table 3. Physicochemical parameters related to the adsorption of PEO-*b*-PLL copolymers onto silica nanoparticles.

		PLL ₂₂	PEO ₄₅ - <i>b</i> -PLL ₁₀	PEO ₄₅ - <i>b</i> -PLL ₃₇	PEO ₄₅ - <i>b</i> -PLL ₉₀	PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀	PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₂₇₀
C_{Ads}^{Max}	mg/gSiO ₂	274	309	237	197	700	240
	mmol lysine units/gSiO ₂	2.05	0.94	1.30	1.31	1.11	1.63
CR ^a	%	100	46	63	64	54	80
k ^b	mol/L		1.76×10 ⁵	4.48×10 ⁵	8.39×10 ⁶	1.58×10 ⁵	6.72×10 ⁷
D ^c	nm		1.41	2.31	3.77	1.3	5.5
grafting density	chains/nm ²		0.64	0.24	0.09	0.75	0.04
conformation of PEO chains	-		Dense brush	Brush	Interacting mushrooms	Dense Brush	Interacting mushrooms

^a coverage ratio derived from the number of adsorbed PLL units

^b adsorption constant derived from the Langmuir equation

^c $D=2(\pi\sigma)^{-1/2}$

Another approach to quantify the chain density at the surface of particles was previously reported by Berret *et al.*^{36, 37} and applied here as a comparison with the classical approach based on the adsorption isotherm. This method relies on determining the Rayleigh ratio of bare and PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated silica nanoparticles as a function of the silica mass concentration (Figure 3) using the following expression :

$$\frac{R^{PEO-b-PLL-SiO_2}}{R^{SiO_2}} = \frac{K^{PEO-b-PLL-SiO_2}}{K^{SiO_2}} \left(1 + n_{ads} \frac{M_w^{PEO-b-PLL}}{M_w^{SiO_2}} \right)^2$$

where R^i , K^i , M_w^i are the rayleigh ratios, the optical constants ($= 4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 / N_A \lambda^4$) and the weight-average molecular weights of silica nanoparticles or PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated silica nanoparticles (Table 4). R_i values are derived from the plot of the Rayleigh ratio vs. silica concentration (Figure 3).

The number-average molecular weight of silica particles was estimated from their hydrodynamic sizes and their density (2.22 g.cm⁻³). Then, the weight-average molecular weight M_w was derived from the expression $pdi = M_w/M_n$ where pdi is the polydispersity of particles. This parameter can be deduced from the reduced second cumulant μ/Γ^2 obtained by DLS analysis of the particles according to the following equation:³⁸

$$\frac{\mu}{\Gamma^2} = pdi(pdi - 1)$$

In these conditions, we found that the weight-average molecular weight of bare and copolymer coated nanoparticles were 1.78×10⁷ g/mol. and 3.51×10⁷ g/mol, respectively, and that ~2300 chains were adsorbed onto the particles. A value of 2180 chains/particles was derived from the adsorption isotherm of PEO-*b*-PLL, hence showing a good agreement between the two approaches.

Table 4. Refractive index increment (dn/dc), optical constant (K) and molecular weight (M_w) of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ block copolymer, silica nanoparticles and PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated silica NPs in 10mM PB, pH 7.4

	dn/dc	K	M _w
	cm ³ /g	mol.cm ² /g ²	g/mol
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀	0.1122	9.10 10 ⁻⁸	7.55×10 ³
SiO ₂	0.0475	1.63 10 ⁻⁸	1.78×10 ⁷
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀ -SiO ₂	0.0511	1.88 10 ⁻⁸	3.51×10 ⁷

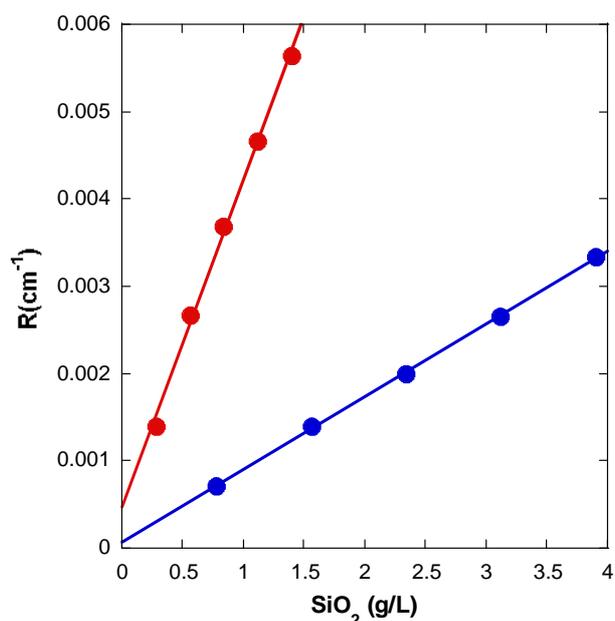


Figure 3. Rayleigh ratios of silica (○) and PEO₁₁₃-b-PLL₁₀ coated silica NPs (●) versus silica concentration in PB (7.4, 10 mM)

The influence of the concentration in sodium chloride (NaCl) on the adsorption of PEO₄₅-b-PLL₁₀ onto silica nanoparticles was studied at pH 7.4 (Figure 4). The existence of a maximum, here for $C_{\text{NaCl}} = 10^{-4}$ M, has been reported both experimentally³⁹⁻⁴⁶ and theoretically^{44, 47, 48}. Actually, this behavior arises from a combination of different effects. First, the surface charge density of oxide such as silica is known to increase with the ionic strength of the medium as both the screening effect of ions and the counterions binding to the silanolate groups favor the dissociation of silanols.^{45, 46, 49} The addition of salt also decreases the electrostatic volume of the PLL blocks and consequently increases the grafting density and the adsorbed mass of copolymer chains.

However, the addition of salt also screens the polyelectrolyte-surface attraction and therefore weakens the main driving force for the adsorption of PLL onto particle surface.⁵⁰ At some point this screening effect becomes predominant and causes a decrease of the adsorbed mass of copolymer (Figure 4).

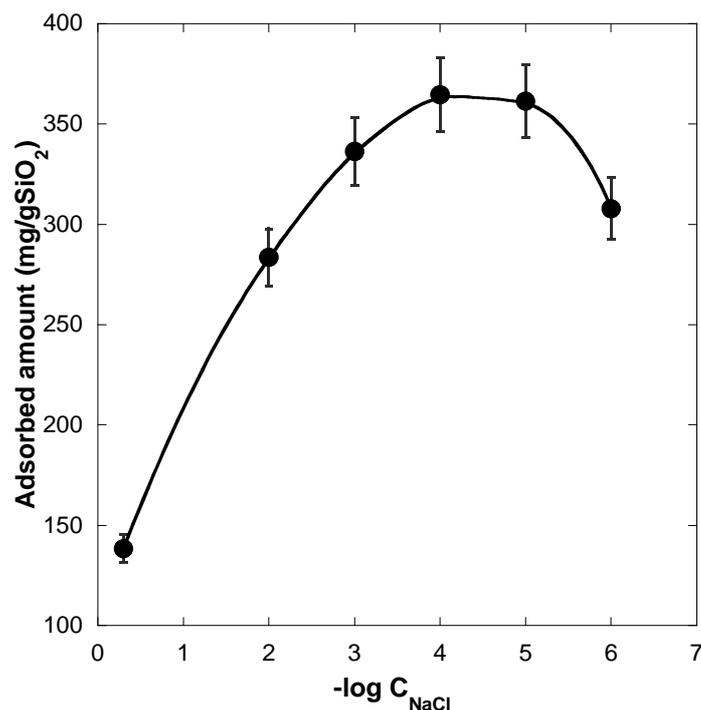


Figure 4. Maximal adsorbed amounts of PEO₄₅-b-PLL₁₀ on silica particles at pH 7.4 as a function of the concentration of added salt.

3.2 Conformation of the adsorbed PEO-b-PLL chains at the particle surface

The conformation of polymer chains adsorbed on a solid surface is important regarding their interaction with the surrounding medium, especially when the adhesion of proteins is a concern. To get an idea of the conformation of the adsorbed copolymer chains, the data obtained from adsorption isotherms have been considered in details. Considering the total surface of silica particles as a 2D hexagonal compact lattice as represented in Figure 5.a, the distance D between chain attachment points was calculated for all samples (Table 3). In the Alexander-de Gennes formalism, the conformation of the grafted chains and the thickness of the adlayer are dependent on the distance D and the coil size of the grafted block given by the Flory radius (R_F).¹⁶⁻¹⁹ In a good solvent, the Flory radius scales as $R_F \approx aN^{3/5}$, where N is the number of repeating units and a the monomer size, whose value is 0.358 nm for PEO.⁵¹ R_F values of 3.51 nm and 6.10 nm were calculated for PEO chains of 2000 g/mol (PEO₄₅) and 5000 g/mol (PEO₁₁₃) respectively. Then, the comparison between the distance D and the Flory radius of PEO chains in bulk solution allows us to estimate the conformation of the non adsorbing PEO blocks (Figure 5b). Three regimes can be identified. For low “grafting” density, the distance D is larger than the coil size R_F .

The chains do not interact laterally and adopt a “mushroom” conformation. On the contrary for high grafting density, this distance decreases and chains interact strongly. The overlap between chains forces them to stretch away from the surface resulting in a so-called “brush” conformation. In between these two regimes, when $R_F < D < 2R_F$, the polymer chains, still in mushroom conformation, start to interact. This regime is known as the “interacting mushroom”.^{16-19, 52-54}

The conformational assignments for various $\text{PEO}_n\text{-}b\text{-PLL}_m$ copolymers adsorbed on silica particles are summarized in Table 3. As expected the length of the PLL blocks determined the conformation of the PEO chains at the particle surface, the shorter PLL blocks giving rise to a high grafting density and a corresponding brush conformation whatever the length of the PEO block. In our study, the true mushroom regime was not reached even with the copolymer containing a PLL block of 270 residues. However, it is worth noting that all conformation regimes were evaluated from the maximal adsorbed concentration in copolymer at the particle surface. Lower copolymer grafting densities and corresponding conformation regimes should be obtained by adsorbing less copolymer at the particle surface.

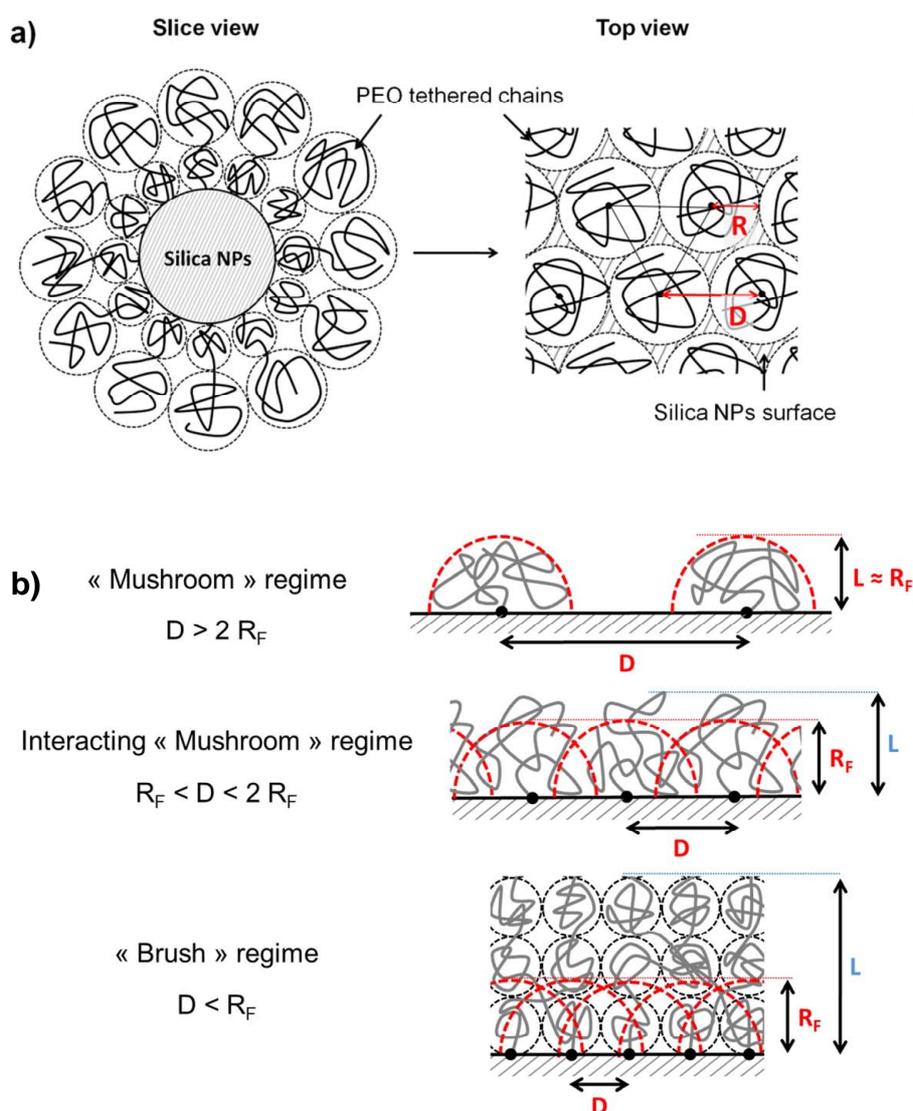


Figure 5. Schematic representation of the available area for a PEO chain tethered to the surface (a) and the two extreme conformations that PEO blocks may adopt under different grafting conditions (b)

The thickness of the adsorbed copolymer layer is an important parameter that was assessed by dynamic light scattering analysis considering the difference of hydrodynamic diameter before and after copolymer adsorption. At first sight, the quite high size-polydispersity of ludox nanoparticles (PDI = 0.20) might impede an accurate determination of this parameter. However, we found that the difference in thickness of the adsorbed layer of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ onto silica nanoparticles having a much lower size-distribution (PDI = 0.04) was negligible (see **Table 5**) and therefore all thicknesses were determined by DLS. Significant and reliable differences in size were obtained for copolymer coated nanoparticles, except for PEO₄₅-*b*-PLL₁₀ where a marked aggregation was observed (see below). In addition, copolymer coated nanoparticles have a size-polydispersity close to this of uncoated nanoparticles. Data were analyzed on the basis of the theoretical layer thickness derived for the mushroom and brush conformation regime.⁵⁵⁻⁵⁸ At low grafting density, in the mushroom regime, the layer thickness *L* is simply given by the Flory radius (Figure 5b). In the brush regime the chains interact and are forced to stretch due to mutual repulsion. On a flat surface, the chains can be described as a connected linear sequence of subunits with a size *D* containing *g_D* monomers (*g_D* = (*D/a*)^{5/3}), the overall thickness *L* of the brush being then given by *L*=*ND/g_D*.¹⁶ However, for a convex surface, the monomer density decreases with the distance to the surface. Birshtein *et al.* established that for a brush layer formed onto such surface, the end-to-end distance of chains scales as⁵⁹ :

$$L = aN^{\frac{3}{5}} \left(\frac{R}{D} \right)^{\frac{2}{5}}$$

with *R*, the radius of the convex surface.

Table 5. Hydrodynamic sizes of bare and PEO-*b*-PLL coated silica nanoparticles in PB (7.4, 10 mM)

	D _H	pdi	L _{experimental}	L _{theoretical}
	<i>nm</i>	-	<i>nm</i>	<i>nm</i>
Silica NPs	58	0.20	-	-
PEO ₄₅ - <i>b</i> -PLL ₁₀	860	0.36	aggregation	8.8 ^b
PEO ₄₅ - <i>b</i> -PLL ₃₇	75	0.19	8.5	7.3 ^b
PEO ₄₅ - <i>b</i> -PLL ₉₀	85	0.15	13.5	3.5 ^a
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀	97	0.19	19.5 (19) ^c	16 ^b
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₂₇₀	93	0.25	17.5	6.1 ^a

^a derived from the Flory radius of the PEO block (mushroom conformation)

^b derived from the Birshtein expression (brush conformation)

^c adsorption onto silica nanoparticles with D_H = 82 nm and PDI = 0.04 (see previous work²⁰)

By using the expression of the layer thickness in the brush regime, a good agreement was found between experimental and calculated thicknesses of PEO₄₅-*b*-PLL₃₇ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ confirming that the PEO blocks of these two copolymers extend from the surface with a brush conformation. For copolymers with larger PLL blocks, namely PEO₄₅-*b*-PLL₉₀ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀, the experimental values of the layer thicknesses did not fit with the Flory radius of the PEO blocks indicating that these copolymers did not adopt a true mushroom conformation. As stated before, they are more likely in an “interacting mushroom” conformation for which no simple analytical equation is known to estimate the corresponding layer thickness. The aggregation observed upon adsorption of PEO₄₅-*b*-PLL₁₀ was unexpected. This cannot be only due to the relatively short length of the PEO block as both PEO₄₅-*b*-PLL₃₇ and PEO₄₅-*b*-PLL₉₀ coated nanoparticles were found to be stable. In a same manner, it cannot be related to a difference in charge surface as all copolymer coated particles exhibit a slight positive zeta potential, which traduces a slight overcharging of the adsorbed PLL blocks (data not shown). Actually, PEO₄₅-*b*-PLL₁₀ has the lowest coverage ratio (46%) (Table 4) and therefore one may hypothesize that interparticle interactions mediated by PEO blocks at particle surface have occurred in the course of the adsorption process. Indeed, PEO is known to have a strong affinity with silica surface through hydrogen bonding with silanol groups.⁶⁰ Such aggregation did not occur with PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ despite a low coverage ratio (CR = 54%) as the PEO blocks are probably large enough to provide the system with steric stabilization during the overall adsorption process.

The salt stability of three sets of PEO-*b*-PLL coated particles was evaluated by determining the hydrodynamic radius of the copolymer coated particles at various concentrations of sodium chloride in the medium (Figure 6). The R_H/R_{H0} ratio where R_{H0} and R_H correspond to the hydrodynamic radii of the particles with and without added salt started to increase from $C_{NaCl} = 0.1$ M for PEO₄₅-*b*-PLL₃₇ and from $C_{NaCl}=0.15$ M for PEO₁₁₃ -based copolymers. A strong aggregation leading to a macrophase separation was noticed at $C_{NaCl} = 0.5$ M whatever the block copolymer composition. As all copolymer coated particles are almost electrically uncharged the decrease of the Debye length related to the increase in salt concentration should not modify the colloidal stabilization to a great extent. Actually, the overall trend may be explained by considering that the solvency properties of the PEO blocks decreased upon addition of salt.⁶¹⁻⁶³ The lower stability of PEO₄₅-*b*-PLL₃₇ coated particles has to be related to the relatively thin layer of PEO at the silica surface ($L = 8.5$ nm, see **Table 5**), which cannot provide the system with enough steric stabilization as the concentration in salt increased.

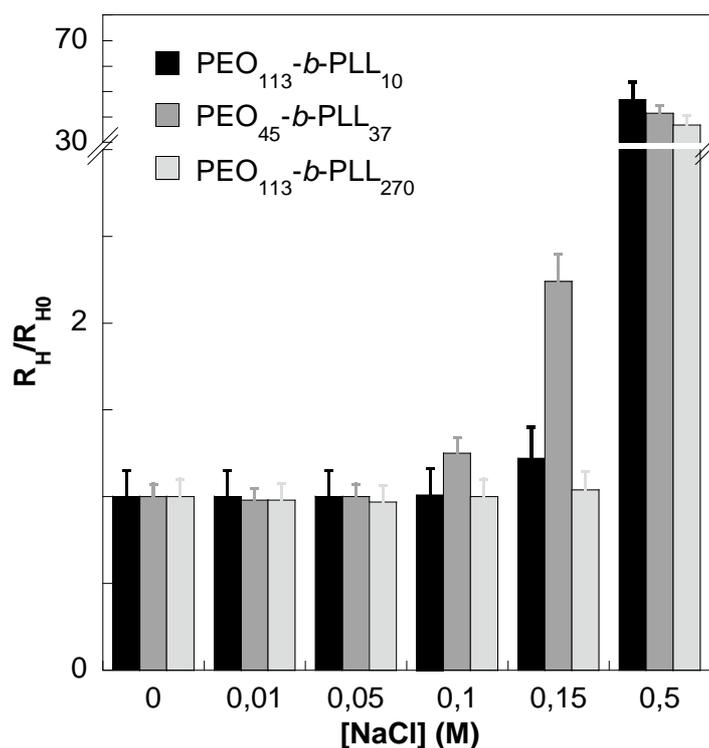


Figure 6. Salt stability (1 hrs, 25 °C) of PEO- *b*-PLL based block copolymers coated silica particles at in PB (7.4, 10 mM)

3.3 Protein adsorption onto PEO-*b*-PLL copolymer coated silica particles

The adhesion of proteins to PEO coated particles is known to be affected by both the grafting density and the layer thickness of PEO chains.^{64 65} Herein we have studied the interactions of a model protein, the bovine serum albumine (BSA) with three different PEO-*b*-PLL coated particles by using a combination of analytical techniques. Adsorption isotherms of BSA on copolymer coated particles allowed us to quantify the amount of adsorbed copolymer on PEO layers. DLS and microelectrophoresis measurements were used to characterize the colloidal stability of the particles in presence of BSA. Isothermal titration calorimetry (ITC) allowed us to quantify enthalpic interactions of BSA at the surface of the particles.

Adsorption isotherms of BSA onto various hybrid particles show three very different behaviors. (**Figure 7**) Almost no BSA adsorption occurs on PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated silica particles while for PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ the BSA adsorption is continuously increasing with the BSA equilibrium concentration. In between, PEO₄₅-*b*-PLL₃₇ coating gives rise to a Langmuir type adsorption isotherm where the adsorbed amount increases sharply prior to reach a plateau. Such a trend is in line with the adsorption of a monolayer of BSA around the hybrid particles.

DLS experiments evidence that the addition of BSA onto PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ coated particles completely aggregates the system whatever the BSA concentration (Figure 8). It is likely that the copolymer was partially desorbed upon addition of BSA. Indeed, it was reported that proteins may compete with surface attached polymer segments and replace them to some extent. In order to facilitate their binding to the surface.⁸ For PEO₄₅-*b*-PLL₃₇ coated particles a mechanism of aggregation/redispersion was observed by DLS when the added concentration of BSA in the medium was increased (Figure 8). The observed aggregation may be attributed to a bridging phenomenon as previously reported by Chern *et al.*⁶⁶ Indeed, authors proposed a mechanism explaining the formation of a network composing of PEO coated polystyrene particles connected each other by BSA dimers or oligomers. Once the particles become covered by BSA molecules, the aggregates are dissembled due to electrostatic repulsion induced by the negative charge carried by the protein. Here, such a mechanism is supported by the zeta potential (ξ) values of the system as the concentration of BSA increased. Initially, particles were almost uncharged ($\xi = + 3$ mV) and became negatively charged upon BSA addition ($\xi = -12$ mV). The very low amount of BSA adsorbed on PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated silica particles did not induce any aggregation of the particles. However, the negative zeta potential ($\xi = -9$ mV) of the particles in presence of BSA traduce that some BSA molecules were adsorbed at the particle surface leading to a small compression of the PEO brush. This may explain the slight but significant decrease in size experienced by the particles when the concentration of BSA was increased.

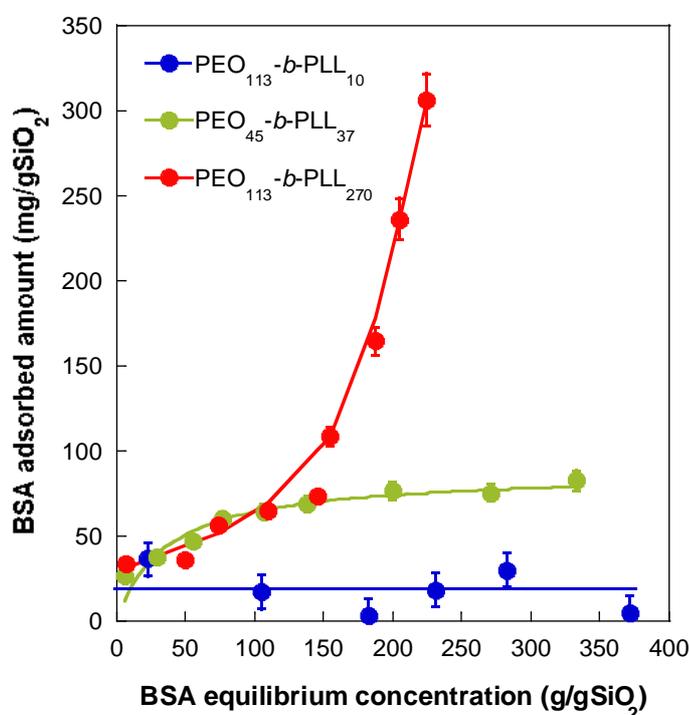


Figure 7. Adsorption isotherms of BSA onto PEO-*b*-PLL based block copolymers coated silica particles in PB at pH 7.4

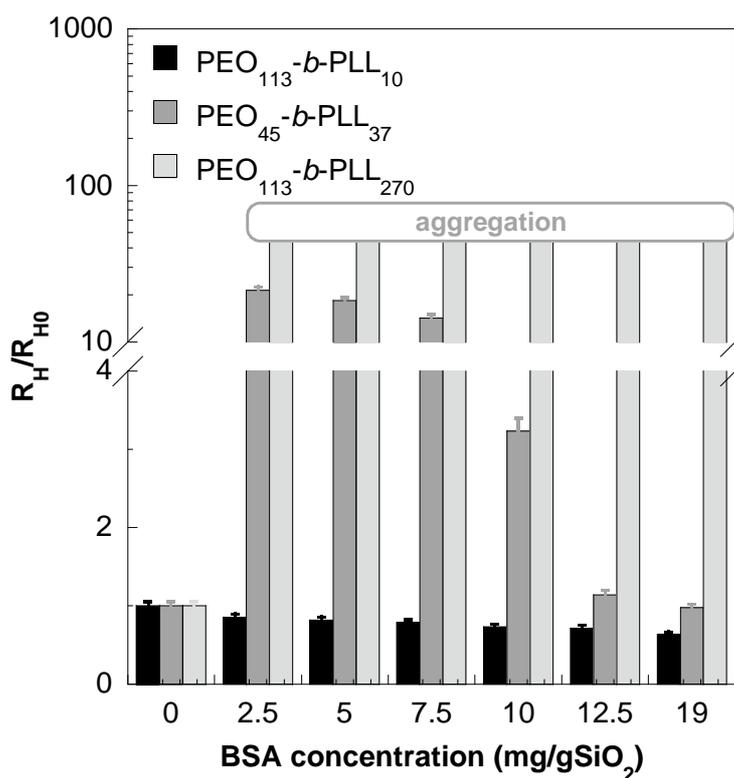


Figure 8. Normalized hydrodynamic radius of PEO-*b*-PLL based block copolymer coated silica particles as a function of the added BSA concentration in PB at pH 7.4

ITC experiments were carried out to characterize from a thermodynamical point of view the interactions of BSA molecules with PEO-*b*-PLL coated particles.⁶⁷ Thermograms of BSA titration onto PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated silica particles as well as integrated heat data for all samples are shown in Figure 9. As can be seen, all copolymer coated particles give rise to exothermic binding with BSA protein. From the integrated heat plots, binding enthalpies of -21.4, -39.7 and -50 kJ per mol of injected BSA were determined for PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀, PEO₄₅-*b*-PLL₃₇ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ copolymer layers. Different levels of surface saturation by BSA molecules were evidenced by ITC and are in good agreement with previous data obtained on adsorption isotherms. Indeed, Figure 9.b evidences that the surface of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated particles was fully saturated for a quite low amount of added BSA, confirming the brush-like conformation of the PEO blocks, whereas more BSA was adsorbed onto PEO₄₅-*b*-PLL₃₇ particles. Similarly to Figure 7, the surface of PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ coated particles cannot be fully saturated by BSA molecules in the conditions of the ITC experiment.

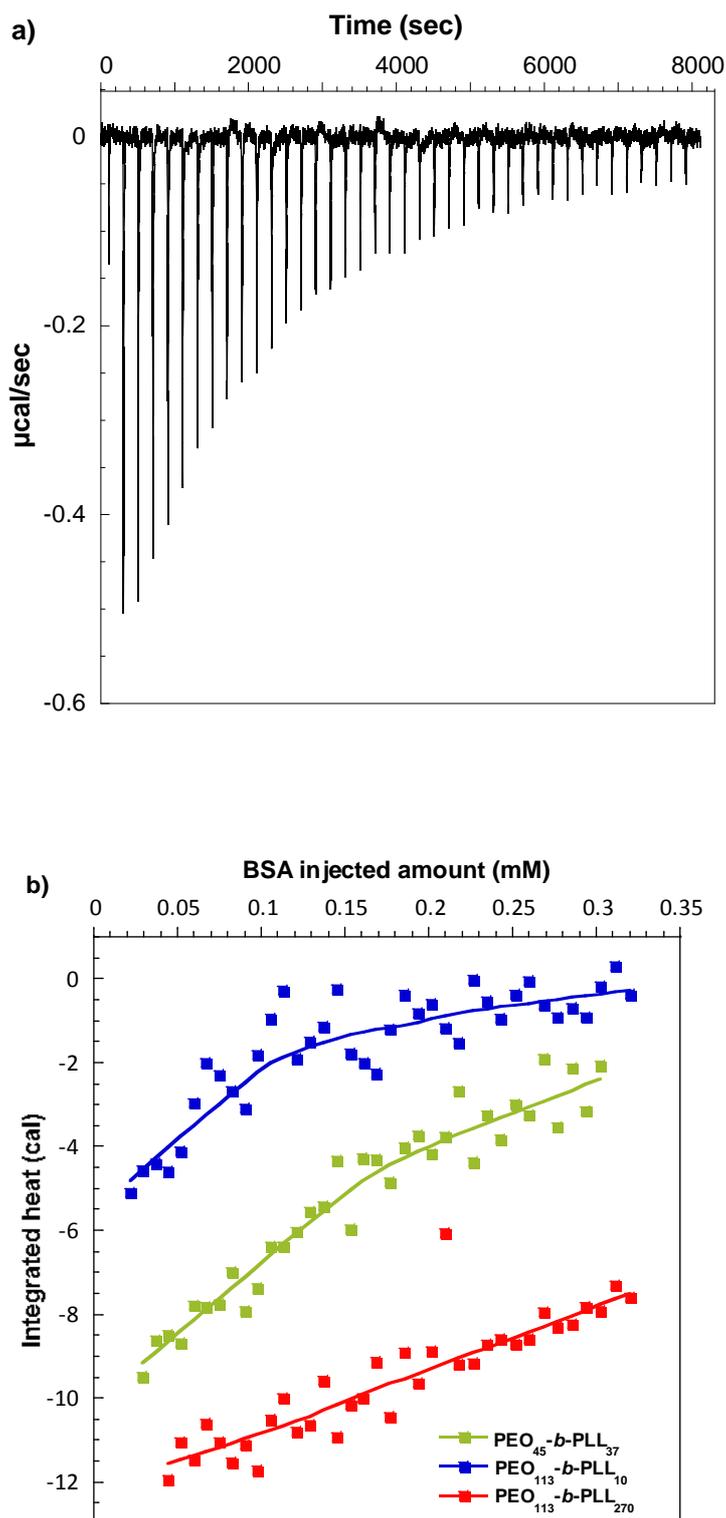


Figure 9. (a) Raw ITC data for titration of BSA onto $\text{PEO}_{113}\text{-}b\text{-PLL}_{10}$ coated silica particles, (b) Integrated heat data for PEO-b-PLL coated silica particles. All measurements were performed in PB (7.4, 10 mM)

The overall results give strong evidences that the three adsorbed copolymer systems display very different and specific behaviours in presence of BSA. PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ is definitely the best candidate for biological applications as its interactions with BSA can be considered as negligible. The brush like conformation of the PEO chains where the interchain distance is below 1.5 nm almost fully screens the diffusion of BSA molecules (the hydrodynamic radius of BSA is 2.8 nm⁶⁸) towards the particle surface⁶⁴. With PEO₄₅-*b*-PLL₃₇, the adsorption of BSA onto particles was significant. The reduced layer thickness compared to PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ as well as the lower grafting density probably explains the better affinity of BSA with this substrate. As no interaction between BSA and PEO was evidenced by ITC in bulk solution (see annexes, figure S2), BSA molecules probably interact with the particle surface through van der Waals interactions. Indeed, since the PEO thickness and the grafting density of PEO₄₅-*b*-PLL₃₇, are lower than for PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀, the PEO brush has a better compressibility allowing the particles to interact closer to the surface.⁶⁴ For PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀, the strong affinity of BSA has to be related to the very low grafting density of PEO blocks (0.04 chains/nm²) associated with an interchain distance of 5.5 nm, which approximately fits with the diameter of the protein. Hence, the mushroom conformation of the PEO blocks cannot efficiently shield the surface from the adsorption of BSA. Considering that 80 % of the particle surface is covered by adsorbed PLL segments (**Table 3**), the direct contact of BSA molecules with the silica surface is unlikely, which means that BSA mostly interacts with PLL segments in a first step. Because most of the lysine units are not complexed with SiO⁻ groups,⁶⁹ BSA that is negatively charged at pH 7.4 (isoelectric point of BSA = 4.8) may strongly interact with PLL blocks and possibly desorb them from the silica surface. This hypothesis has been ruled out in an independent experiment where micrometric silica particles were coated with rhodamine-labeled PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ copolymer. Fluorescence microscopy evidenced that the level of fluorescence of the particles was not modified upon addition of BSA (see annexes, figure S1) indicating that copolymer chains remained strongly anchored at particle surface even at high concentration of BSA. Actually, the infinite adsorption of BSA onto particles may be understood by considering that the strong interactions of the protein with adsorbed lysine units rapidly destabilized the particles, as shown by DLS analysis (Figure 8), leading to the formation of large flocs on which the protein could still adsorb in a multi-layer fashion. The formation of new colloidal complexes based on PEO-*b*-PLL and BSA molecules may explain the great adsorption of BSA evidenced on adsorption isotherms and by ITC.

Stability tests in fetal calf serum have confirmed the trend observed with BSA. After 24 hrs of incubation with 10%v/v fetal calf serum solution, only PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated particles remain stable. The hydrodynamic size before and after incubation were the same as well as the size-polydispersity. On the contrary, PEO₄₅-*b*-PLL₃₇ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ coated silica particles were instantaneously aggregated.

3.4 pH stability of PEO-b-PLL coated particles

One advantage of the PEGylation through the adsorption of copolymers lies with the fact that this non-covalent process is reversible upon experimental condition changes, which may find some interesting issues in biological applications. In the view of using these particles as drug delivery systems, one may question about their pH stability since pH values as low as 3-4 can be found in endosomal compartments. Therefore, we investigate the stability of our assemblies in various pH media as seen in Table 6. . Both the hydrodynamic sizes of the particles and the desorbed amounts of copolymer molecules were evaluated. At neutral pH, where the adsorption occurs, PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated silica particles remain stable at least over 1 month and no desorption occurs.

By decreasing the pH, PLL blocks are uncomplexed from the silica surface as a result of the protonation of the SiO⁻ groups. At pH around 3, almost all copolymer molecules desorbed from the surface, inducing a spontaneous aggregation of the particles, which are not sterically or electrostatically stabilized anymore. Such feature may be attractive in view of designing a pH responsive drug delivery system with specific endosomal drug release capabilities.

Table 6. Colloidal stability and copolymer desorption rates of PEO₁₁₅-*b*-PLL₁₀ coated silica at various pHs.

pH	-	3.2	5	7.4
Desorbed amount ^a	%	83	14	0
Dispersion State ^b	-	instantaneous aggregation	stable over weeks	stable over weeks

^a measured from the initial adsorbed amount determined at physiological pH

^b DLS measurement

4 Conclusion

The adsorption of PEO-*b*-PLL copolymer onto silica nanoparticles through electrostatic interactions of PLL blocks with SiO⁻ groups is a convenient approach to modulate the properties of the PEO layer at the particle surface. The block copolymer composition as well as the ionic strength of the adsorption medium offers a good control of the amount of adsorbed copolymer. As a matter of fact the grafting density of the PEO chains was related to the size of the PLL anchoring groups, small PLL blocks giving the highest grafting density of PEO chains. However, a better surface coverage was achieved with copolymers having a large PLL blocks as they generate less steric hindrance during the adsorption process. By varying the PLL length from 10 to 270 residues, brush or interacting mushroom conformations were obtained for tethered PEO chains at the particle surface. Interestingly, the size of the PEO block did not really influence the copolymer grafting density. The variation of the ionic strength in the adsorption medium put in light that a salt concentration of 10⁻⁴ M was optimal for obtaining the highest copolymer grafting density. Salt and protein stability studies led to similar conclusions about the effectiveness of a PEO layer with a dense brush conformation to prevent colloidal aggregation and protein adsorption. The overall study emphasizes that the physisorption of PEO-*b*-PLL copolymer is a reliable alternative to the covalent approach for grafting PEO chains at particle surfaces.

5 References

1. E. Österberg, K. Bergström, K. Holmberg, J. A. Riggs, J. M. Van Alstine, T. P. Schuman, N. L. Burns and J. M. Harris, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1993, **77**, 159-169.
2. S. L. McArthur, K. M. McLean, P. Kingshott, H. A. W. St John, R. C. Chatelier and H. J. Griesser, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2000, **17**, 37-48.
3. C. Perrino, S. Lee, S. W. Choi, A. Maruyama and N. D. Spencer, *Langmuir*, 2008, **24**, 8850-8856.
4. W. Feng, J. L. Brash and S. Zhu, *Biomaterials*, 2006, **27**, 847-855.
5. A. L. Lewis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2000, **18**, 261-275.
6. C. J. Nonckreman, S. Fleith, P. G. Rouxhet and C. C. Dupont-Gillain, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, **77**, 139-149.
7. K. Reimhult, K. Petersson and A. Krozer, *Langmuir*, 2008, **24**, 8695-8700.
8. E. Blomberg and P. M. Claesson, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 1998, **19**, 1107-1126.
9. W. Norde and D. Gage, *Langmuir*, 2004, **20**, 4162-4167.
10. J. H. Lee, J. Kopecek and J. D. Andrade, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1989, **23**, 351-368.
11. M. Ogris, S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis and E. Wagner, *Gene Ther.*, 1999, **6**, 595-605.
12. K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer and U. Schubert, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 6288-6308.
13. G. Storm, S. O. Belliot, T. Daemen and D. D. Lasic, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1995, **17**, 31-48.
14. M. Malmsten, K. Emoto and J. M. Van Alstine, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998, **202**, 507-517.
15. I. Szleifer, *Biophysical Journal*, 1997, **72**, 595-612.
16. S. Alexander, *J. Phys. - Paris*, 1977, **38**, 983-987.
17. S. Alexander, *J. Phys. - Paris*, 1977, **38**, 977-981.
18. P. G. De Gennes, *Macromolecules*, 1980, **13**, 1069-1075.
19. P. G. de Gennes, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1987, **27**, 189-209.
20. S. Louguet, A. Kumar, G. Sigaud, E. Duguet, S. Lecommandoux and C. Schatz, *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, **Submitted**.
21. W. Agut, A. BrÅ»let, D. Taton and S. Lecommandoux, *Langmuir*, 2007, **23**, 11526-11533.
22. W. Agut, D. Taton and S. Lecommandoux, *Macromolecules*, 2007, **40**, 5653-5661.
23. J. Rodriguez-Hernandez, M. Gatti and H.-A. Klok, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 249-258.
24. B. Carboni, A. Benalil and M. Vaultier, *The Journal of Organic Chemistry*, 1993, **58**, 3736-3741.
25. A. Harada, S. Cammas and K. Kataoka, *Macromolecules*, 1996, **29**, 6183-6188.
26. B. D. Gummow and G. A. F. Roberts, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics*, 1985, **186**, 1245-1253.
27. G. G. Maghami and G. A. F. Roberts, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics*, 1988, **189**, 2239-2243.
28. L. S. Mizoue and J. Tellinghuisen, *Analytical Biochemistry*, 2004, **326**, 125-127.
29. K. Chiad, S. H. Stelzig, R. Gropeanu, T. Weil, M. Klapper and K. Müllen, *Macromolecules*, 2009, **42**, 7545-7552.
30. N. D. Meeks, S. Rankin and D. Bhattacharyya, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2010, **49**, 4687-4693.
31. K. Babu and R. Dhamodharan, *Nanoscale Research Letters*, 2009, **4**, 1090-1102.
32. J. Marra, H. A. Ven des Schee, G. J. Fleer and J. Lyklema, in *Adsorption from solution*, eds. R. H. Ottewill, C. H. Tochester and A. L. Smith, Academic press, New York, 1983, p. 245.

33. T. Afshar-rad, A. I. Bailey, P. F. Luckham, W. Macnaughtan and D. Chapman, *Colloids Surf.*, 1987, **25**, 263-277.
34. K. Furusawa, M. Kaneshaka and S. Yamashita, *J. Colloid Interface Sci.*, 1984, **99**, 341-348.
35. B. C. Bonekamp, H. A. Vanderschee and J. Lyklema, *Croat. Chem. Acta*, 1983, **56**, 695-704.
36. L. Qi, A. Sehgal, J. C. Castaing, J. Fresnais, J. F. Berret and J. P. Chapel, *Redispersible Hybrid Nanopowders: Cerium Oxide Nanoparticle Complexes with Phosphonated-PEG Oligomers*, 2008.
37. A. Sehgal, Y. Lalatonne, J. F. Berret and M. Morvan, *Langmuir*, 2005, **21**, 9359-9364.
38. I. Varga, T. Gilányi, R. Mészáros, G. Filipcsei and M. Zrínyi, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001, **105**, 9071-9076.
39. N. G. Hoogeveen, M. A. C. Stuart and G. J. Fler, *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, **182**, 133-145.
40. G. Durand, F. Lafuma and R. Audebert, in *Trends in Colloid and Interface Science II*, ed. V. Degiorgio, Springer Berlin / Heidelberg, 1988, vol. 76, pp. 278-282.
41. B. Popping, A. Deratani, B. Sebille, N. Desbois, J. M. Lamarche and A. Foissy, *Colloids Surf.*, 1992, **64**, 125-133.
42. T. K. Wang and R. Audebert, *J. Colloid Interface Sci.*, 1988, **121**, 32-41.
43. J. Blaakmeer, M. R. Bohmer, M. A. C. Stuart and G. J. Fler, *Macromolecules*, 1990, **23**, 2301-2309.
44. N. G. Hoogeveen, M. A. C. Stuart and G. J. Fler, *Faraday Discussions*, 1994, **98**, 161-172.
45. S.-C. Liufu, H.-N. Xiao and Y.-P. Li, *J. Colloid Interface Sci.*, 2005, **285**, 33-40.
46. V. Shubin, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1997, **191**, 372-377.
47. H. G. M. Vandesteeg, M. A. C. Stuart, A. Dekeizer and B. H. Bijsterbosch, *Langmuir*, 1992, **8**, 2538-2546.
48. O. A. Evers, G. J. Fler, J. Scheutjens and J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.*, 1986, **111**, 446-454.
49. J. Sonnefeld, A. Gobel and W. Vogelsberger, *Colloid & Polymer Science*, 1995, **273**, 926-931.
50. J.-F. Liu, G. Min and W. A. Ducker, *Langmuir*, 2001, **17**, 4895-4903.
51. E. Raphael, P. Pincus and G. H. Fredrickson, *Macromolecules*, 1993, **26**, 1996-2006.
52. H. D. Bijsterbosch, M. A. Cohen Stuart and G. J. Fler, *Macromolecules*, 1998, **31**, 8981-8987.
53. P. Vermette and L. Meagher, *Colloids Surf., B*, 2003, **28**, 153-198.
54. G. J. Fler, M. A. Cohen Stuart, J. M. H. M. Scheutjens, T. Cosgrove and B. Vincent, Chapman & Hall Inc, London, 1993.
55. N. F. Steinmetz and M. Manchester, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 784-792.
56. V. B. Damodaran, C. J. Fee and K. C. Papat, *Applied Surface Science*, 2010, **256**, 4894-4901.
57. O. Garbuzenko, Y. Barenholz and A. Prievo, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2005, **135**, 117-129.
58. J. Thevenot, A. L. Troutier, L. David, T. Delair and C. Ladaviere, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 3651-3660.
59. T. M. Birshtein, O. V. Borisov, Y. B. Zhulina, A. R. Khokhlov and T. A. Yurasova, *Polym. Sci. USSR*, 1987, **29**, 1293-1300.
60. J. Rubio and J. A. Kitchener, *J. Colloid Interface Sci.*, 1976, **57**, 132-142.
61. E. A. Boucher and P. M. Hines, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 1976, **14**, 2241-2251.
62. M. B. Einarson and J. C. Berg, *Langmuir*, 1992, **8**, 2611-2615.
63. D. H. Napper, *J. Colloid Interface Sci.*, 1970, **33**, 384-392.
64. A. Halperin, *Langmuir*, 1999, **15**, 2525-2533.
65. S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade and P. G. Degennes, *J. Colloid Interface Sci.*, 1991, **142**, 149-158.
66. C. S. Chern, C. K. Lee, C. Kuan and K. C. Liu, *Colloid and Polymer Science*, 2005, **283**, 917-924.

67. S. Lindman, I. Lynch, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson and S. Linse, *Nano Letters*, 2007, **7**, 914-920.
68. M. Kozak, *Journal of Applied Crystallography*, 2005, **38**, 555-558.
69. H. M. Eckenrode and H. L. Dai, *Langmuir*, 2004, **20**, 9202-9209.

6 Annexes

6.1 Block copolymer desorption induced by proteins adsorption onto hybrid nanoparticles

Based on BSA/hybrid nanoparticles interactions studies, PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ coated surfaces appear to have distinct proteins repellency properties. PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ coated nanoparticles exhibit high affinity with BSA since with increasing BSA amount, BSA adsorbed amount increases almost linearly. This phenomenon is concomitant with a net nanoparticles aggregation. On the contrary, a constant rather low BSA adsorbed amount is observed in the case of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ coated surfaces and nanoparticles remain stable on the whole range of BSA concentrations.

To assess the possible polymers (PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀) desorption from silica nanoparticles surface in protein rich media, polymers were labeled with fluorescent probe prior to their adsorption onto 10- μ m silica particles. Epifluorescence microscopy was used to quantify the polymer desorption by comparing images of fluorescent hybrid nanoparticles prior and after their incubation in proteins rich media.

6.1.1 Polymers labeling and adsorption on silica nanoparticles:

PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ were labeled with rhodamine via a reaction between amine groups beard by the lysine side chains and N-hydroxysuccinimide ended fluorescent dye. The coupling produces stable amide linkage. PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ were dissolved in PB (7.4, 10mM) at 0.2 % w/w, respectively. To these solutions, 0.5 and 13.5 eq. of rhodamine-NHS stored in anhydrous DMSO were added in PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ solutions, respectively. Solutions were kept under mechanical stirring at room temperature for 12 hrs.

Fluorescent hybrid nanoparticles were prepared by mixing equal volumes of rhodaminelabeled polymer solutions and silica suspension (0.2 % w/w in PB). After 24 hrs of gentle stirring, suspensions were centrifuged (200 g, 1 min) and resuspended in PB to remove the excess of unadsorbed polymers.

6.1.2 Nanoparticles incubation in proteins rich media and epifluorescence microscopy.

Then, rhodamine-labeled NPs were mixed with an equal volume of fetal calf serum or BSA solution (0.24% w/w in PB). After 24 hrs, particles were centrifuged (200 g, 1 min) and resuspended in PB to remove proteins and desorbed polymer chains. Epifluorescence microscopy was then used to assess any change in the fluorescence intensity of the polymer shell upon proteins rich media incubation.

As seen on Figure. S1, similar fluorescence signals were measured prior and after proteins rich media incubation for both polymer systems. This seems to prove that upon proteins adsorption, either PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ nor PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ are displaced from silica surfaces.

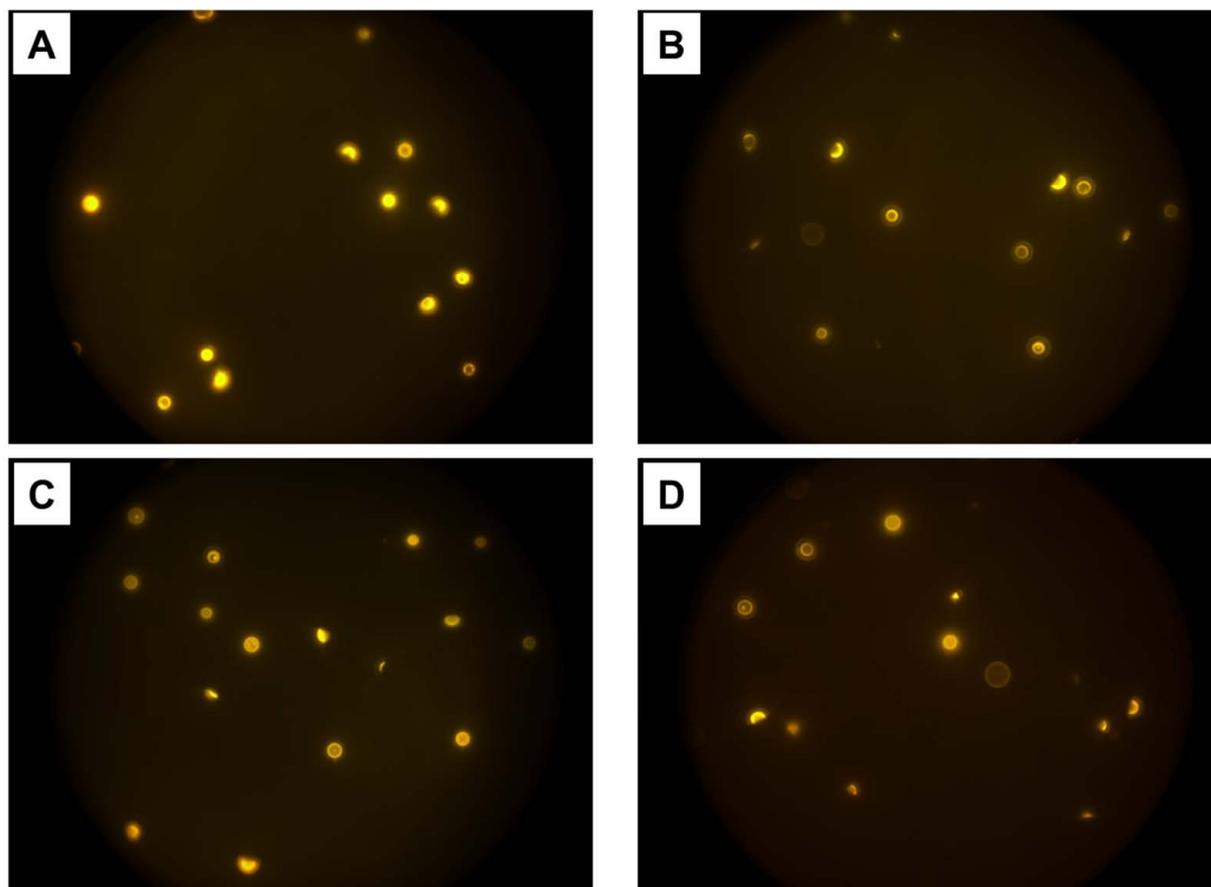


Figure. S1 – Epifluorescence images of respectively rhodamine-labeled PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀ coated 10 μ m silica beads incubated with buffer (A and B) or with BSA rich media (C and D).

6.2 ITC experiments

To assess the potential interaction between PEO chains and BSA molecules, ITC measurement has been carried out in similar condition as for hybrid nanoparticles. ITC cell and syringe were filled with PEO (0.05% w/w in PB) and BSA solution (1.5 mM in PB), respectively.

As seen in Figure. S2, any noticeable interaction has been detected by ITC, meaning that a weak or inexistent PEO-protein attraction.

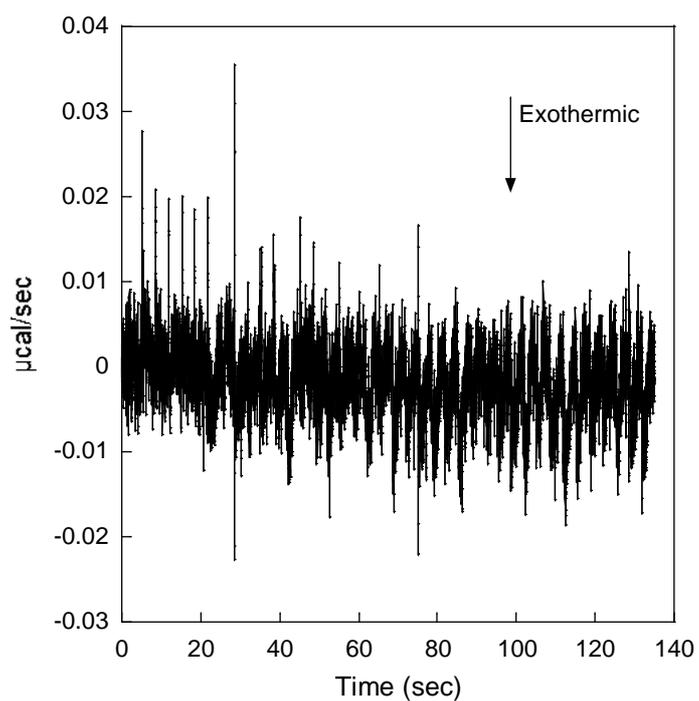
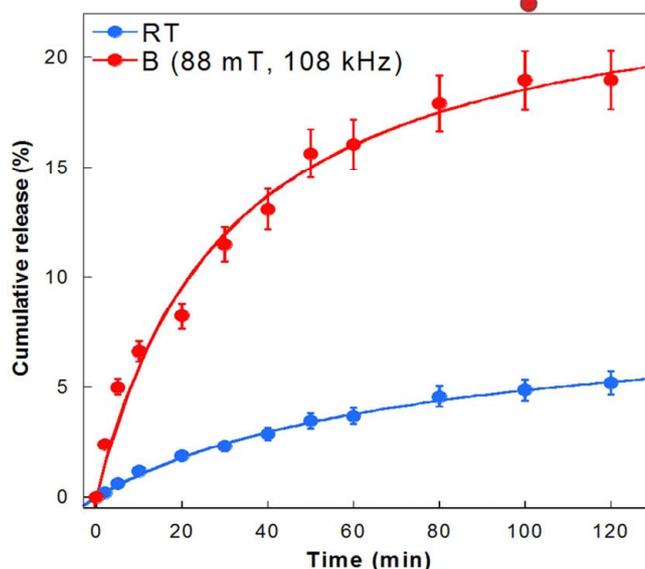
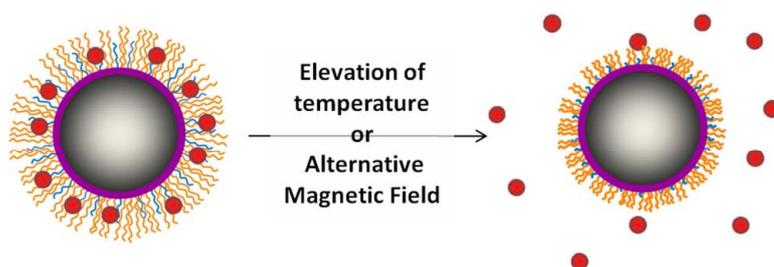


Figure. S2 –ITC data for titration of BSA onto PEO in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4

Chapitre IV. Controlled drug release at nanoparticle surface through synergistic effects of thermoresponsive polymer brushes and magnetically induced heat



Dans les chapitres précédents nous avons montré que l'adsorption d'un copolymère à blocs double hydrophile, le poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(L-Lysine) (PEO-*b*-PLL) sur des particules de silice modèle dans un milieu tamponné (pH 7.4, 10 mM) donnait lieu à des systèmes colloïdaux dits hybrides, de taille contrôlée, de charge nulle, stables en milieu salin et en présence de sérum fœtal de veau. La conformation des chaînes adsorbées est la suivante : le bloc cationique PLL est adsorbé à la surface des particules de silice via des interactions électrostatiques et le bloc polyéther PEO est libre en solution assurant la stabilisation stérique des particules.

Le cœur magnétique que nous avons utilisé dans ce projet de thèse est un oxyde de manganèse, de type perovskite et de composition $\text{La}_{0.82}\text{Sr}_{0.18}\text{MnO}_3$ capable de produire de la chaleur sous l'effet d'un champ magnétique alternatif (hyperthermie magnétique). Pour permettre l'adsorption de copolymères à blocs neutre-charge à pH physiologique, ces nanoparticules ont été enrobées d'une couche de silice d'épaisseur contrôlée.

Dans cette partie nous nous sommes intéressés en premier lieu à l'adsorption de copolymères à blocs PEO-*b*-PLL sur les particules magnétiques/silice afin de vérifier que le mécanisme d'adsorption mis en évidence sur des particules modèles de silice était conservé.

Ensuite, nous avons étudié la thermosensibilité de la couronne polymère formée ainsi que sa possible modulation en fonction de la composition chimique du copolymère. En effet, d'après la littérature la thermosensibilité d'une chaîne polymère est contrôlée par sa balance hydrophile/hydrophobe. De nombreuses études ont montré que l'introduction de groupements hydrophobes sur une chaîne thermosensible abaissait sa température critique, et inversement dans le cas de l'introduction de groupements hydrophiles. Nous nous sommes inspirés des ces travaux et avons étudié l'effet de la co-adsorption de polymères de type polyéther-*b*-PLL avec des bloc polyéther à LCST variables.

L'adsorption de copolymères à blocs de type PEO-*b*-PLL fournissant un volume pour la solubilisation de petites molécules, nous nous sommes intéressés à l'encapsulation de la doxorubicine dans cette couronne et à sa libération sous l'effet d'une élévation de la température induite par hyperthermie magnétique.

1 Introduction

Over the past decade considerable interest has been devoted to the development of a variety of nanoparticle-based drug delivery systems as nanomedicine. These include polymer drug conjugates, dendrimers, liposomes, polymeric micelles, polymersomes and systems based on inorganic components.¹ To enhance the bioavailability of biologically active compounds that may be loaded in these systems, smart design is of particular interest and stimuli-responsive polymers have appeared to be materials of choice.²⁻⁵ Indeed they exhibit a sharp change in properties upon a small change in environmental conditions and material responses may be manifold, e.g. dissolution/precipitation, degradation, change in hydration state, swelling/collapse and chemical structural change. However, for medical purposes, stimuli-responsive polymers have to show their response properties within the setting of physiological conditions. For instance, thermosensitive polymers have to respond within a small range of temperature, *i.e.* between 37 °C (normal human body temperature) and 43°C (from which temperature-damaging of healthy tissues appears).⁶

A large number of drug release strategies have been proposed and may be classified according to the nature of the stimulus used to trigger the process. Indeed, it may be based on the variations of physiological parameters, as it is the case with pH-, glucose-, enzyme-, or redox-thiol-responsive materials which alter their conformation and assembly properties in response to the concentration of the corresponding species. Other promising strategies are based on the use of external stimuli such as electromagnetic field, light and ultrasound that have the ability to be remotely switched on and switched off as desired and can induce a local temperature increase. This heat might be used either in hyperthermia treatment and thermal ablation¹³, or as a stimulus promoting the structural change of an associated thermosensitive material thus inducing the release of entrapped molecules. This last strategy is promising since it overcomes the main limitation of temperature-sensitive materials response due to the issue of heat transfer.

In this context, recent relevant studies took advantage of potential drug carriers based on thermoresponsive polymer materials that exhibit a LCST (Lower Critical Solution Temperature)^{7, 8} in the right temperature range, and magnetic nanoparticles (MNPs) that are capable to increase locally the temperature.⁹⁻¹² Indeed, among the various interesting properties of MNPs for medical and biological applications, *e.g.* contrast agent for magnetic resonance imaging or drug guidance (when submitted to an external magnetic field gradient created by a strong permanent magnet), their capacity to generate heat when an *ac* magnetic fields (AMF) is applied is of particular interest.^{13, 14} Thus, the incorporation of MNPs in thermosensitive materials, also known as magnetothermally-responsive materials, is promising in cancer treatment since the remote application of AMF may trigger the release of drugs, by inducing a macromolecular conformational change when an open pore structure and the subsequent escape of drug molecules.¹⁵⁻¹⁸

Iron oxide MNPs, *i.e.* magnetite (Fe_3O_4) or maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) particles, have been widely developed for biomedical applications, thanks to their inherent biocompatibility and easy synthesis as stable aqueous dispersions.^{19, 20} However, a main drawback of their use as heat inductor in AMF is the control of the temperature increase *in vivo*. Indeed, as long as the magnetic field is applied, the MNPs are producing heat, but not in a controlled manner, because the heat conduction and energy absorption of living tissues remain badly understood. Thus, there is a major risk of local overheating that can cause irreversible damaging of healthy tissues. A first way to overcome this problem consists in monitoring the temperature *in vivo* by the means of an invasive thermometry²¹. Another possibility is to take advantage of the temperature dependence of magnetic properties of MNPs.¹³ Among those whose Curie temperature (T_C) may be tuned in the body temperature range, $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{LaMnO}_3$ lanthanum strontium manganese oxide (LSMO) MNPs are of particular interest.²² Indeed their T_C may be adjusted in the range $-120/+100^\circ\text{C}$ by playing with lanthanum substitution for strontium. Because their heating mechanism is based on hysteresis losses, LSMO MNPs stop to heat as soon as the temperature reaches T_C and make this temperature constant as long as AMF is being applied. To prevent toxic effects due to a potential desorption of La, Sr or Mn cations, and to provide surface charges at neutral pH, LSMO MNPs are generally surface coated with a silica shell, shifting the isoelectric point (IEP) from pH 6.5 to 3, and therefore making the LSMO@silica MNPs negatively charged and electrostatically stabilized in physiological conditions.

This paper reports the preparation, extensive physico-chemical characterization and preliminary evaluation as possible smart devices for controlled drug release, of LSMO MNPs coated with thermosensitive block-copolymers (BCP) such as poly(ethylene oxide)-*b*-poly(L-lysine) $\text{PEO}_m\text{-}b\text{-PLL}_n$, whose thermal response was controlled by the co-adsorption of poly(ethylene oxide-co-propylene oxide)-*b*-poly(L-lysine) $\text{P}(\text{EO}_x\text{-}co\text{-PO}_y)\text{-}b\text{-PLL}_n$, since the polyether blocks exhibit variable LCST values depending on the propylene oxide/ethylene oxide molar ratio (Figure 1). The different steps of assemblies preparation are summarized in Figure 2. Doxorubicin (DOX) was used as a model anti-cancer drug because of its high therapeutic index and therapeutic activity on solid tumors.²³ The study of the modulation of the thermal response of the polymer corona, as well as the drug loading and the controlled release capacity evaluation, was performed using up-to-date techniques, *e.g.* dynamic light scattering (DLS), electrophoretic mobility measurement, transmission electron microscopy (TEM), differential refractive index analysis and UV-Visible and fluorescence spectroscopy.

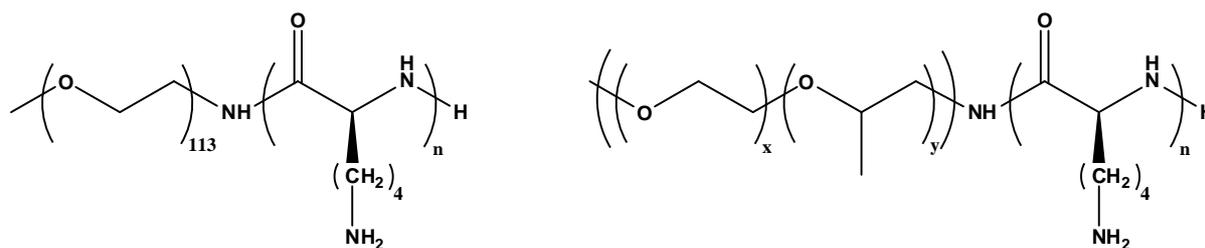


Figure 1. Structure of the repeat units of PEO₁₁₃-b-PLL_n and P(EO_x-co-PO_y)-b-PLL_n copolymers.

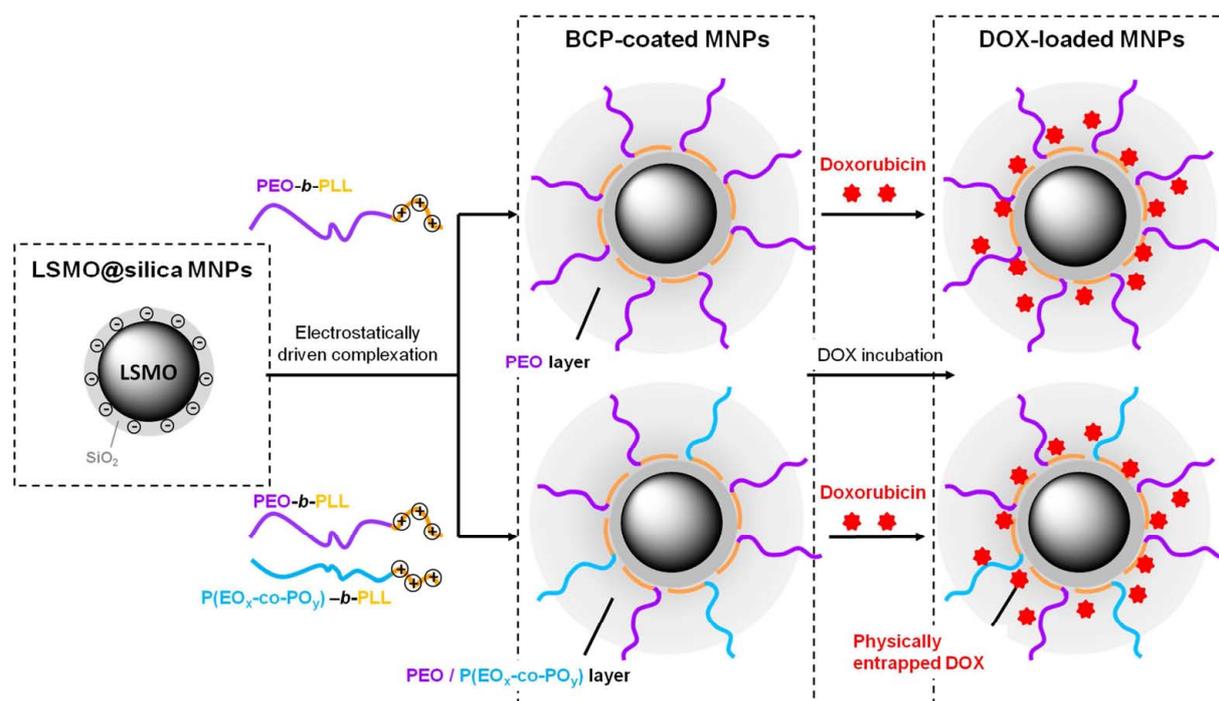


Figure 2. Scheme of the preparation of multifunctional MNPs used in this study.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Dimethylformamide (DMF, Scharlau, 99.9%) was dried over molecular sieves (3 and 4 Å) and cryodistilled prior to use. Amino-terminated random copolymers of ethylene oxide and propylene oxide Jeffamine[®] M-2005 (\overline{M}_w 2000 g/mol; pdi 1.076) and Jeffamine[®] M-2070 (\overline{M}_w 2000 g/mol; pdi 1.08) (Huntsman, +95%) named P(EO₆-co-PO₂₉)-NH₂ and P(EO₃₁-co-PO₁₀)-NH₂, respectively, were dried under vacuum at 40°C overnight. Amino-terminated PEO (\overline{M}_n 5000 g/mol) purchased from Rapp polymere and named PEO₁₁₃-NH₂ was dissolved in dioxane and lyophilized to remove water traces. ε-trifluoroacetyl L-lysine *N*-carboxyanhydride (TFA-Lys NCA) (Isochem,+96%) and 4-(4-hydroxy-1-naphthylazo)benzenesulfonic acid (Orange II) (Aldrich) were used as received. Doxorubicin hydrochloride was supplied by Discovery Fine Chemicals (Wimborne, UK). DOX was reconstituted in anhydrous DMSO, stored at 5°C and used within 1 month. LSMO@silica MNPs were prepared according to a previously reported protocol based on the Glycine Nitrate Process (GNP) and a subsequent silica encapsulation stage²⁴. They were obtained as an aqueous dispersion with a concentration of 5.6 g_{LSMO}/L. The chemical composition of the LSMO cores was La_{0.82}Sr_{0.18}MnO₃ and their mean diameter was 54 nm. The silica coating thickness was estimated to be 5 nm. The determination of their T_C according to the Arrott plots method led to a value of 315 K (42 °C). The full description of the synthesis protocol may be found in the Electronic Supplementary Information section.

2.2 PLL-based block-copolymers synthesis and characterization

Detailed description of the synthetic protocols of PEO₁₁₃-*b*-PLL_{*n*} and P(EO_{*x*}-co-PO_{*y*})-*b*-PLL_{*n*} copolymers (Figure 1) as well as characterization procedures may be found in literature.^{25, 26} Briefly, the diblock-copolymers were synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of TFA L-Lys NCA initiated by the amino end-functionalized macroinitiators.

The degree of polymerization *n* of the poly(TFA L-lysine) segments within the block-copolymers was determined from the molar ratio of TFA lysine and ethylene glycol units obtained by ¹H NMR analysis (Brücker AC 400 spectrometer) in deuterated DMSO (see Electronic Supplementary Information section for further details).

Number-average molecular masses \overline{M}_n and polydispersity index (pdi = $\overline{M}_w / \overline{M}_n$) were determined by size-exclusion chromatography performed in DMF with LiBr (1 g/L) as eluent (0.8 mL/min) at 60°C using a Waters apparatus (Alliance GPCV2000) equipped with a refractometric detector and two PL-gel 5-μm Mixed-C columns, using a polystyrene standards calibration.

The removal of labile TFA protecting groups from PLL monomer units was achieved by treatment with KOH (1.5 equiv.) in THF at room temperature (RT) for 24 hrs. THF was removed using a rotary evaporator and the product was precipitated in cold diethyl ether and finally dried overnight under dynamic vacuum.

Potentiometric and conductimetric titrations were conducted to accurately determine the ionization degree of the polycation moieties. A desired mass of polymer was dissolved in aqueous NaCl solution (5 mM). The pH of the suspension was adjusted below 5 with hydrochloride acid (0.1 M). Titration was carried out using volumetric NaOH standard (0.1 M). To avoid diffusion of the salts contained in pH electrode that might interfere with the conductivity measurements, each suspension was divided into two equal volumes and pH and conductivity measurements were read independently from both solutions. An equilibration delay of 4 min was applied between each base addition and pH or conductivity measurement (see Electronic Supplementary Information section for further details). The lysine length was calculated from the conductivity vs. added NaOH amount knowing the polymer amounts dissolved and the molarity of the base used.

The chemical compositions as determined by both methods were in good agreement (

Table 1). It is worth noting that those block-copolymers cannot be directly solubilized in 10 mM phosphate buffer (PB) or 25 mM Tris buffer at pH 7.4 because of remaining traces of KOH. Therefore, the polymer powders were dispersed in buffer and after overnight stirring the pH was adjusted to 7.4 with 1 M HCl solution.

Table 1. Chemical composition of PEO_m-*b*-PLL_n and P(EO_x-*co*-PO_y)-*b*-PLL_n copolymers prepared and used in this study (see Electronic Supplementary Information section for further details).

	n ^a	n ^b	pdi	\overline{M}_n
	-	-	-	<i>g/mol</i>
P(EO ₃₁ - <i>co</i> -PO ₁₀)- <i>b</i> -PLL _n	13	13	1.27	3640
P(EO ₆ - <i>co</i> -PO ₂₉)- <i>b</i> -PLL _n	10	9.8	1.26	3251
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL _n	10	9.7	1.09	6290

^a determined from ¹H NMR spectroscopy in d₆-DMSO;

^b determined from conductivity measurements.

2.3 Block-copolymer adsorption

The adsorption isotherms of BCPs on LSMO@silica MNPs (2.8 g/L) were determined in 10 mM phosphate buffer (PB) (pH 7.4). To 700 μL of copolymer varying in concentration in PB, 700 μL of MNPs suspension at 5.6 g/L were quickly added.

After 24-hrs stirring at RT, the dispersions were centrifuged (11092 g, 30 min, 10°C) and the supernatant containing free (*i.e.* unadsorbed) BCP macromolecules was removed and spectrophotometrically titrated using an anionic dye, the Orange II^{27, 28}. A 10⁻⁴ M solution of the dye was prepared from a 1.7 10⁻² M aqueous solution of acetic acid. The calibration curve was established by mixing 200 µL of BCP at different concentration (from 0 to 125 mg/L) with 1300 µL of dye solution (See Electronic Supporting Information section). After 24 hrs stirring, the absorbance of the solution was measured at $\lambda = 485$ nm using a Molecular Devices UV-visible spectrophotometer. The concentration of free macromolecules in the supernatants was obtained with the same protocol using the calibration curve. The quite high concentration of acetic acid in the dye solution was supposed to ensure a complete protonation of lysine residues.

Dynamic Light Scattering (DLS) experiments were performed using an ALV laser goniometer, which consisted of a 35 mW HeNe linear polarized laser with a wavelength of 632.8 nm and an ALV-5000/EPP Multiple Tau digital correlator with 125 ns initial sampling time. Samples were kept at constant temperature (25°C) during all the experiments. The accessible scattering angles range was from 40° to 140°. One milliliter of the suspension of BCP-coated MNPs (0.28 g/L in PB) was immersed in a filtered toluene bath and dilutions were directly performed in the 10-mm diameter cylindrical glass cells. The data acquisition was done with the ALV-Correlator Control software, and the counting time was fixed for each sample at 120 s. For thermosensitivity study, the hydrodynamic size of BCP-coated MNPs was determined by DLS measurement using a Malvern ZetaSizer Nano ZS instrument with 90° scattering measurements. Data were recorded from 25°C to 65°C with step of 2°. An equilibration delay was set to 10 min for each temperature. In both experiment types, the mean hydrodynamic diameters and their distributions were determined using the cumulant analysis method.²⁹

The electrophoretic mobilities of bare and BCP-coated MNPs (0.28 g/L) with and without DOX were measured using a Malvern ZetaSizer Nano ZS instrument. The electrophoretic mobility (μ) was converted to the zeta potential (ζ) using the Smoluchowski approximation. Each measurement was the average of at least five runs performed at 25°C.

Transmission Electron Microscopy (TEM) images were obtained using a Hitachi H7650 microscope working at 80 kV and equipped with a GATAN Orius 10.5 megapixel camera. For samples preparation, one droplet of the dispersion of BCP-coated MNPs (2.8 g/L) was deposited on a copper grid (200 mesh) coated with carbon film. After 1 min, excess liquid was blotted away with piece of filter paper and grids were allowed to dry at RT.

The differential refractive index increments dn/dc of (PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀)-coated MNPs in PB were measured at 25 and 50°C over a concentration range of 0.8–4 mg/mL by means of a differential refractometer (Wyatt Optilab rEX) operating at a wavelength of 658 nm.

Fluorescence spectroscopy using pyrene as probe was used for monitoring the polymer shell dehydration with temperature. Pyrene is slightly soluble in water, up to 6.6 10⁻⁷ M, and have a high partition coefficient (logP = 5.15).

To 3 mL of the suspension of BCP-coated MNPs (0.15 g/L in PB), 18 μ L of pyrene dissolved in ethanol (10^{-4} M) were added and gently stirred overnight. Fluorescence spectra of pyrene were obtained using a spectrofluorometer (Perkin Elmer LS-50B) at the excitation and emission wavelengths of 339 and 390 nm, respectively. The temperature was controlled by a ThermoHaake DC50 thermostat and was increased from 10 to 70°C with step of 10°. An equilibration delay of 15 min was applied before any measurement. Emission and excitation slits were adjusted for each sample and kept constant all along the experiment.

2.4 Doxorubicin loading

All the experiments with DOX were done in Tris buffer (pH 7.4, 25 mM) since DOX form aggregates in PB (pH 7.4, 10 mM) (See Electronic Supporting Information section for further details). Drug loading was achieved by incubating DOX with BCP-coated MNPs (1.15 g/L), *i.e.* simple equivolume mixing with DOX under mechanical stirring overnight at various feed weight ratios (FWR) and temperatures. In the following, the DOX-loaded BCP-coated MNPs will be named DOX-loaded MNPs. In a typical experiment, copolymers were directly dissolved in Tris buffer (6 g/L). After overnight stirring, pH was adjusted to 7.4 with 1 M HCl solution. Then, 2.25 mL of LSMO@silica MNPs dispersion (5.6 g/L) was quickly added to 2.25 mL of copolymer solution. After gentle stirring overnight, 4.5 mL of DOX solution in Tris buffer (pH 7.4, 25 mM), prepared from a DOX stock solution in DMSO at 50 g/L, were added to the preformed BCP-coated MNPs. The mass of copolymer, the initial DOX concentration, the incubation time and temperature were varied. The DOX payload was determined as follows: free DOX was separated from DOX-loaded MNPs by centrifugation (11092 g, 30 min, 10°C) and quantified using a calibration curve of DOX in Tris buffer (DOX amount ranging from 0 to 90 μ g/mL, see Electronic Supporting Information section for further details). All samples were subjected to UV analysis at $\lambda_{\text{max}} = 485$ nm, despite the excess of unadsorbed polymer also contained in supernatant (at this wavelength it did not absorb). The severe centrifugation conditions did not allow to collect unaggregated DOX-loaded MNPs. Thus, the purification of DOX-loaded MNPs from excess of drug and unadsorbed polymer was achieved by dialysis step against Tris buffer (5 L; pH 7.4; 25 mM; 4 times a day for 2 days). Control experiments showed the complete removal of free DOX. DOX-loaded MNPs concentration after dialysis was roughly 1.04 mg/mL.

Each loading experiment was carried out in triplicate and average values were compared. The initial amount of DOX was expressed as FWR relatively to the mass of BCP-coated MNPs.

Quantification of DOX loading was given through the loading efficiency (LE) and the loading content (LC). These features were calculated according to the following equations:

$$FWR(\%) = \frac{w_2}{w_3} \times 100$$

$$LE(\%) = \frac{w_1}{w_2} \times 100$$

$$LC(\%) = \frac{w_1}{w_1 + w_3} \times 100$$

where w_1 is the amount of entrapped DOX in BCP-coated MNPs, and w_2 and w_3 are the amount of drug and of BCP-coated MNPs in the initial dispersion, respectively.

2.5 Drug release studies

The release kinetics were assessed by placing a dialysis bag (Spectra/Por Float-A-Lyzer, dialysis tubes; MWCO 20,000 g/mol; diameter 10 mm; volume 10 mL) containing 2.5 mL of the DOX-loaded MNPs into a beaker filled with 100 mL of Tris buffer (pH 7.4, 25 mM). The whole assemblies were kept at two different temperatures (20 and 43°C) and the measurement was done in the outside medium. For DOX release experiment under AMF, the beaker was placed in the center of a coil connected to a generator (Celes inductor C97104) with a magnetic field amplitude of 88 mT and frequency of 108 kHz.³⁰ At predetermined time intervals, 1 mL of the release medium was withdrawn and replaced with an equal volume of fresh medium, allowing sink conditions. The DOX concentration in the dialysate was measured by fluorescence spectroscopy (at 590 nm upon excitation at 485 nm) using a calibration curve of DOX established from 0 to 7 µg/mL (see Electronic Supplementary Information section for further details). The cumulative release profile was expressed as a plot of cumulative drug release as a function of time.

3 Results and discussion

3.1 Block-copolymer adsorption onto LSMO@silica MNPs

We report here a robust and versatile method to functionalize LSMO@silica MNPs by adsorption of double hydrophilic copolymers (PEO-*b*-PLL and poly(EO_x-*co*-PO_y)-*b*-poly(LL)). From previously reported studies,³¹ a careful investigation of the adsorption conditions by dynamic light scattering, adsorption isotherms, isothermal titration calorimetry and small angle neutron scattering, allowed a complete understanding of the behavior of this copolymer at the interface silica/water and the determination of an experimental window where PLL blocks were completely adsorbed on silica surface and PEO chains freely protruding in solution.

With an isoelectric point around pH 3, the surface of the silica shell is negatively charged in physiological conditions. Moreover, PLL blocks are weak polyelectrolytes whose amine groups become increasingly protonated when decreasing the pH. Thus, at physiological pH value, the adsorption of block-copolymers (BCP) was mostly governed by electrostatic complexation between positively-charged PLL chains and negatively-charged LSMO@silica MNPs, making PEO and poly(EO_x-*co*-PO_y) blocks efficient agents for steric stabilization. The resulting PEO-coated MNPs were neutral ($\zeta \approx 5 \pm 4$ mV) and well-dispersed with a narrow size distribution (pdi < 0.1), as illustrated by the DLS distribution and TEM pictures shown in Figure 3. The adsorption isotherm of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ onto LSMO@Silica MNPs gave rise to a typical Langmuir adsorption isotherm with a plateau value of 150 mg/g particle (Figure 4). As previously reported³¹, the determination of the maximal adsorbed amount allowed the quantification of the resulting adlayer features, *i.e.* the grafting density, the distance between tethered chains as well as the layer thickness. Briefly, the specific surface area of the LSMO@Silica MNPs was calculated from the diameter value measured by TEM (54 nm). Hence, a high grafting density was calculated (0.84 chains/nm²) and the distance between two PEO chains at the interface was estimated to 1.3 nm, this value being smaller than the size of PEO chains in coil conformation, *i.e.* 6.11 nm (See Electronic Supporting Information section for further details). Thus, according to the Alexander-De Gennes formalism³²⁻³⁵, the PEO tethered chains were assumed to be in brush conformation, whose thickness was roughly 20 nm³⁶. Due to the dense packed corona, PEO chains were significantly stretched as compared to their coil size in bulk. Similar elongation was reported with PEO chains grafted onto carboxy-modified hydrophilic Sephadex[®] derivatives and with Pluronic[®] (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO)-coated polystyrene latex nanoparticles.^{37, 38} DLS measurements supported the expected diameter increase, as depicted in Table 2. Upon adsorption of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀, the hydrodynamic diameter increased of about 30 nm while the distribution in size remained narrow (Figure 3a). Based on the theoretical layer thickness, this difference in diameter was lower than expected (40 nm) and might result from two approximations. First, the theoretical layer thickness was calculated using the initial postulate of a spherical particle shape, which was not exactly the case as illustrated by the TEM picture (Figure 3b).

Secondly, the bare LSMO@silica MNPs being highly charged at physiological pH, the hydrodynamic size took into account the counterions layer that surrounded the inorganic particles. Once coated, particles became neutral as revealed by the zeta potential evolution and the counterions shell was thus negligible.

The high density of the tethered PEO chains, combined with a thick brush layer, imparted to MNPs the protein repellence and stealthiness properties combined with a long-time stability (See Electronic Supporting Information section for further details). Indeed, the BCP-coated MNPs exhibited roughly the same hydrodynamic volume and colloidal stability after 24 hrs in the presence of proteins rich media such as the fetal calf serum (FCS) (Table 2).

Table 2. Hydrodynamic features of bare LSMO@silica and (PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀)-coated LSMO@silica in PB and in 10% v/v FCS.

	D _H <i>nm</i>	PDI	ζ (±5 mV) <i>mV</i>
LSMO@silica MNPs in PB	120	0.09	-21
(PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀)-coated MNPs in PB	151	0.08	3.4
(PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀)-coated MNPs in PB with 10%v/v FCS*	138	0.1	-

* after 24 hrs of incubation

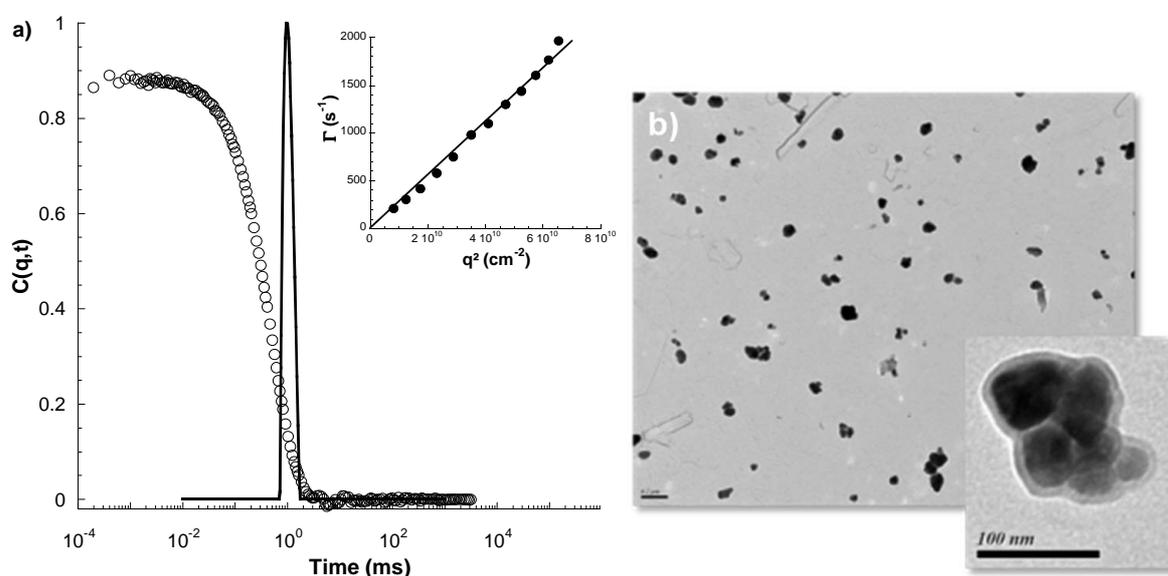


Figure 3. (a) Dynamic light scattering autocorrelation curve of (PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀)-coated MNPs in PB (pH 7.4, 10 mM) and its relaxation-time distribution at a scattering angle of 90°. Inset: dependence of the decay rate (Γ) on q^2 . (b) TEM images of (PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀)-coated MNPs,.

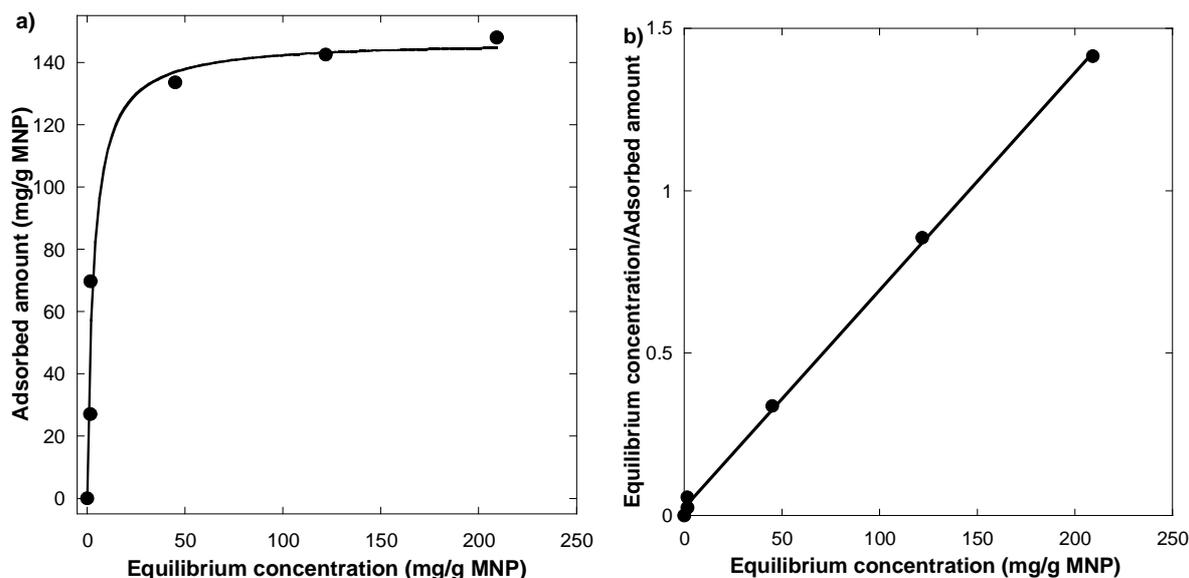


Figure 4. (a) Adsorption isotherm of (PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀)-coated MNPs in PB (pH 7.4, 10 mM); (b) Langmuir fit.

3.2 Thermoresponsivity of the polyether polymers in solution

Among many stimuli affecting the polymer solvency, the effect of temperature or added salts are the most studied. A particularly interesting phenomenon occurs when a polymer chain exhibits a decrease in solubility with increasing temperature, where coil-to-globule transition is observed at LCST.^{39, 40} At low temperature, the chains are solubilized and the associated water molecules keep them extended. As the temperature increased, the polymer/water interactions are replaced by polymer/polymer hydrophobic interactions. The entropy associated to the ordered water around polymer chains becoming energetically unfavorable, the water molecules are expelled to the bulk solution and polymer chains collapse. The dependence of the critical temperature on experimental condition changes (ionic strength, polymer concentration, structure and molecular weight, pH) has been widely investigated, especially for poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) and PEO-based polymers or proteins.⁴¹ The addition of salt decreases their solvency in water, due to the well-known salting out effect. As the salt concentration increases, some of the water molecules are attracted by salt ions, leading to a decreasing number of water molecules available for hydrogen bonding with the polymer chains. As a result, polymer segments start to interact with others *via* hydrophobic interactions and the polymer chains precipitate.⁴²⁻⁴⁵ Furthermore, the polymer concentration also influences its solvency.^{46, 47} This effect is not well-described from a thermodynamic point of view, but Dusek and Prins explained the LCST dependence of poly(aminomethoxypropylacrylamide) with its concentration by a relation between the solubility parameter polymer/water and the polymer concentration.^{48, 49}

Random copolymers of ethylene oxide and propylene oxide are also thermo-responsive with LCST varying from 30 to 70°C in water, depending on the copolymer composition. In this work, P(EO₃₁-co-PO₁₀) and P(EO₆-co-PO₂₉) blocks exhibit LCST values of 61 and 29°C, respectively. The LCST of P(EO₆-co-PO₂₉) block depends on the polymer concentration and salt addition and was monitored by DLS by following the scattered intensity variations with temperature (Figure 5). As the LCST value depends on the hydrophilic/hydrophobic ratio of the polymer, chain-ends play an important role. Thus to keep constant the protonation rate of the amino-terminated group of P(EO₆-co-PO₂₉) blocks, experiments were conducted in buffer at pH 7.4.

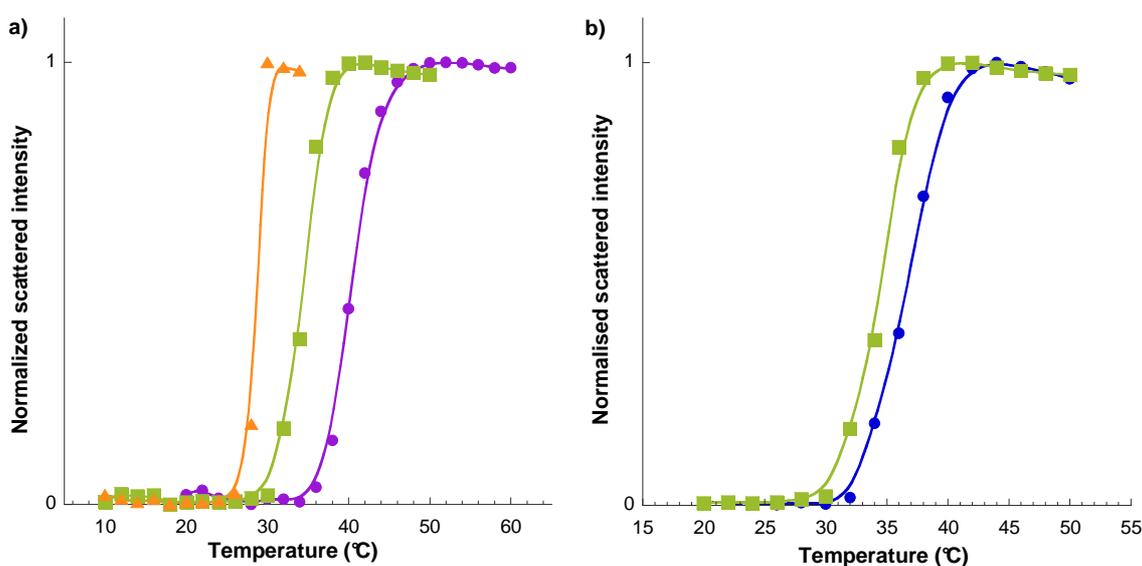


Figure 5. Normalized scattered intensity of P(EO₆-co-PO₂₉) as a function of (a) the polymer concentration: 0.05% w/w (●); 0.1% w/w (■) and 0.5% w/w (▲) and (b) the ionic strength at 0.1% w/w: 4 mM (●) and 154 mM (■).

In both cases (varying the concentration or the ionic strength), when temperature increased, the scattering intensity was maintained constant and low up to a critical temperature from which it increased rapidly. The LCST is defined as the temperature at which the scattered intensity starts to diverge. As seen in Figure 5, the LCST strongly depends on P(EO₆-co-PO₂₉) concentration as it varies from 26°C at 0.5% w/w to 34°C at 0.05% w/w. The salt t-dependency of LCST was also evidenced by a drop from 29 to 32°C when the ionic strength was increased from 4 mM to 154 mM.

From these observations, one can anticipate that when the copolymer is adsorbed onto a substrate, the concentration of tethered polymer chains at the interface being higher compared to the bulk one, the transition temperature, if still existing, will be shifted towards lower values, and strongly related to the grafting density.

3.3 Thermoresponsivity of the polymeric corona

The conformational transition related to the collapse of the “grafted” chains of PEO-coated MNPs was investigated. As depicted in Figure 6, their hydrodynamic diameter D_H decreased above a critical temperature. Typically, D_H of (PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀)-coated MNPs decreases from 148 nm (PDI = 0.11) at 30°C to 143 nm (PDI = 0.10) at 60°C. This decrease in size was correlated with a significant increase of the scattered intensity, which is consistent with a polymer chain densification at the particle surface. The measurement of the differential refractive index increments dn/dc of (PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀)-coated MNPs also supported this assumption: it increases significantly from 0.1096 mL/g at 25°C to 0.1338 mL/g at 50°C (See Electronic Supporting Information section for further details). This trend was also reported in the case of gold nanoparticles coated with poly(2-(2-methoxyethoxy)ethylmethacrylate) with ω -methoxy di(ethylene glycol) as side chains.⁵⁰ At the macromolecular level, the polymer brush height decreases when temperature increases, indicating a reduction in the affinity between EO groups and water molecules and an increase of the BCP-coated MNPs contrast. Comparing hydrodynamic sizes before and after coating with PEO-*b*-PLL copolymer at RT, the polymeric coating represents 45% of the total volume of the hybrid particles (Table 2). Once heated above 50°C, the PEO tethered chains dehydration is accompanied with a decreasing of the volume occupied by the PEO chains of approximately 15%.

Free PEO chains in solutions exhibit a theoretical LCST in water above 100°C.⁵¹⁻⁵³ However the dehydration process of this polymer occurs gradually for lower temperatures.⁵⁴ As the temperature is increased, the polymer brush height decreases. At 50°C, the dehydration process reaches its maximum but the relatively slight decrease in hydrodynamic volume of polymer layer indicates a still high rate of hydration. This may explained why no particles aggregation occurred, unlike PNIPAM-coated particles for which, upon heating, the complete collapse of the polymer shell induces a net particles aggregation.^{36, 37} As the whole volume did not shrink from the elevation of temperature, the PEO layer was not entirely dehydrated and keeps promoting the steric stabilization of the particles. These observation of the progressive dehydration of the PEO shell concomitant with an increase in the contrast of the HMNP is consistent with the work of Agut *et al.* who reported on the heat-triggered self-assembly of Jeffamine[®]-*b*-poly(L-glutamic acid).⁵⁵ Above a critical temperature close to the LCST of the P(EO_{*x*}-*co*-PO_{*y*}) block, the block-copolymer self-assembled into micellar structure, whose core was made of P(EO_{*x*}-*co*-PO_{*y*}) moieties while PGA chains formed the outer shell. The dehydration underwent by the P(EO_{*x*}-*co*-PO_{*y*}) core was quantified by small angle neutron scattering measurements and appeared to occur at least over 30°C. At 36°C, the onset of micellar structure formation, the hydration rate of the core was about 57% and became null at 66°C.

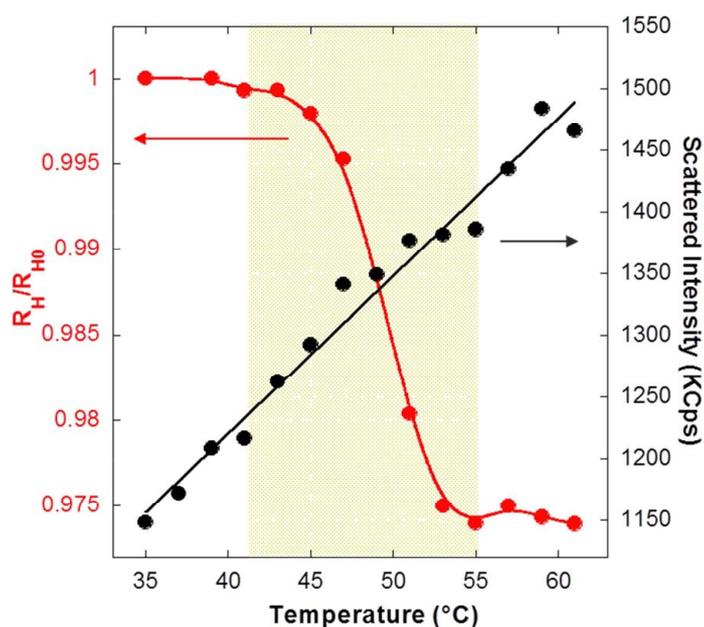


Figure 6. Hydrodynamic diameter (red symbol) and scattered intensity (black symbol) of (PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀)-coated MNPs vs. temperature in PB (pH 7.4, 10 mM).

The critical temperature is defined as the onset of the dehydration marked by the divergence of the scattered intensity. By the plot of $1/I$ vs. $1/T$, the critical temperature for PEO-coated MNPs was estimated at 36°C. However, the collapse of the corona as observed by DLS (Figure 6) occurred up to 55°C. Such a broad temperature response has already been reported for thermosensitive brushes. For example, PNIPAM is known to exhibit a sharp LCST in solution at 32°C. Once confined at an interface in a brush conformation, the LCST transition is enlarged, starting at lower temperature and occurring over a wider temperature range (from 29°C to 40°C).⁵⁶⁻⁵⁹ Jonas *et al.* also studied this nanoscale confinement effect on the temperature response of poly(2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate) brushes.⁶⁰ In this study, the transition was considerably broadened for highly confined brushes and no well-defined collapse temperature could be determined. Grafting density and the molecular weight of the tethered chains also affected the thermo-responsiveness of brushes.^{61, 62} At small grafting density, where tethered chains adopt a mushroom conformation⁶³, the chains exhibit a transition close to when they are free in solution. At high grafting density, the collapse is weak and the chains form a homogenous layer, which slightly decreases when temperature increases. This lies with the fact that for such grafting densities the chains are highly stretched away from the surface and that no free space is available for conformational change. The largest conformational response is observed for system displaying a polymer layer whose grafting density is close to the onset of the brush formation. Recently Malham *et al.* probe the thermal response of PNIPAM brushes by surface forces measurement.⁶⁴

They demonstrated that the swelling ratio defined as ratio of brush thicknesses in the swollen state to the collapse state vary from 7 for low grafting density brushes (0.02 chain/nm²) to 3 times for high density brushes (0.42 chain/nm²).

3.4 Modulation of the corona thermoresponsivity by co-adsorption of copolymers with different LCST values

The aim of this section is to study the modulation and control of the LCST of the BCP-coated MNPs just above the body temperature (about 43°C). Taylor and Cerankowski established as a general rule that the LCST is governed by the hydrophilic/hydrophobic polymer balance.⁶⁵ Many authors used this concept to modulate the LCST value by introducing specific end-groups, and by making random copolymers with hydrophilic or hydrophobic repeating units.^{42, 66, 67}

With the same philosophy, the co-adsorption of PEO₁₁₅-*b*-PLL₁₀ and P(EO_{*x*}-*co*-PO_{*y*})-*b*-PLL_{*n*} was investigated by DLS as a way to modulate the temperature response of the polymer layer. In previous work,³¹ we found that the adsorption mechanism of PEO-*b*-PLL based block-copolymers was governed by electrostatic interaction. The key parameter was the lysine length, since it sets the adsorbed amount as well as the tethered chains conformation. The three block-copolymers used in this study display approximately the same lysine length and the number of lysine units adsorbed per gram of particles was identical in all cases, as shown from adsorption isotherms measurement (See Electronic Supporting Information section for further details). As a result, independently of the PEO or P(EO_{*x*}-*co*-PO_{*y*}) block, all block-copolymers were grafted with the same density onto silica-coated nanoparticles. The only differences lied in the length of the stabilizing block and thus the height of the brushes. The co-adsorption process gave rise to a mixed polymer brush layer since two different polymers were randomly grafted to the same substrate. In addition, based on theoretical and experimental data, a polymer brush made from two compatible polymers with different molecular weights, is expected to gradually stratify. As a result, the chains having the highest molecular weight will occupied the top of the brush while bottom brush will be composed by both chains.⁶⁸ Then, the temperature increase was expected to first led to the collapse of the bottom of the brush (made of P(EO_{*x*}-*co*-PO_{*y*}) and part of PEO chains) while the top should be only slightly dehydrated, preventing the aggregation of MNPs. Moreover, as the structures of P(EO_{*x*}-*co*-PO_{*y*}) and PEO are chemically close, no microphase separation was expected.

As shown in Figure 7a, the transition temperature varied linearly with the co-adsorbed P(EO_{*x*}-*co*-PO_{*y*}) amount in both cases. For the blocks containing the highest amount of PO units (P(EO₆-*co*-PO₂₉)), the critical temperature decreased more readily with the P(EO_{*x*}-*co*-PO_{*y*}) corona content, due to a more hydrophobic character of the corona. Pure poly(propylene oxyde) PPO chains indeed exhibit LCST values between 10 and 20°C.⁶⁹

The evolution of the LCST was normalized by the amount of PPO in the brush (Figure 7b). The critical temperature varied linearly with the PO corona content and data from the two series of co-adsorption were roughly equivalent. This strongly supports that the dehydration of the polymer shell is a cooperative effect that depends only on PO and EO corona content. As a result, the transition temperature was easily tunable and adjusted to biologically relevant temperature (around 43°C for mild hyperthermia purposes).

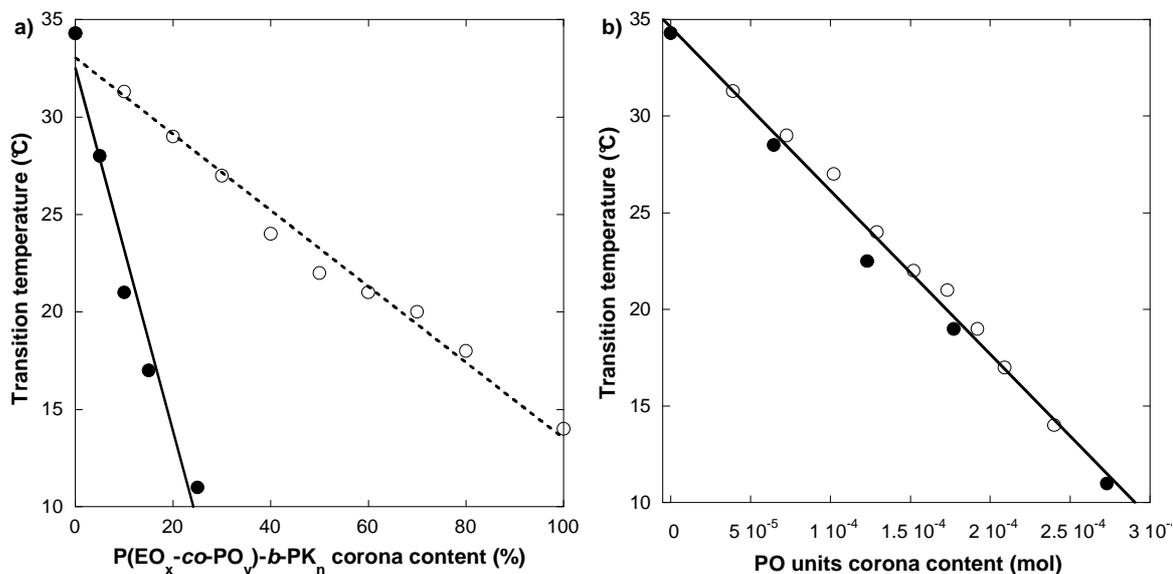


Figure 7. Temperature transition determined by scattered intensity-temperature plot: co-adsorption of PEO₁₁₃-b-PLL₁₀ with P(EO₃₁-co-PO₁₀)-b-PLL₁₃ (open symbol) and PEO₁₁₃-b-PLL₁₀ with P(EO₆-co-PO₂₉)-b-PLL₁₀ (filled symbol) (a) expressed as a function of P(EO_x-co-PO_y)-b-PLL corona content or (b) as a function of PO units corona content.

Solubilization experiments of pyrene followed by fluorescence measurement were carried out at various temperatures as a function of the hydrophobic (PO) content (Figure 8**Figure 8.**). Pyrene was particularly relevant since its fluorescence properties are sensitive to the polarity of its environment.⁷⁰ The ratio I_1/I_3 between the intensity I_1 of the band at 373 nm and I_3 intensity of the band at 384 nm was monitored as a function of the co-adsorption ratio and of the temperature. The initial values of this ratio was low (around 1.35), indicating the apolarity of the pyrene environment in the shell (1.9 in water).⁷¹ Moreover, the ratio I_1/I_3 decreased only slightly (approximately 0.15) when temperature increased, as already reported and correlated to a small local polarity variation upon dehydration of the polymer chains at the LCST.⁷² Indeed, upon thermal transition, polymer layer dehydration is not total and polymer chains could retain quite high hydration rate.^{55, 73}

All the systems followed the same trend. First, the ratio I_1/I_3 rapidly decreased, indicating that hydrophobic domains were growing within the polymer shell with increasing temperature.

Comparing quantitatively the pyrene partitioning observed for the three different coatings, it was clear that the hydrophobicity of the shell was directly correlated with the PO content, in good agreement with previous scattering measurements.

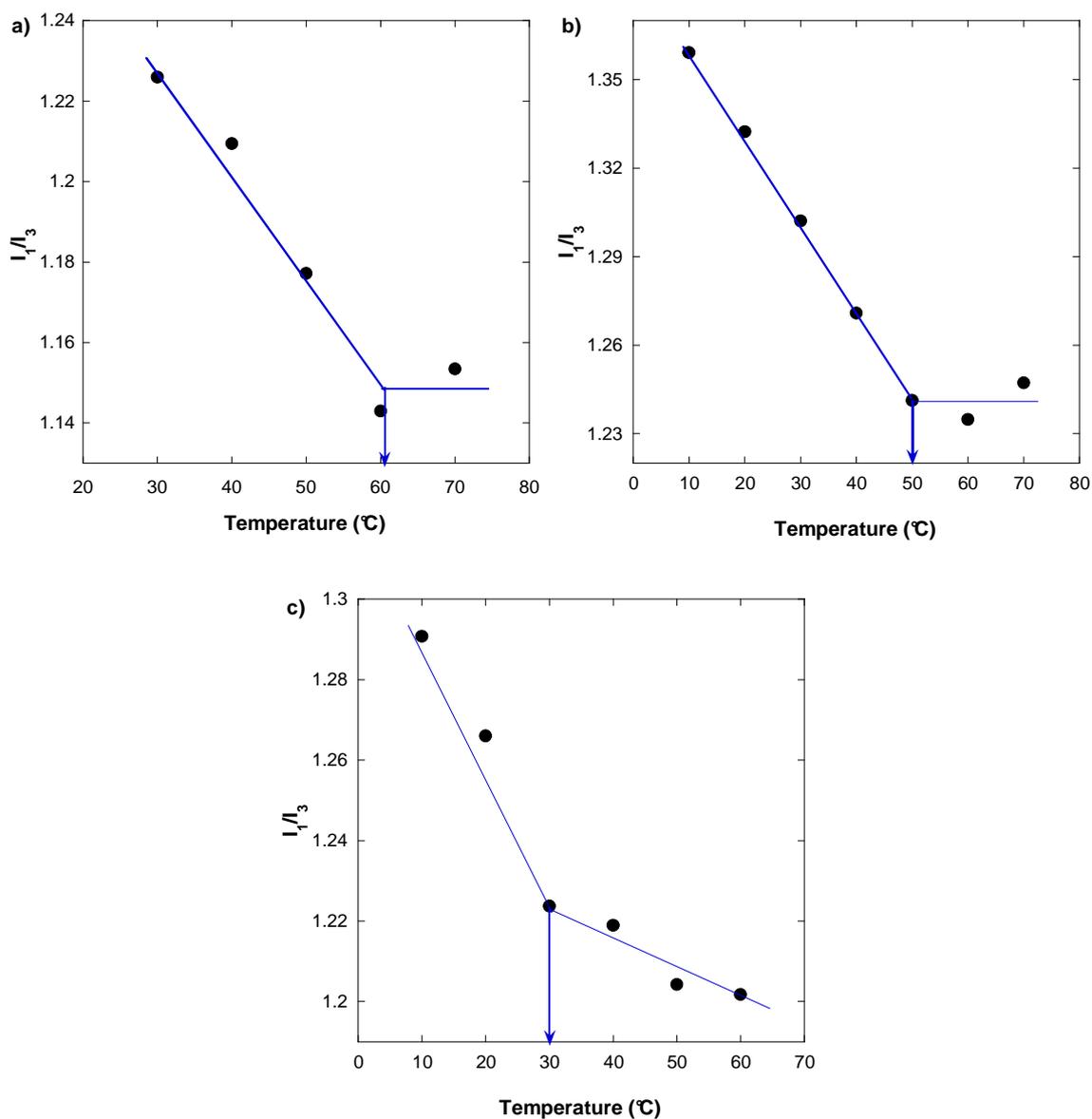


Figure 8. Normalized pyrene partition (I_1/I_3 ratio) as a function of the temperature and corona composition: (a) PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀; (b) PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ / P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PLL₁₃ (50/50% w/w); (c) P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PLL₁₃

In order to adapt such a design in a biologically relevant context, ideal nanoparticles should present a corona with high volume shrinkage above mild hyperthermia temperature, allowing a fast and efficient release of a previously encapsulated drug. As a result, the dehydration rate should be close to its maximum at around 43 °C.

Looking at the I_1/I_3 versus temperature curves on Figure 8, BCP-coated MNPs with a shell composed of PEO/P(EO₃₁-*co*-PO₁₀) (50/50% w/w) fulfilled this requirement. Indeed, these nanoparticles were expected to continuously dehydrate with increasing temperature from 30 to 50°C, where a plateau was reached, corresponding to a maximal volume shrinkage.

3.5 Drug loading

Loading and release efficiency of doxorubicin in BCP-coated MNPs were evaluated as a function of polymer brush composition and temperature. These two parameters were critical in this study since both affect the hydrophilic/hydrophobic balance of the polymer layer. Among the several methods explored for loading DOX into nanoparticles, the simplest consisted in incubating the drug with MNPs.^{74, 75} It involved the simple mixing of a preformed BCP-coated MNPs suspension with a solution containing DOX. The rationale behind such a loading strategy lied in the hydrophobic character of DOX that made possible its entrapment within hydrophobic domains contained in the polymer shell surrounding the MNPs. As a matter of fact, at pH 7.2, the partition coefficient of DOX in octanol/water mixture was about $\log P = 0.71$ meaning that 84% of DOX was contained in the octanol phase.⁷⁶

DOX was loaded by incubation with (PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀)-coated MNPs at different feed weight ratios in Tris buffer (pH 7.4, 25 mM). The removal of free DOX from the DOX-loaded MNPs was performed by centrifugation (11092 g, 30 min, 10°C). Table 3 gathered DOX loading results and hydrodynamic sizes of BCP-coated MNPs after DOX incubation. Within the range of the DOX FWR studied, DOX loading content increased continuously, suggesting that the nanoparticles saturation was not reached, even for a DOX FWR around 174%. No particles aggregation was observed and hydrodynamic sizes were comparable to initial ones. The loading efficiency was constant at 10% up to a FWR of 87% and slightly increased to 17% at DOX FWR = 174%. This trend was already reported in self-assembled systems, and was attributed to an increase of the chemical compatibility between the polymer and the drug.^{77, 78} Indeed DOX loading is first governed by the affinity of drug for the polymer. As its loading increases, the solubility parameter of the polymer environment becomes closer to the one of DOX, resulting in an increase of the loading efficiency.⁷⁹ Interestingly, the maximum loading content that can be reached using such a simple process was as high as about 30%, the diameter and polydispersity of the BCP-coated MNPs being constant ($D_H = 157$ nm, PDI = 0.12).

Table 3. DOX loading of PEO-coated MNPs by incubation at RT in Tris buffer (pH 7.4; 25 mM)

PEO-coated MNPs in Tris buffer g/L	DOX FWR %	DOX LC (±1.5%) %	DOX LE (±0.9%) %	D_H nm	PDI -
1.15	8.7	0.9	10.6	ND*	ND*
	21.7	2.5	11.4	ND*	ND*
	43.5	3.9	9	159	0.13
	65.2	5.7	8.7	158	0.13
	86.9	9.5	10.9	164	0.12
	121.7	22.2	18.2	158	0.12
	173.9	29	16.7	157	0.12

ND : not determined

In order to take advantage of the controlled hydrophobicity and thermo-sensitivity of the shell of the BCP-coated MNPs, DOX loading was investigated as a function of temperature and composition of the corona (Figure 9). When incubation was performed at RT with MNPs combining PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PLL₁₃ blocks, DOX loading efficiency, MNPs size and polydispersity were not affected by the shell composition (Table 4). Indeed, at 25°C, the brush was still fully hydrated, independently of the ratio between PEO₁₁₃ and P(EO₃₁-*co*-PO₁₀) blocks, as evidenced by the fluorescence measurement with pyrene where the ratio I₁/I₃ was constant at about 1.25. As a result, the partition coefficient of DOX, and the loading efficiency, was not modified. However, increasing the temperature up to 50 °C highly affected the hydrophilic/hydrophobic balance of the polymer layer since the ratio I₁/I₃ decreased. Consequently, at 50°C, DOX loading efficiency highly increased with the P(EO₃₁-*co*-PO₁₀) content in the corona (Figure 9.). Interestingly, for BCP-coated MNPs with a corona made of 75 wt.% of P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PLL₁₃, DOX loading efficiency reached 70% and the corresponding loading content was about 120%. Unfortunately, the colloidal stability at so high payload was strongly affected, and only the systems having less than 50% of P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PLL₁₃ content in the corona remained fully dispersed after DOX incorporation at 50°C (Table 4).

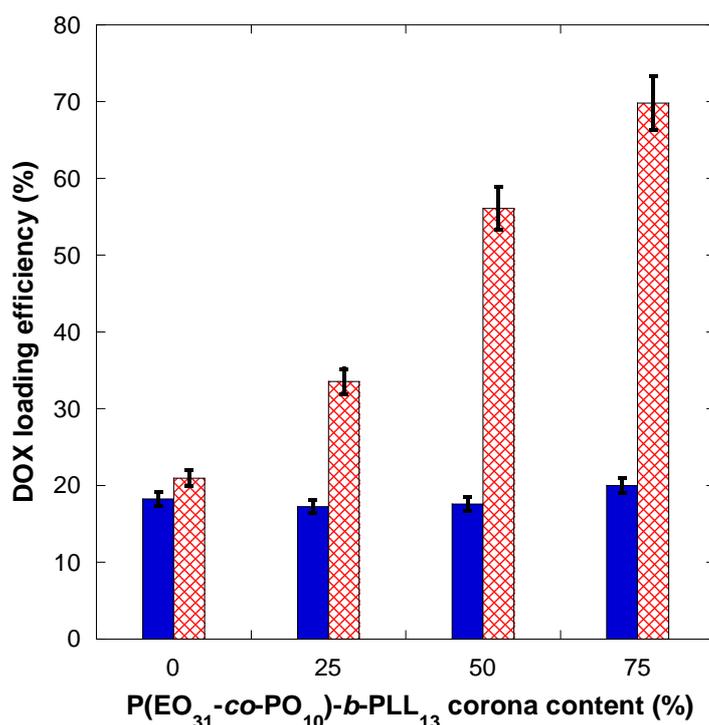


Figure 9. Loading efficiency as a function of the P(EO₃₁-*co*-PO₁₀) content of the corona at 25°C (filled blue bar) (FWR = 122%, incubation time 24 hrs) and 50°C (dash ed red bar) (FWR = 174%, incubation time 8 hrs)

Table 4. Hydrodynamic diameter and polydispersity of DOX-loaded MNPs by incubation at RT (FWR = 122%) and 50°C (FWR = 174%) in Tris buffer (pH 7.4; 25 mM)

P(EO ₃₁ -co-PO ₁₀)-b-PLL ₁₃ corona content	Initial		RT incubation		50°C incubation	
	D _H	PDI	D _H	PDI	D _H	PDI
%	nm	-	nm	-	nm	-
0	167	0.12	158	0.12	171	0.2
25	156	0.1	160	0.11	201	0.25
50	154	0.12	163	0.14	355	0.36
75	154	0.15	164	0.15	678	0.5

You *et al.* recently reported the preparation of doxorubicin loaded PEO-coated hollow gold nanospheres (HAuNS) by incubation with a very high loading content (LC ≈ 63%).⁸⁰ Such a loading was attributed not only to the hydrophobic environment close to the NPs, but also to specific electrostatic interactions between the positively charge amino group of DOX with the negatively charged citrates that were used to stabilize HAuNS.

Similarly, we demonstrated by adsorption isotherms measurements that for a short lysine anchoring block ($\overline{DP} \approx 10$), the coverage ratio was about 50%, meaning that about 50% of the silica surface was free (see chapter 3). Even if silica materials display complex surface and may interact by many mode with DOX, *e.g.* electrostatic and hydrophobic interactions and hydrogen bonding,⁸¹ it is reasonable to assume that the electrostatic interactions with DOX would favor the loading capacity of BCP-coated MNPs. In addition, since DOX molecules displayed a high hydrophobic character, hydrophobic interactions would also participate to their loading within the polymer shell. Based on fluorescence study at RT, the polymer shell hydrophobicity did not vary over the entire range of shell composition tested. Increasing incubation temperature to 50°C induced an increase of the hydrophobic domains in the polymer shell, this effect being more important when PO content in the shell increased.

3.6 Drug release

The drug release behavior of [PEO₁₁₃-b-PLL₁₀/P(EO₃₁-co-PO₁₀)-b-PLL₁₃]-coated MNPs was investigated in Tris buffer at pH 7.4 at RT, at 43°C and under AMF. (Figure 10) The composition of the polymer coating was selected in order to exhibit a maximum collapse around 43°C. This ideal composition corresponded to a 50% mixture in mass of PEO₁₁₃-b-PLL₁₀ and P(EO₃₁-co-PO₁₀)-b-PLL₁₃ copolymers. This temperature was also the maximum temperature that perovskite nanoparticles can reach, corresponding to their Curie temperature²⁴.

DOX incorporation was performed at RT and the loading content after removal of free DOX by dialysis was LC = 23% ($D_H = 143$ nm, PDI = 0.1, ζ potential = 17 mV). The positive ζ potential was conferred by positively charged DOX entrapped molecules.

The release kinetics of DOX at 20 °C was very slow and governed by diffusion process (Figure 10a). Interestingly, no burst release was observed attesting that free DOX was completely removed from the suspension during the dialysis purification step. The DOX release kinetic obtained at 43°C was much larger: when only 14% of DOX was released after 10 h at 20°C, a rapid release of 52% was observed at 43°C. This may lie with a change in the rearrangements of the polymer corona that entrapped the drug. Increasing temperature up to 43°C would induce a dehydration of the polymer shell, inducing its collapse which fasten the drug release. This type of release is consistent with previous studies, where a temperature increase was shown to promote the faster release of drug entrapped in a thermosensitive shell.¹⁵⁻¹⁸

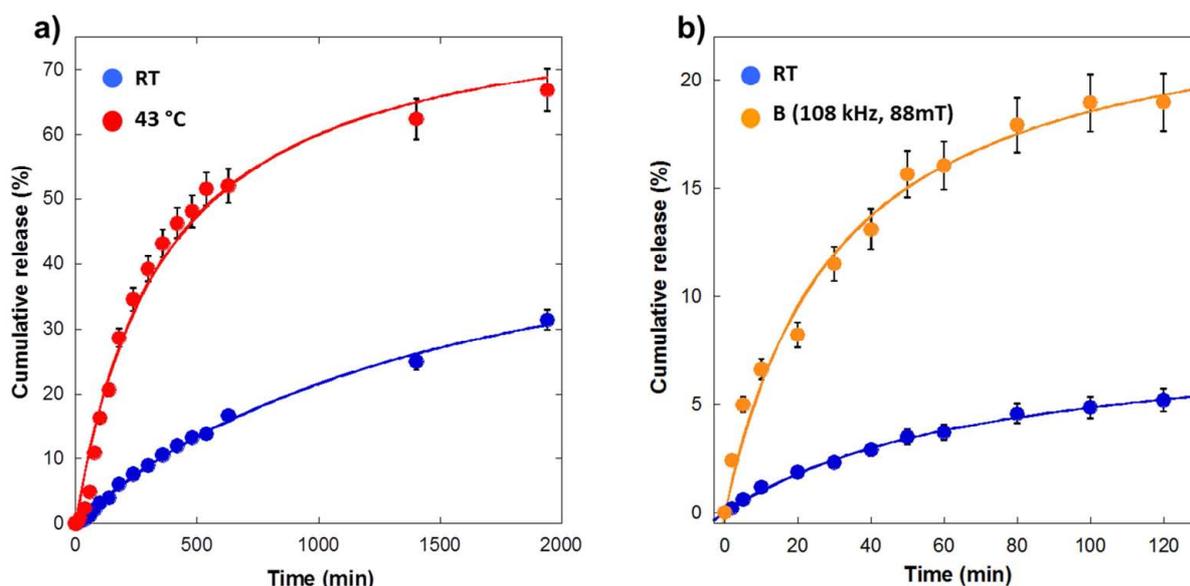


Figure 10. Drug release at RT and 43 °C (a) and with and with out alternative magnetic field (b)

The main goal of this work was to induce the release of DOX, by inducing a local heating that can be remotely controlled. In AMF (108 kHz, 88 mT), sufficient energy was generated to increase temperature locally up to the Curie point of the MNPs (43°C). The cumulative release of DOX loaded in BCP-coated MNPs with and without AMF is shown in Figure 10b. After 2 hrs, the DOX release is multiplied by a factor 5 under AMF compared to the same DOX-loaded MNPs but kept away from the coil. The heat produced via hyperthermia is believed to trigger the dehydration of the polymeric layer and increase the diffusion of entrapped DOX out of the polymeric layer. Similar results dealing with the drug release triggered by AMF were very recently reported.^{17, 82, 83}

Hence drug release was mainly governed by thermal response of the polymeric shell which might be induced by artificial temperature increase (set by the oil bath) or by the heat generated by the MNPs under AMF.

4 Conclusion

We herein reported the synthesis of (PEO-*b*-PLL)-based block-copolymers and their co-adsorption onto LSMO@silica MNPs leading to potential nanocarriers for drug delivery. This approach is advantageous in several aspects. First, the adsorption of PEO-*b*-PLL based block-copolymers led to coated particles whose conformation was as followed: the Lysine blocks were firmly anchored to the silica surface while PEO or P(EO_x-*co*-PO_y) chains remained free in solutions providing a steric stabilization. Such MNPs exhibit long-time stability in buffer and the PEO shell having an high grafting density combined with a thick layer impart proteins repellency property to the material. Second, the simple co-adsorption process enabled to control the hydrophilic/hydrophobic balance of the polymer shell which may be used as a way to modulate the DOX loading content. It also allowed the tunability of the temperature transition of the polymeric corona in a relevant range. The co-adsorption of PEG₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PLL₁₃ at equal weight concentration endowed to the particles a suitable temperature transition in biologically relevant window for mild hyperthermia, since at 43°C the dehydration rate appears to be close to its maximum. The polymer shell provided a volume for the encapsulation of DOX fulfilled by simple incubation method. It implies the simple mixing of DOX with preformed BCP-coated nanoparticles. Temperature appears to be a critical parameter influencing the loading efficiency. PEG₁₁₃-*b*-PLL₁₀ / P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PLL₁₃ (50/50% w/w) coated MNPs incubated at RT with DOX (FWR = 121%) presented high loading capacity (LE 18%, LC 21%). DOX payload release rate was fasten by both increasing the temperature externally or by applying a suitable alternative magnetic field. The AMF conditions (108 kHz, 88 mT) produce sufficient heat to trigger the collapse of the polymer shells and induce the drug release. The synergistic effect of heat MNP production and the thermosensitivity of the polymer shell allowed the drug release and conferred to this magneto-thermally responsive nanodevice interesting properties as drug delivery system which have to be evaluated in vivo. Similar nanoparticles (DOX-loaded PEO-coated MNPs) were reported as efficient drug release system since from these objects pharmacologically active DOX was release with a remarkable level of cell destruction⁸⁴ which seems to suggest that similar results may be expected from our devices.

5 References

1. K. K. Upadhyay, H. G. Agrawal, C. Upadhyay, C. Schatz, J. F. Le Meins, A. Misra and S. Lecommandoux, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2009, **26**, 157-205.
2. D. Roy, J. N. Cambre and B. S. Sumerlin, *Prog. Polym. Sci.*, 2009, **35**, 278-301.
3. M. Motornov, Y. Roiter, I. Tokarev and S. Minko, *Prog. Polym. Sci.*, 2009, **35**, 174-211.
4. F. Liu and M. W. Urban, *Prog. Polym. Sci.*, 2009, **35**, 3-23.
5. J. Rodriguez-Hernandez, F. Checot, Y. Gnanou and S. Lecommandoux, *Prog. Polym. Sci.*, 2005, **30**, 691-724.
6. C. Barcena, A. K. Sra and J. Gao, in *Nanoscale Magnetic Materials and Applications*, eds. J. P. Liu, E. Fullerton, O. Gutfleisch and D. J. Sellmyer, Springer-Verlag, New-York, 2009, ch. 20, pp. 591-625.
7. D. Schmaljohann, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2006, **58**, 1655-1670.
8. H. Wei, S.-X. Cheng, X.-Z. Zhang and R.-X. Zhuo, *Prog. Polym. Sci.*, 2009, **34**, 893-910.
9. S. Purushotham, P. E. J. Chang, H. Rumpel, I. H. C. Kee, R. T. H. Ng, P. K. H. Chow, C. K. Tan and R. V. Ramanujan, *Nanotechnology*, 2009, **20**.
10. S. Purushotham and R. V. Ramanujan, *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**, 502-510.
11. J. Zhang and R. D. K. Misra, *Acta Biomaterialia*, 2007, **3**, 838-850.
12. T. Y. Liu, S. H. Hu, K. H. Liu, R. S. Shaiu, D. M. Liu and S. Y. Chen, *Langmuir*, 2008, **24**, 13306-13311.
13. E. Duguet, S. Vasseur, S. Mornet and J.-M. Devoisselle, *Nanomedicine*, 2006, **1**, 157-168.
14. A. Ito, M. Shinkai, H. Honda and T. Kobayashi, *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, **100**, 1-11.
15. M. Rahimi, A. Wadajkar, K. Subramanian, M. Yousef, W. Cui, J.-T. Hsieh and K. T. Nguyen, *Nanomedicine: Nanotech. Biol. Med.*, 2010, **6**, 672-680.
16. N. Andhariya, B. Chudasama, R. Mehta and R. Upadhyay, *J. Nanopart. Res.*, 2010, 1-12.
17. T.-Y. Liu, S.-H. Hu, K.-H. Liu, R.-S. Shaiu, D.-M. Liu and S.-Y. Chen, *Langmuir*, 2008, **24**, 13306-13311.
18. P. Sun, Y. Zhang, L. Shi and Z. Gan, *Macromol. Biosci.*, 2010, **10**, 621-631.
19. C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée and M. Port, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2006, **58**, 1471-1504.
20. R. Banerjee, Y. Katsenovich, L. Lagos, M. Mclintosh, X. Zhang and C. Z. Li, *Curr. Med. Chem.*, 2010, **17**, 3120-3141.
21. M. Johannsen, U. Gneveckow, K. Taymoonan, B. Thiesen, N. Waldofener, R. Scholz, C. H. Cho, A. Jordan, P. Wust and S. A. Loening, *European Urology Supplements*, 2007, **6**, 201-201.
22. E. Pollert, P. Veverka, M. Veverka, O. Kaman, K. Záveta, S. Vasseur, R. Epherre, G. Goglio and E. Duguet, *Prog. Solid State Chem.*, 2009, **37**, 1-14.
23. A. Dimarco, M. Gaetani and Scarpina.B, *Cancer Chemotherapy Reports Part 1*, 1969, **53**, 33-&.
24. R. Epherre, E. Duguet, S. Mornet, E. Pollert, S. Louguet, S. Lecommandoux, C. Schatz and G. Goglio, *J. Mater. Chem.*, 2011.
25. W. Agut, A. Brulet, D. Taton and S. Lecommandoux, *Langmuir*, 2007, **23**, 11526-11533.
26. J. Rodriguez-Hernandez, M. Gatti and H.-A. Klok, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 249-258.
27. B. D. Gummow and G. A. F. Roberts, *Makromol. Chem.*, 1985, **186**, 1239-1244.
28. G. G. Maghami and G. A. F. Roberts, *Makromol. Chem.*, 1988, **189**, 2239-2243.
29. D. E. Koppel, *J. Chem. Phys.*, 1972, **57**, 4814-4820.
30. S. Vasseur, E. Duguet, J. Portier, G. Goglio, S. Mornet, E. Hadová, K. Knížek, M. Marysko, P. Veverka and E. Pollert, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2006, **302**, 315-320.
31. S. Louguet, A. Kumar, G. Sigaud, E. Duguet, S. Lecommandoux and C. Schatz, *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, **Submitted**.
32. S. Alexander, *J Phys (Paris)*, 1977, **38**, 983-987.

33. S. Alexander, *J Phys (Paris)*, 1977, **38**, 977-981.
34. P. G. De Gennes, *Macromolecules*, 1980, **13**, 1069-1075.
35. P. G. de Gennes, *Advances in Colloid and Interface Science*, 1987, **27**, 189-209.
36. T. M. Birshtein, O. V. Borisov, Y. B. Zhulina, A. R. Khokhlov and T. A. Yurasova, *Polymer Science U.S.S.R.*, 1987, **29**, 1293-1300.
37. V. B. Damodaran, C. J. Fee, T. Ruckh and K. C. Papat, *Langmuir*, 2010, **26**, 7299-7306.
38. N. F. Steinmetz and M. Manchester, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 784-792.
39. H. G. Schild, *Prog. Polym. Sci.*, 1992, **17**, 163-249.
40. X. Yin, A. S. Hoffman and P. S. Stayton, *Biomacromolecules*, 2006, **7**, 1381-1385.
41. E. S. Gil and S. M. Hudson, *Prog. Polym. Sci.*, 2004, **29**, 1173-1222.
42. J. S. Park and K. Kataoka, *Macromolecules*, 2006, **39**, 6622-6630.
43. P. Lin, C. Clash, E. M. Pearce, T. K. Kwei and M. A. Aponte, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 1988, **26**, 603-619.
44. M. M. Bloksma, D. J. Bakker, C. Weber, R. Hoogenboom and U. S. Schubert, *Macromol. Rapid Commun.*, 2010, **31**, 724-728.
45. Y. Zhang, S. Furyk, L. B. Sagle, Y. Cho, D. E. Bergbreiter and P. S. Cremer, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 8916-8924.
46. C. Boutris, E. G. Chatzi and C. Kiparissides, *Polymer*, 1997, **38**, 2567-2570.
47. S. Furyk, Y. J. Zhang, D. Ortiz-Acosta, P. S. Cremer and D. E. Bergbreiter, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2006, **44**, 1492-1501.
48. E. Uguzdogan and O. S. Kabasakal, *Colloids Surf., A*, 2010, **368**, 129-136.
49. K. Dušek and W. Prins, in *Fortschritte der Hochpolymeren-Forschung*, Springer Berlin / Heidelberg, 1969, vol. 6, pp. 1-102.
50. H. Kitano, H. Kago and K. Matsuura, *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, **331**, 343-350.
51. S. Bekiranov, R. Bruinsma and P. Pincus, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 1997, **55**, 577.
52. E. E. Dormidontova, *Macromolecules*, 2002, **35**, 987-1001.
53. *United States Pat.*, 2006.
54. T. Drobek, N. D. Spencer and M. Heuberger, *Macromolecules*, 2005, **38**, 5254-5259.
55. W. Agut, A. BrÅ»let, D. Taton and S. Lecommandoux, *Langmuir*, 2007, **23**, 11526-11533.
56. J. Raula, J. Shan, M. Nuopponen, A. Niskanen, H. Jiang, E. I. Kauppinen and H. Tenhu, *Langmuir*, 2003, **19**, 3499-3504.
57. Q. He, A. Kuller, M. Grunze and J. B. Li, *Langmuir*, 2007, **23**, 3981-3987.
58. Q. S. Wei, J. Ji and J. C. Shen, *Macromol. Rapid Commun.*, 2008, **29**, 645-650.
59. T. L. Sun, G. J. Wang, L. Feng, B. Q. Liu, Y. M. Ma, L. Jiang and D. B. Zhu, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2004, **43**, 357-360.
60. A. M. Jonas, Z. Hu, K. Glinel and W. T. S. Huck, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 3819-3824.
61. A. Halperin, M. Tirrell and T. P. Lodge, *Adv. Polym. Sci.*, 1992, **100**, 31-71.
62. S. Minko, *Polym. Rev. (Philadelphia, PA, U. S.)*, 2006, **46**, 397-420.
63. H. Yim, M. S. Kent, S. Mendez, G. P. Lopez, S. Satija and Y. Seo, *Macromolecules*, 2006, **39**, 3420-3426.
64. I. B. Malham and L. Bureau, *Langmuir*, 2009, **26**, 4762-4768.
65. L. D. Taylor and L. D. Cerankowski, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 1975, **13**, 2551-2570.
66. J. F. Lutz and A. Hoth, *Macromolecules*, 2006, **39**, 893-896.
67. D. Fournier, R. Hoogenboom, H. M. L. Thijs, R. M. Paulus and U. S. Schubert, *Macromolecules*, 2007, **40**, 915-920.
68. S. Minko, I. Luzinov, V. Luchnikov, M. Müller, S. Patil and M. Stamm, *Macromolecules*, 2003, **36**, 7268-7279.
69. P. Alexandridis and T. Alan Hatton, *Colloids Surf., A*, 1995, **96**, 1-46.
70. D. C. Dong and M. A. Winnik, *Can. J. Chem.*, 1984, **62**, 2560-2565.

71. K. Kalyanasundaram and J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 2039-2044.
72. A. Housni and Y. Zhao, *Langmuir*, 2010, **26**, 12933-12939.
73. C. Wu and S. Q. Zhou, *Macromolecules*, 1995, **28**, 8381-8387.
74. J. L. Arias, M. A. Ruiz, M. Lopez-Viota and A. V. Delgado, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2008, **62**, 64-70.
75. P. Asuri, S. S. Karajanagi, A. A. Vertegel, J. S. Dordick and R. S. Kane, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2007, **7**, 1675-1678.
76. T. P. Formariz, V. H. V. Sarmiento, A. A. Silva-Junior, M. V. Scarpa, C. V. Santilli and A. G. Oliveira, *Colloids Surf., B*, 2006, **51**, 54-61.
77. C. Sanson, C. Schatz, J.-F. Le Meins, A. Soum, J. Thévenot, E. Garanger and S. Lecommandoux, *J. Controlled Release*, 2010, **147**, 428-435.
78. P. Lim Soo, L. Luo, D. Maysinger and A. Eisenberg, *Langmuir*, 2002, **18**, 9996-10004.
79. M. Yokoyama, S. Fukushima, R. Uehara, K. Okamoto, K. Kataoka, Y. Sakurai and T. Okano, *J. Controlled Release*, 1998, **50**, 79-92.
80. J. You, G. Zhang and C. Li, *ACS Nano*, 2010, **4**, 1033-1041.
81. Y. Tian, M. K. C. Tam, T. A. Hatton and L. Bromberg, *Molecular Engineering of Biological and Chemical Systems* 2004.
82. S. Purushotham, P. E. J. Chang, H. Rumpel, I. H. C. Kee, R. T. H. Ng, P. K. H. Chow, C. K. Tan and R. V. Ramanujan, *Nanotechnol.*, 2009, **20**, 305101.
83. C. Sanson, O. Diou, J. Thévenot, E. Ibarboure, A. Soum, A. Brûlet, S. Miraux, E. Thiaudière, S. Tan, A. Brisson, V. Dupuis, O. Sandre and S. b. Lecommandoux, *ACS Nano*, 2011, null-null.
84. S. I. Park, J. H. Lim, Y. H. Hwang, K. H. Kim, S. M. Kim, J. H. Kim, C. G. Kim and C. O. Kim, in *Phys. Status Solidi C*, ed. S. H. Lim, 2007, vol. 4, pp. 4345-4351.

6 Annexes

6.1 LSMO@SiO₂ MNPs synthesis

LSMO@SiO₂ MNPs were synthesized according to an already described protocol based on the Glycine Nitrate Process (GNP) and a subsequent silica encapsulation stage¹. Briefly, Mn(NO₃)₂, (Sigma Aldrich, > 97%), Sr(NO₃)₂ (Riedel-de Haën, 99%) and La(NO₃)₃ (Riedel-de Haën, aqueous solution 0.1 M) were mixed in demineralized water in stoichiometric conditions in order to get 2 g of LSMO in about 150 mL. Glycine (Sigma Aldrich, 99%) was dissolved in this solution with a glycine/nitrate molar ratio (G/N) of 1. The solution was heated on a hot plate (~125°C) under stirring to evaporate excess water. On further heating (~250°C), the resulting viscous liquid self-ignited to produce voluminous ashes associated with the emission of large amounts of gases. Ashes (1 g) were introduced in a 45 mL agate bowl with 18 agate balls (Ø = 10 mm) and milled in a planetary device (Fritsch-Pulverisette) at 200 rpm during 9 x 30 min (reverse mode). They were then calcined in an alumina boat into a tubular furnace (rate of 10 K.min⁻¹ up to 1073 K for 30 min) and subjected to a second milling step including a manual milling (about 15 min in agate mortar) and a planetary one with the same experimental conditions as those used before calcination, except the powder mass (~650 mg) and milling duration (24 x 30 min). The exact chemical composition and final concentration of LSMO MNPs were determined by elemental analysis, performed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP/OES 720ES Varian) after MNPs dissolution in hydrochloric acid. The chemical composition was found to be La_{0.82}Sr_{0.18}MnO₃.

Static magnetic measurements were carried out on powders by means of a SQUID magnetometer (Quantum Design-MPMS5 XL) between 250 and 350 K up to 4 T. The Curie temperature was evaluated to 315 K (42°C) using Arr ott plots.

Silica encapsulation process started with the activation of the LSMO MNPs surface by an acidic treatment (HNO₃, 1M) in a sonicator bath for 15 min at room temperature (RT). After washing with ultrapure water by several centrifugation cycles, the particles were flocculated by the addition of citric acid (0.01 M) and washed with acetone by centrifugation. Peptization was performed by adding some drops of ammonia on the pellets. Then, the sol of citrated particles was poured into a volume of ethanol/water/ammonia solution 75/23.5/1.5 v/v/v %. To tune the silica shell thickness, the exact amount of tetraethylorthosilicate (TEOS, Sigma Aldrich) was calculated from the initial d and expected D MNPs diameters, taking into account the number N_p of MNPs, by means of the formula $V_{TEOS} = 3.89 \cdot N_p \cdot (D^3 - d^3)$, where V_{TEOS} was directly expressed in mL and D and d in cm.

The 3.89 scaling factor was computed from the molecular weights of SiO₂ formula unit and TEOS, the densities of silica and TEOS (2 and 0.934 g.cm⁻³, respectively) and assuming that particles are spherical. In our case, the silica shell thickness was targeted in the range 4-5 nm. The final step consisted in a size selection of the particles by centrifugation in order to remove residual aggregates. The final concentration of LSMO@SiO₂ MNPs was determined by elemental analysis, according to the previously described protocol. This final concentration was adjusted to 5.6 g_{LSMO}/L.

6.2 Determination of the degree of polymerization n of the poly(TFA L-lysine) segments within the block-copolymers PEO₁₁₃-*b*-PLL _{n} and P(EO _{x} -*co*-PO _{y})-*b*-PLL _{n}

6.2.1 NMR spectroscopy

¹H NMR spectra of block copolymers (BCP) PEO₁₁₃-*b*-PLL _{n} , P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PLL _{n} and P(EO₆-*co*-PO₂₉)-*b*-PLL _{n} with TFA-protected and unprotected lysine segments are shown in Figure S1, Figure S2 and Figure S3, respectively. Protons of the unprotected amine groups were not distinguishable from the baseline noise as they were probably exchanged with D₂O (Figure S1b, Figure S2b and Figure S3b).

The degree of polymerization (\overline{DP}) of the poly(TFA L-lysine) block within the PEO₁₁₃-*b*-PTFALL₁₀ copolymer was determined by comparing the peak integrations of end methylene group of PEO block (-CH₃, $\delta=3.217$ ppm) with ϵ -methylene protons of the lysine side chains (-CH₂, $\delta=3.106$ ppm) or with the 6 equivalent methylene protons of the lysine side chains (-(CH₂)₃, $\delta=1.1 - 2$ ppm). This allowed to determine a \overline{DP} of 10 for the PLL block (Figure S1a).

For the P(EO _{x} -*co*-PO _{y})-*b*-PTFALL _{n} based copolymers, \overline{DP} of the poly(TFA L-lysine) block was determined by taking the side-chain methylene group of propylene oxide units as a reference (-CH₃, $\delta=1.029$ ppm). \overline{DP} of 13 and 10 were found for P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PTFALL₁₃ and P(EO₆-*co*-PO₂₉)-*b*-PTFALL₁₀ copolymers, respectively (Figure S2a and Figure S3a).

The removal of labile trifluoroacetyl (TFA) protecting groups of L-lysine was also characterized by ¹H NMR spectroscopy. Indeed, it was supposed that PTFALL blocks could form a secondary structure, α -Helix or β -sheet, through hydrogen bonding between CO and NH groups. Once deprotected in D₂O with DCI (35 % w/w in D₂O), PLL chains probably adopted a coil-like conformation. This conformational transition was characterized by a shift of the ϵ -methylene protons of the lysine side chains from $\delta = 3.106$ ppm to $\delta = 2.704$ ppm on ¹H NMR spectra² (Figure S1b, Figure S2b and Figure S3b).

The determination of the \overline{DP} of the PLL block was also carried out on unprotected copolymers by ¹H-NMR spectroscopy using the same peaks as with the protected copolymers form (Figure S1b, Figure S2b and Figure S3b). Results are gathered in Table S1.

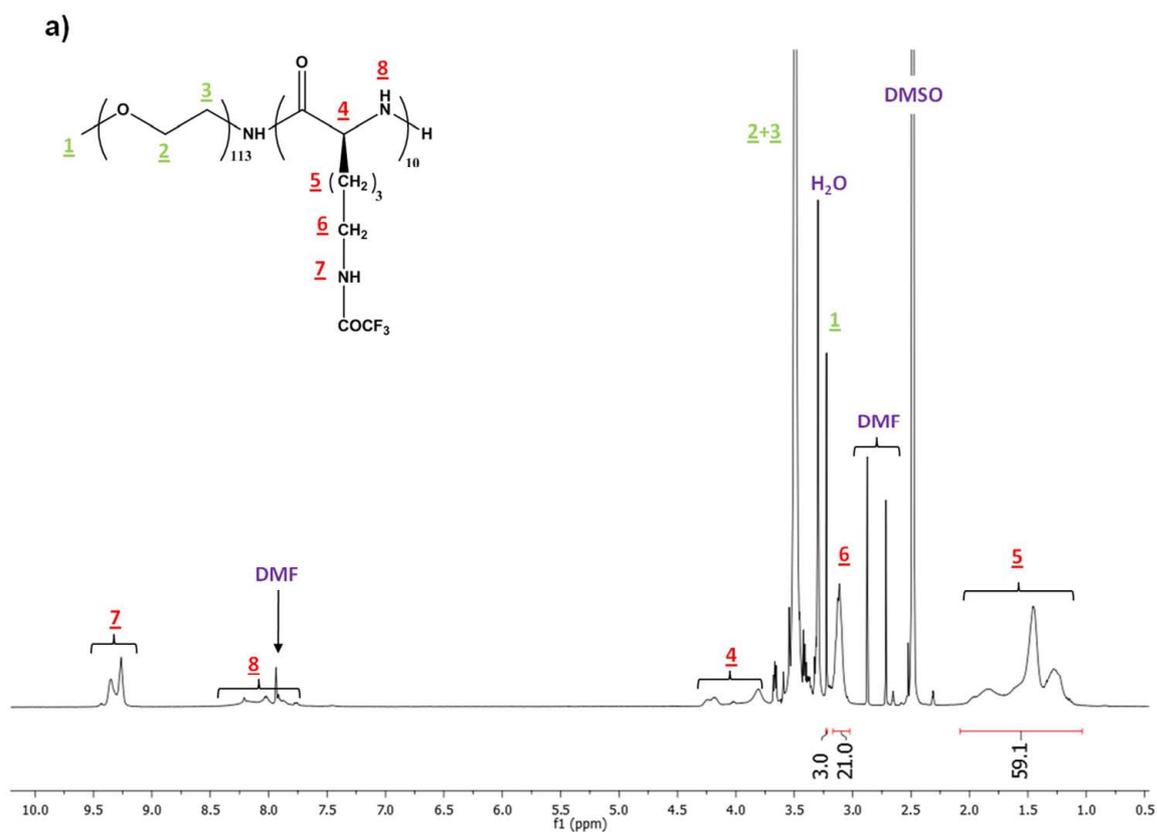
PLL block \overline{DP} values determined with the unprotected polymer form ¹H NMR differ from the ones determined considering the protected polymers form spectra, this difference being larger for copolymers having more PO content.

The observed difference may be attributed to variation in the solvency of the polyether blocks, those peaks being used as reference for the determination of the PLL block \overline{DP} . If their solvency decreased, the PLL block \overline{DP} would be overestimated. For ¹H NMR analysis a quite high polymer concentration is needed (20 mg/mL). As the polyether blocks displayed an LCST and this phenomenon being concentration-dependant, increasing concentration up to 2% w/w would shift the LCST toward lower values, e.g. around 25°C for P(EO₆-*co*-PO₂₉) blocks.

Thus, in the NMR analysis conditions (concentration, temperature) the solvency of the polyether block should be less, especially for polymers displaying the highest PO content. This could make increasing the inaccuracy on the PLL block \overline{DP} values. Therefore, the value considered in this study was the value determined from the TFA-protected form of the copolymers.

Table S1. Degree of polymerization n of PLL blocks within copolymers as determined by ^1H NMR of either protected or unprotected polymer forms.

	PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL _{n}	P(EO ₃₁ - <i>co</i> -PO ₁₀)- <i>b</i> -PLL _{n}	P(EO ₆ - <i>co</i> -PO ₂₉)- <i>b</i> -PLL _{n}
Protected form	10	13	10
Unprotected form	10	14.5	17



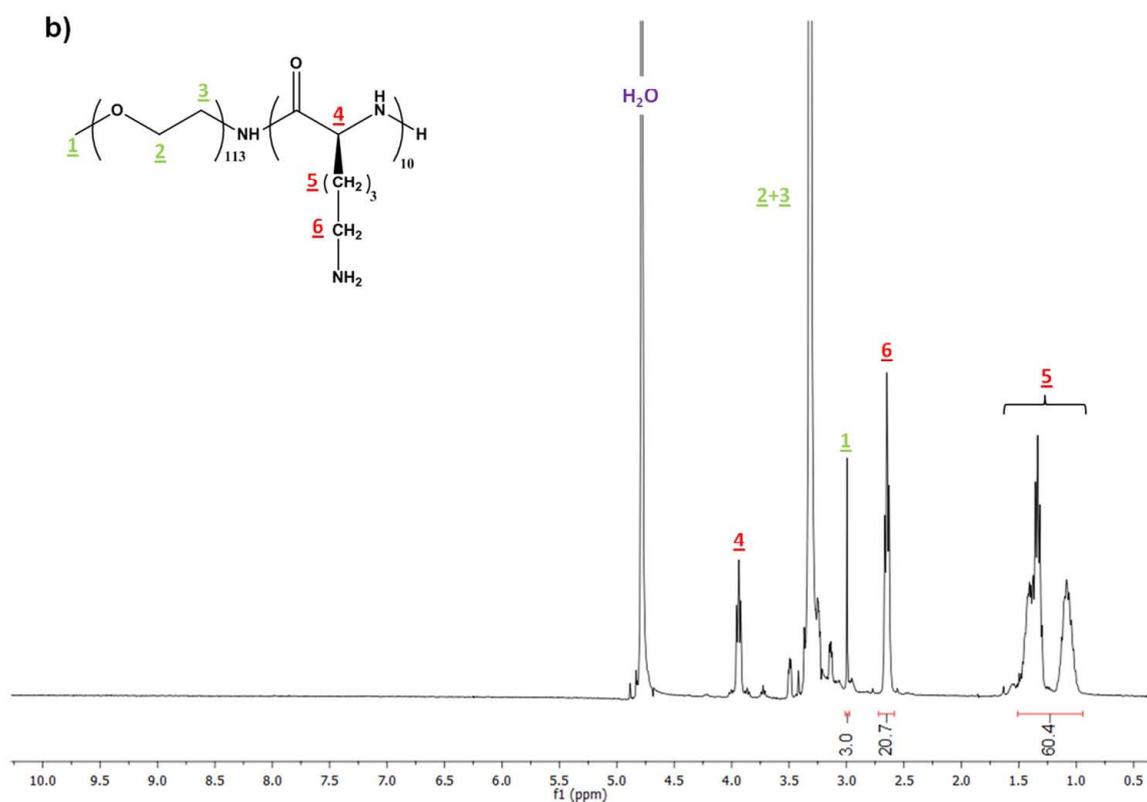
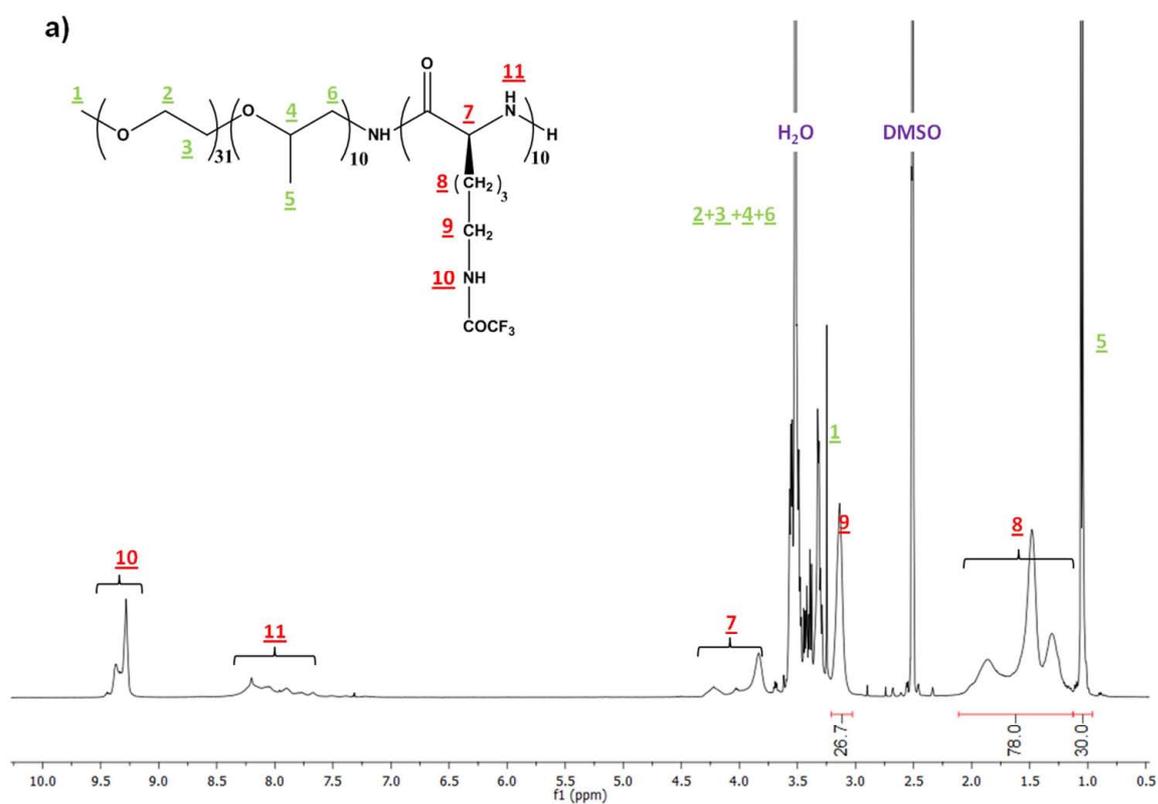


Figure S1. ^1H NMR spectra of (a) PEO₁₁₃-*b*-PTFALL_n in d₆-DMSO and (b) PEO₁₁₃-*b*-PLL_n in D₂O with DCI



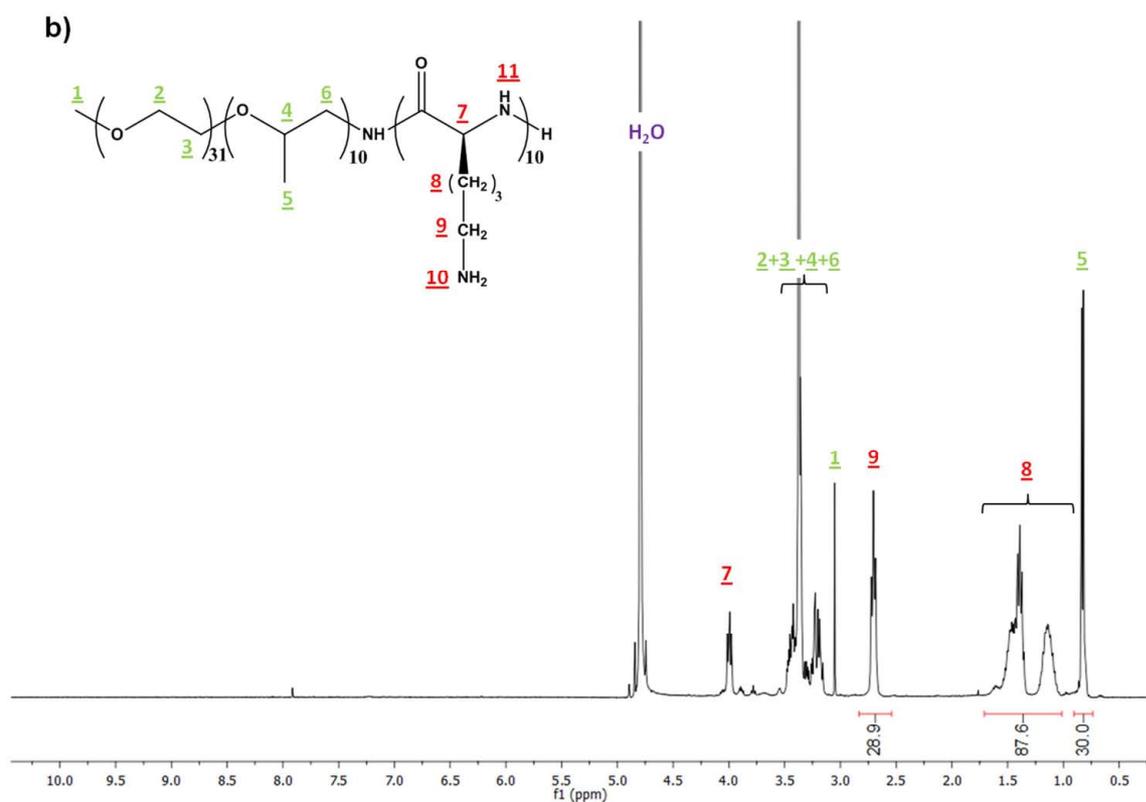
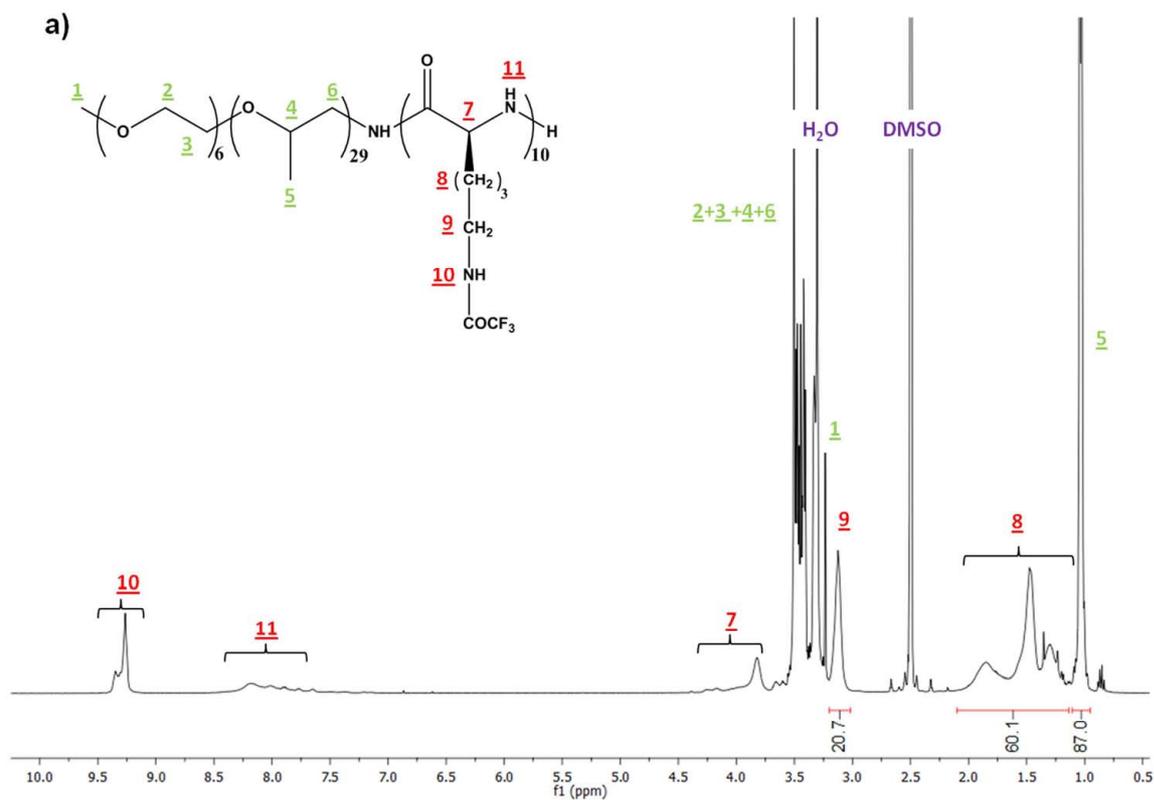


Figure S2. ^1H NMR spectra of (a) $P(\text{EO}_{31}\text{-co-PO}_{10})\text{-b-PTFALL}_n$ in $\text{d}_6\text{-DMSO}$ and (b) $P(\text{EO}_{31}\text{-co-PO}_{10})\text{-b-PLL}_n$ in D_2O with DCI



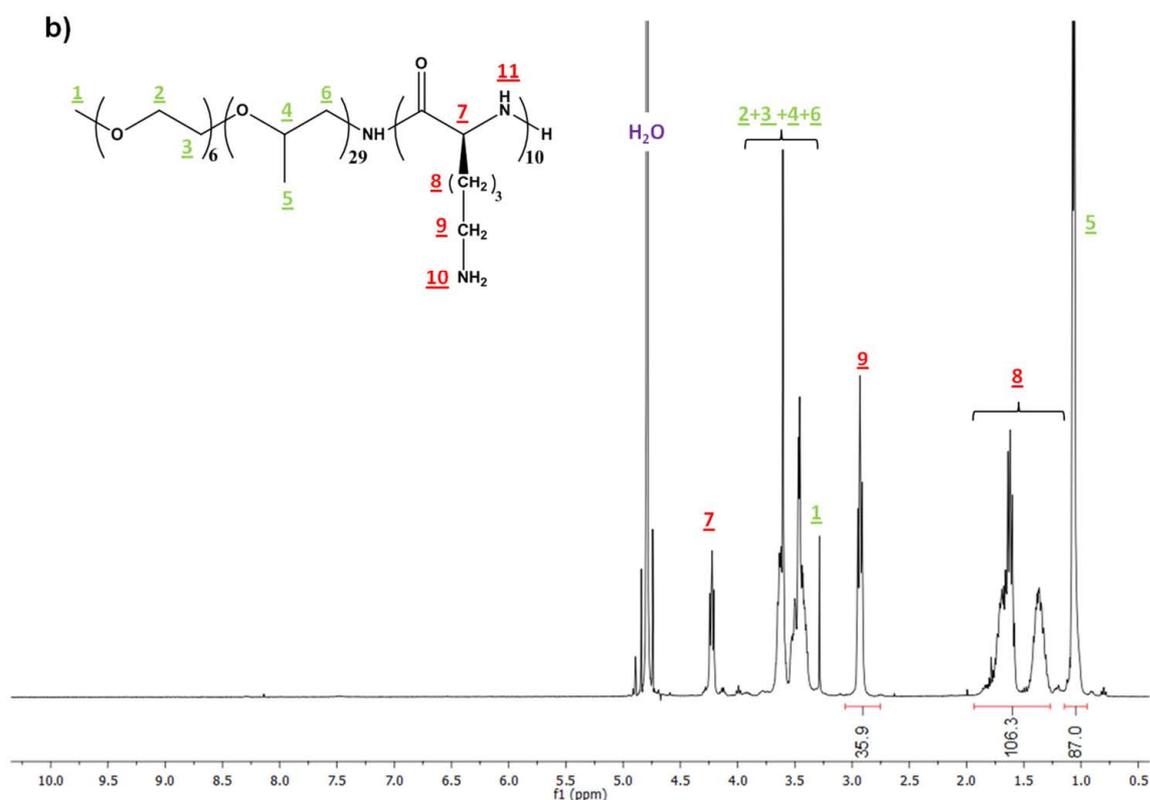


Figure S3. ^1H NMR spectra of (a) $\text{P}(\text{EO}_6\text{-co-PO}_{29})\text{-b-PTFALL}_n$ in $\text{d}_6\text{-DMSO}$ and (b) $\text{P}(\text{EO}_6\text{-co-PO}_{29})\text{-b-PLL}_n$ in D_2O with DCl .

6.2.2 Conductimetric titration

Conductimetric titration experiments were conducted to confirm the $\overline{\text{DP}}$ of the PLL blocks (Figure S4). BCP were dissolved in water (0.1 – 0.2% w/w) with 5 mM of NaCl under overnight stirring, then the pH was adjusted below 5 by addition of a 0.1 M HCl solution. Titration experiments were carried out using 0.1 M volumetric NaOH standard and an equilibration time of 4 min after NaOH addition was applied.

The parts 1, 2 and 3 of the conductimetric profiles refer to the titration of the excess of acid, the titration of PLL blocks within the copolymers and the addition of NaOH in excess, respectively.

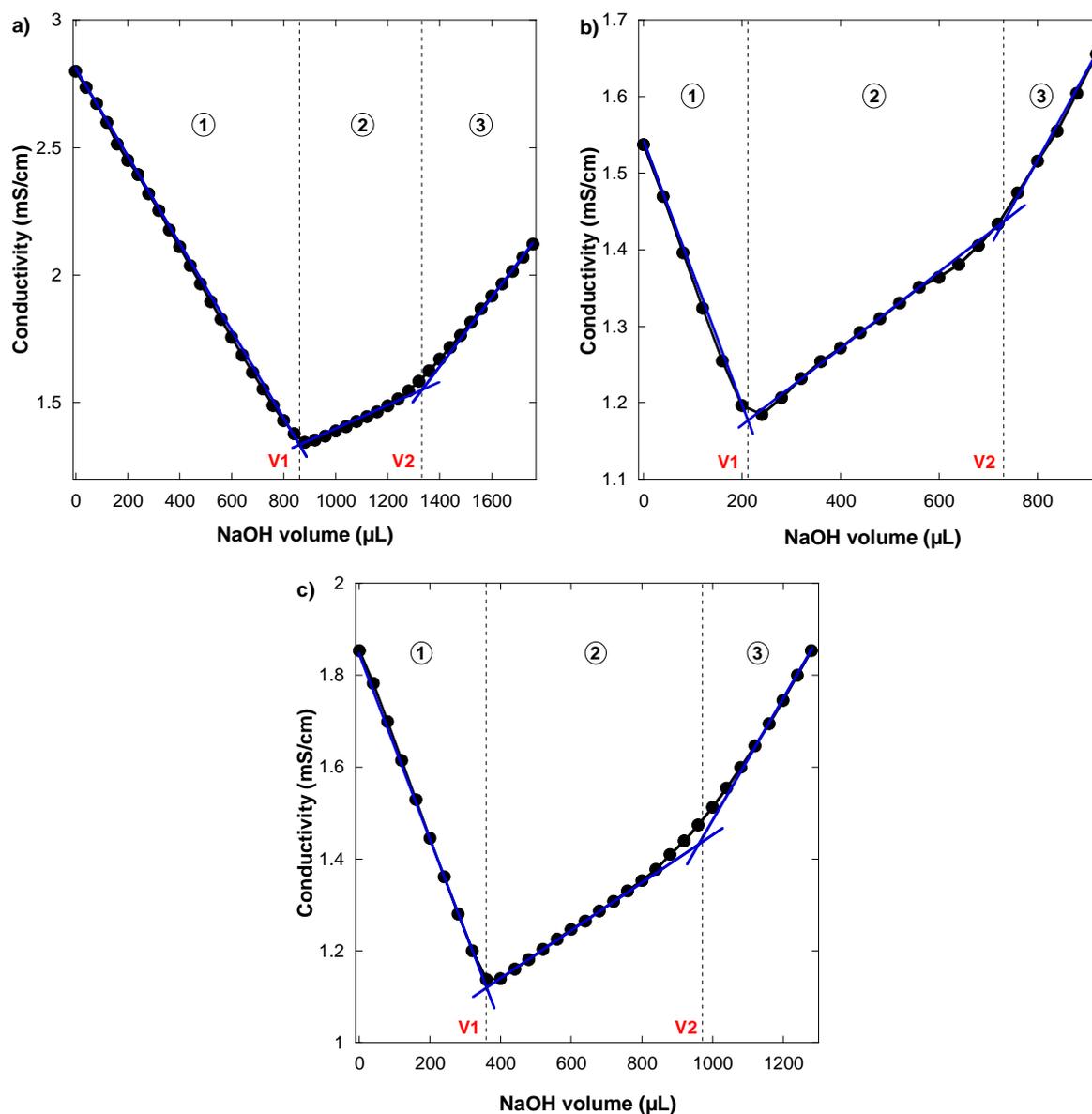


Figure S4. Conductimetric titration curves of (a) PEO₁₁₃-*b*-PLL_n, (b) P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PLL_n and (c) P(EO₆-*co*-PO₂₉)-*b*-PLL_n at RT – Blue lines are used to define the start (V1) and the end (V2) of the PLL blocks titrations.

\overline{DP} of PLL blocks within copolymers were calculated using the following equation :

$$\overline{DP(PLL)} = \frac{n_{OH^-} * M_{Polyether}}{(m_{BCP} - M_{LL} * n_{OH^-})}$$

where m_{BCP} refers to the block copolymers masses, $M_{Polyether}$ and M_{LL} to polyether block molar mass and the lysine monomer unit molar mass (129 g/mol), respectively. n_{OH^-} refers to the amount of NaOH added for the lysine block titration.

Results are gathered in Table S2 and are in good agreement with ¹H NMR findings (Table S1).

Table S2. Degree of polymerization n of PLL blocks within copolymers as determined by conductimetric titration at RT.

	m_{BCP} mg	Titration start μL	Titration end μL	n
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL _{n}	31	870	1350	9.6
P(EO ₃₁ - <i>co</i> -PO ₁₀)- <i>b</i> -PLL _{n}	15	210	760	12.8
P(EO ₆ - <i>co</i> -PO ₂₉)- <i>b</i> -PLL _{n}	20	360	980	10.2

6.3 Doxorubicin stability in aqueous media

6.3.1 Effect of the buffer nature

Doxorubicin (Figure S5) is an anthracycline anticancer drug that is indicated for many different types of cancer. The primary amine beard by the sugar moiety (pKa 8.25) makes rise its hydrophilicity when pH decreases. DOX loading in the polymer shell of BCP-coated MNPs was achieved by simple incubation method at neutral pH in buffer and in controlled temperature environment.

DOX stability in aqueous medium as a function of experimental conditions used in this study was monitored by tracking variations of the optical density (OP) at 485 nm or in fluorescence emission (at 590 nm upon excitation at 485 nm).

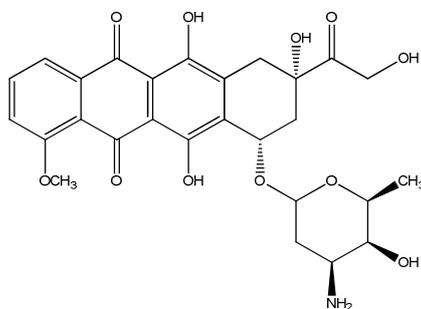


Figure S5. Chemical structure of Doxorubicin

Since the separation of free (unadsorbed) DOX from DOX-loaded MNPs is achieved by centrifugation (11092 g, 30 min, 10°C), the same procedure was applied to blank solutions, *i.e.* DOX solution at several concentrations prepared in PB (pH 7.4, 10 mM) and in Tris (pH 7.4, 25 mM). Initial DOX solutions and supernatants of centrifuged samples were analysed by UV-visible measurement and results are gathered in Table S3.

Table S3. Optic density at 485 nm of DOX solution in PB (7.4, 10 mM) and in Tris (7.4, 25 mM) before and after centrifugation (11092 g, 30 min, 10 °C)

C _{DOX} (µg/mL)	PB (7.4, 10 mM)		Tris (7.4, 25 mM)	
	Initial	Centrifuged	Initial	Centrifuged
116	0.535	0.5	0.953	0.957
232	1.698	1.54	1.809	1.804
500	2.995	1.898	3.375	3.37

Comparing optical densities at 485 nm of these solutions allowed a quantification of the centrifugation-induced aggregation. Unlike DOX solutions in PB, those in Tris buffer did not form aggregates under centrifugation. This may be correlated to the valence of the buffers species. Indeed, PB contained divalent ions that may trigger the aggregation of charged species as it is the case for DOX at neutral pH. Similar experiments were conducted in pure water containing NaCl and no aggregation was observed upon centrifugation. As a consequence, all the experiments with DOX were conducted in Tris buffer.

6.3.2 Doxorubicin titration

DOX loading content (LC) and efficiency (LE) were determined by UV-Visible measurements. Since this molecule is known for undergoing a degradation in aqueous solution, changes in optical density (OD) at 485 nm were monitored in time as a function of temperature (Figure S6). OP varies linearly with DOX concentration up to 90 µg/mL and slightly decreases with time at RT.

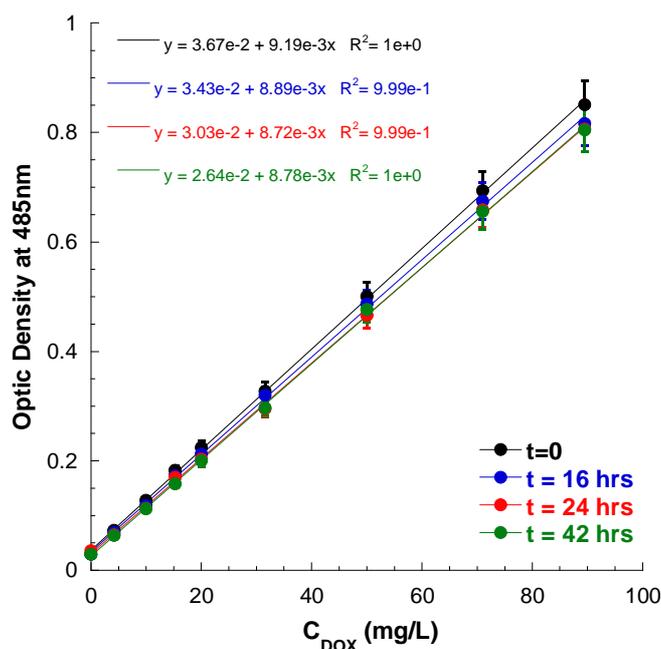


Figure S6. Optic density at 485 nm of DOX solutions in Tris (7.4, 25 mM) at various concentrations and vs. time at room temperature

Incubation of DOX with BCP-coated MNPs was conducted at RT and 50°C. To check the influence of the heating process on DOX stability, DOX blank solutions were heated up to 50°C for 8 hrs and centrifuged (11092 g, 30 min, 10 °C). OD of the initial solutions as well as the supernatants was measured. As seen in Figure S7, no aggregation occurs upon heating and centrifugation steps.

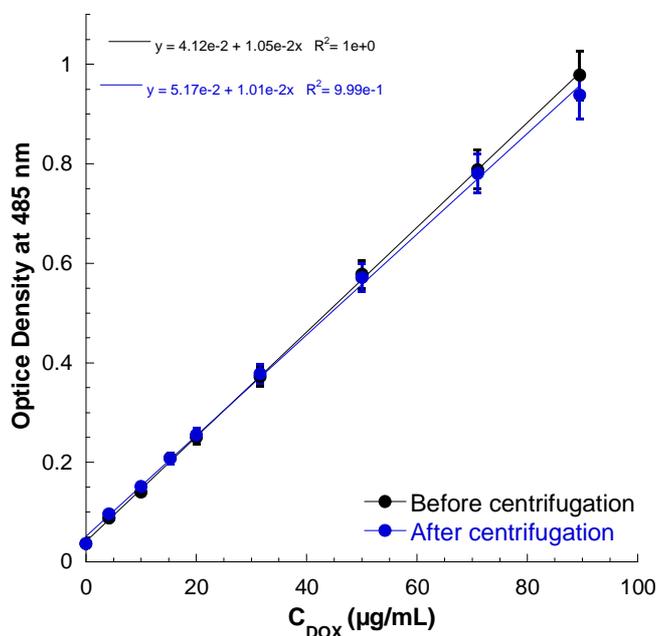


Figure S7. Optic density at 485 nm of DOX solutions in Tris (7.4, 25 mM) at various concentrations after incubation at 50°C for 8 hrs before and after centrifugation (11092 g, 30 min, 10°C).

DOX release was also assessed by fluorescence at 590 nm upon excitation at 485 nm (Figure S8). As observed with UV-visible measurements, the fluorescence intensity varied linearly with DOX amount up to 7 g/L and slightly decreases with time. No significant differences were observed when comparing fluorescence intensity of samples incubating at RT or at 43 °C.

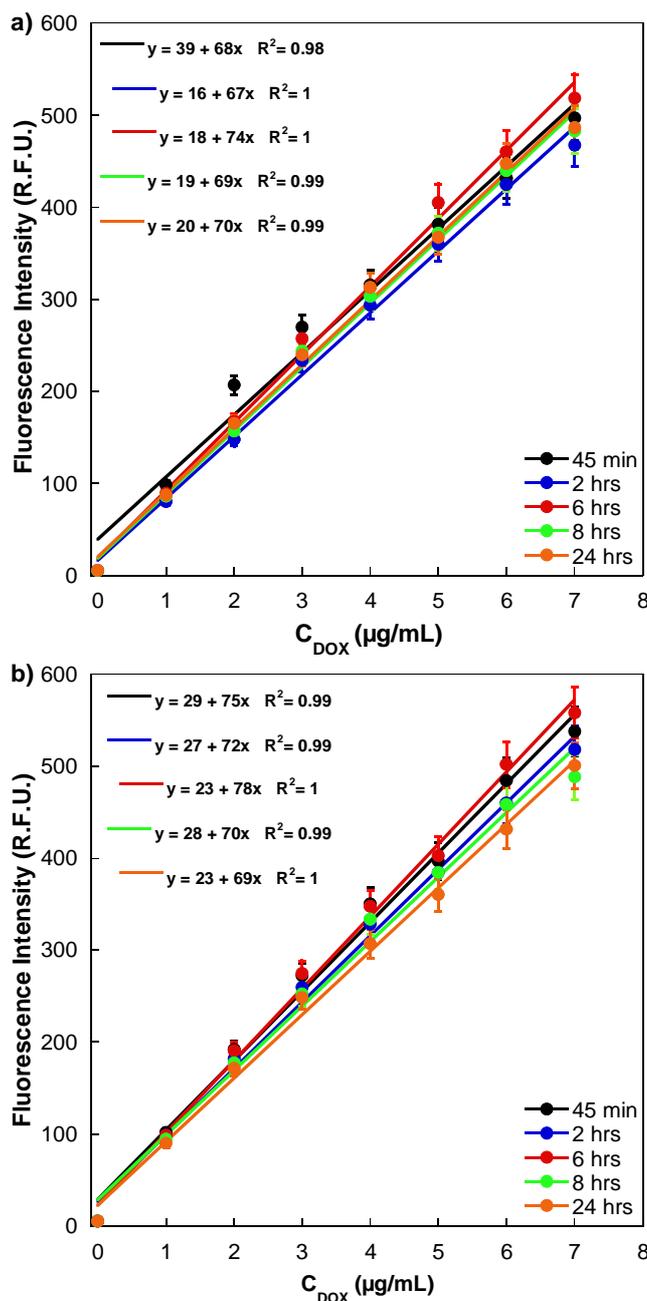


Figure S8. Fluorescence intensity of DOX solutions in Tris (7.4, 25 mM) at various concentrations and different times for RT incubation (a) and at 43 °C (b).

6.4 Drug release setup

The release kinetics were assessed by placing a dialysis bag containing DOX-loaded MNPs into a beaker filled with Tris buffer under magnetic stirring. Experiments were done in air-conditioned room (20 °C) (Figure S9a). For the experiments conducted at 43 °C, the whole assembly was placed in an oil bath (Figure S9b). The temperature was measured into the Tris buffer solution. For the experiments conducted under an alternative magnetic field, the beaker was placed in the center of a coil connected to a generator (Figure S9c).

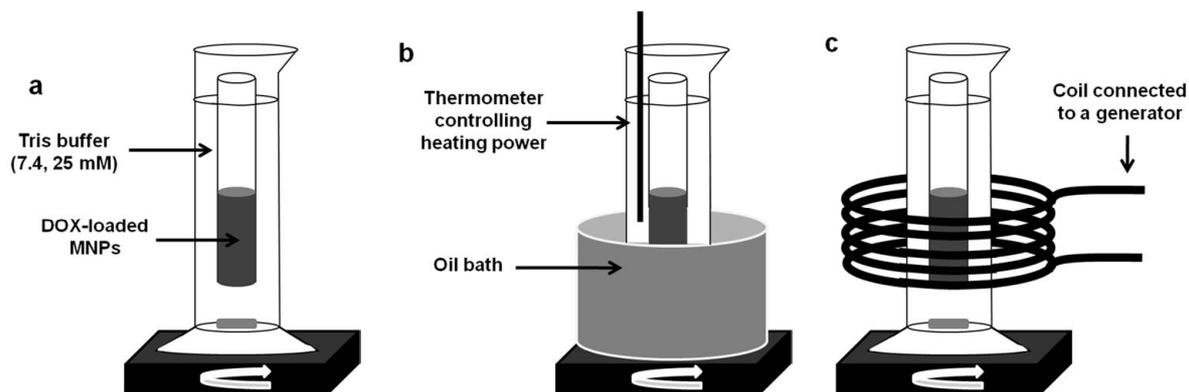


Figure S9. Schematic representation of drug release devices for RT- (a), 43 °C- (b) drug release study and under an alternative magnetic field (c)

6.5 Determination of the polyether-block grafting density on LSMO@SiO₂ MNPs

The adsorption of PEO-*b*-PLL on MNPs gave rise to a typical Langmuir isotherm. From this, the maximal polymer adsorbed amount was determined by fitting data with the Langmuir equation:

$$C_{Ads} = \frac{k \times C_{Ads}^{Max} \times C_{eq}}{1 + k \times C_{eq}}$$

where C_{Ads}^{Max} is the maximum amount of surface-adsorbed molecules, C_{eq} is the polymer concentration remaining free in bulk solution and k is the adsorption constant.

The fitting led to C_{Ads}^{Max} and k values of 0.15 g/g particles and 4.3×10^5 L/mol, respectively. This high value of adsorption constant means that the desorption kinetics was very low, which is consistent with a high affinity type adsorption isotherm.

In a first approximation, MNPs were considered as solid spheres whose surface is derived from their radius and whose weight depends on the material density and volume of one particle. Thus the specific surface is given by:

$$S(m^2/g) = \frac{3}{d \times r}$$

The thin silica layer was neglected and the density of LSMO MNPs was taken to 6.5 g/cm³. The radius is estimated to 27 nm from TEM imaging. The specific surface area was estimated to 17 m²/g. Thus the maximal adsorbed amount is roughly 8.8×10^{-3} g/m², which correspond to 0.84 chains per nm² since the BCP molecular weight is 6290 g/mol.

From this value, the surface accessible to each tethered PEO chain was deduced (1.2 nm^2). Considering the total surface developed by each MNP as a 2D hexagonal compact lattice as seen in Figure S10, the distance between attachment points, noted D , is estimated to 1.2 nm . This value is smaller than the coil size of PEO chains in aqueous solution suggesting that the tethered PEO chains were stretched away from the surface forming a brush.

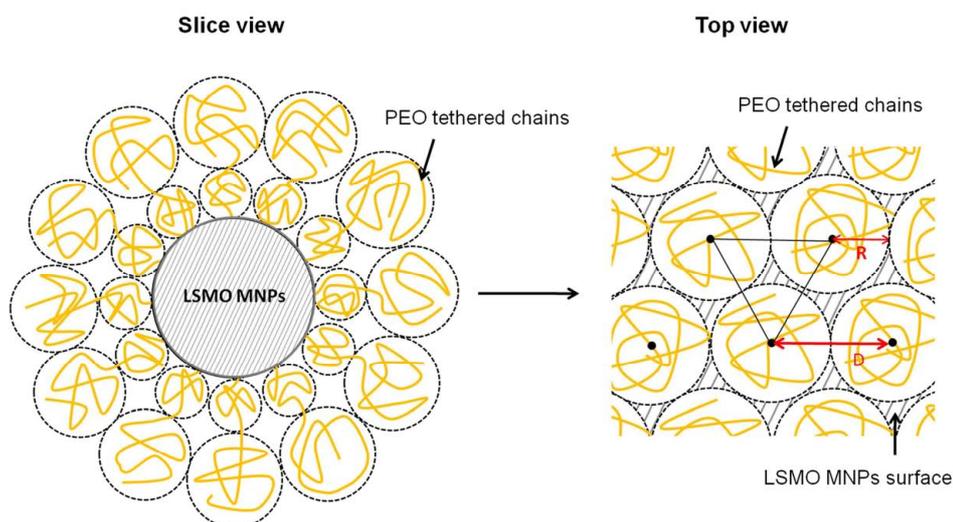


Figure S10. Schematic representation of the available area for each attached PEO chains.

6.6 PEO-coated MNPs stability

The PEO-coated MNPs stability in PB (7.4, 10 mM) was first evaluated by measuring the hydrodynamic sizes at various time scales. As seen in Table S4, the hydrodynamic sizes did not significantly change during at least 12 weeks when stored at RT, suggesting a high colloidal stability.

Table S4. Hydrodynamic sizes of PEO-coated MNPs in PB (pH 7.4, 10 mM) at various time scales.

Time (day)	D_H (nm) (± 10)	PDI
0	163	0.12
1	169	0.13
2	168	0.22
4	173	0.25
6	169	0.23
32	174	0.21
72	180	0.16
82	174	0.17

The PEO-coated MNPs stability was also assessed in a protein rich medium (Fetal Calf Serum at 10% v/v in PB). As seen in Figure S11, no aggregation of PEO-coated MNPs was observed after 24 hrs incubation in the presence of FCS, confirming the presence of a dense PEO brush surrounding the magnetic cores, preventing from protein adsorption and MNPs aggregation. However, a slight increase of the PDI (from 0.11 to 0.12) was observed.

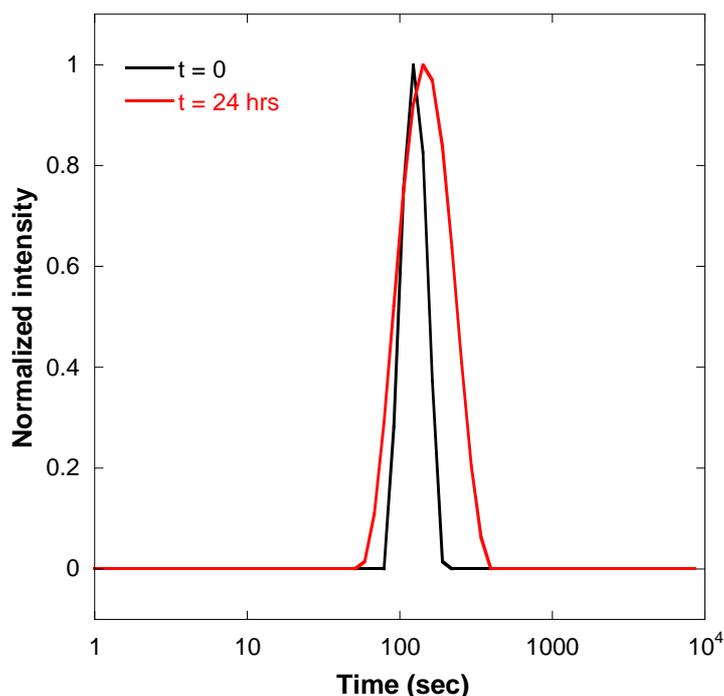


Figure S11. Overlay of the normalized intensity distribution of HMNP in proteins rich media : FCS 10% v/v with PB (7.4, 10 mM).

6.7 dn/dc measurements of PEO-coated MNPs as a function of temperature

The measurement of the refractive index increment (dn/dc) of PEO-coated MNPs was done at 25 and 50°C. As seen in Figure S12a and S11b, each injection of the dispersion was marked by a sharp increase of the differential refractive index until a plateau was reached. Each plateau value was averaged (see dashed areas). The linear regression of the plots of the differential refractive index average values vs. PEO-coated MNPs concentration gave access to an equation whose slope corresponds to the dn/dc value. This dn/dc value increased with temperature suggesting an increase of the nanoparticle compacity.

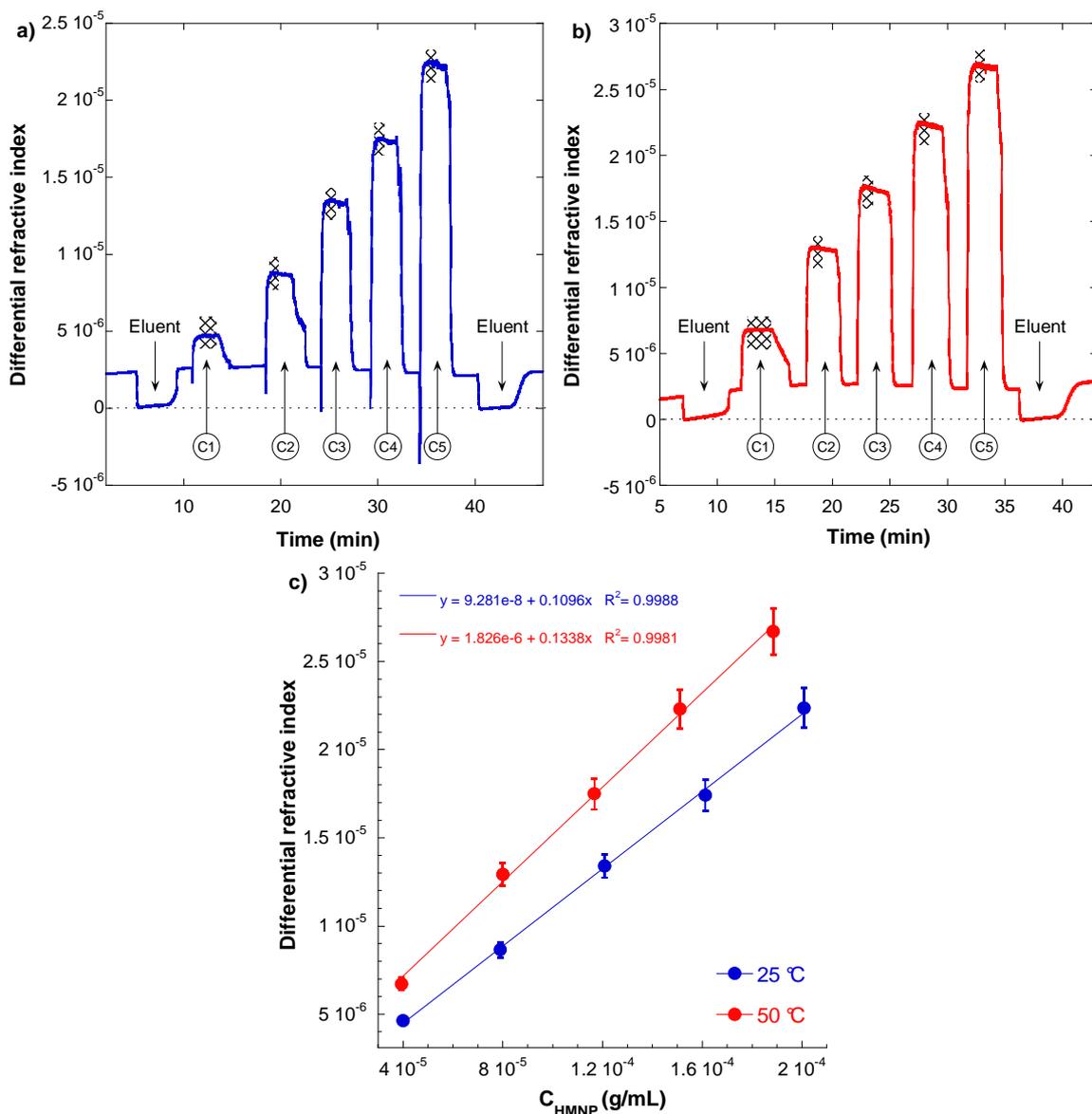


Figure S12. Differential refractive index of PEO-coated MNPs incubated at (a) 25°C and (b) 50°C as a function of concentration; (c) the differential refractive index as a function of the BCP-coated MNPs concentration.

6.8 Adsorption isotherms of PLL-based BCPs onto LSMO@SiO₂ MNPs

Since silica coated manganese based nanoparticles are not-commercially available and adsorption isotherms studies are material-consuming experiments, adsorption isotherms of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀, P(EO₃₁-*co*-PO₁₀)-*b*-PLL₁₃ and P(EO₆-*co*-PO₂₉)-*b*-PLL₁₀ copolymers have been performed using commercial silica nanoparticles. Results are displayed in Figure S13a. The adsorbed amount increased abruptly and the equilibrium concentration reached a plateau. The observed shape is typical of a high affinity type adsorption isotherm and data may be fitted using Langmuir equation which allowed the determination of the maximal adsorbed amounts were found (Figure S13b).

By expressing this value in a molar concentration of peptidic equivalent, it became independent on the composition of the polyether block since similar number of peptidic equivalents adsorbed are found (Table S5). This suggests that the number of adsorbed chains at the silica surface only depends on the lysine length.

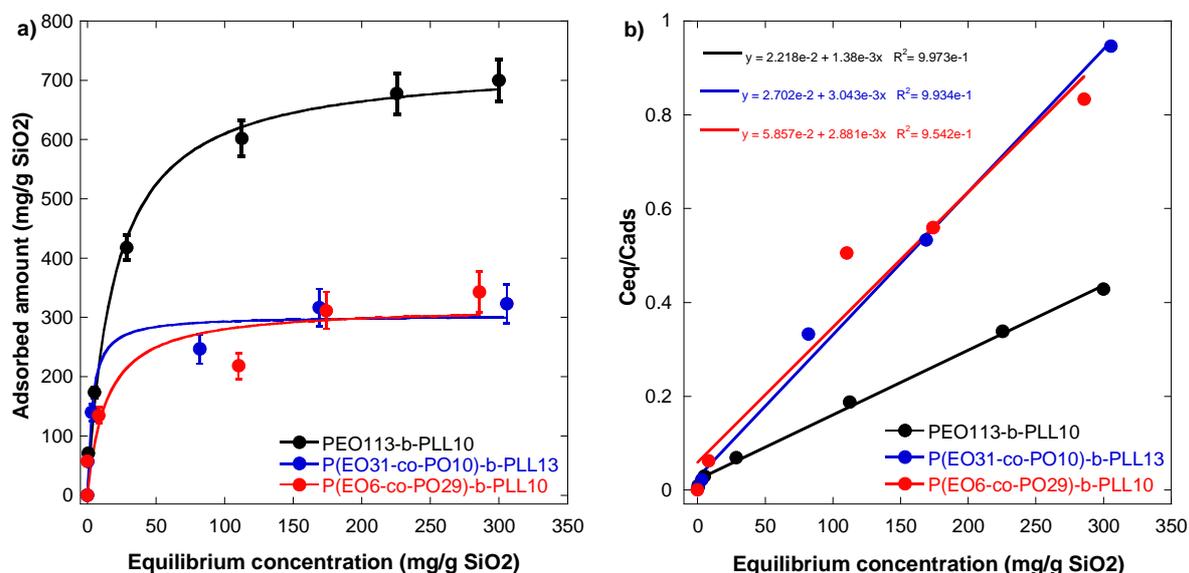


Figure S13. (a) adsorption isotherms of PEO₁₁₃-b-PLL₁₀ and P(EO₃₁-co-PO₁₀)-b-PLL₁₃ and P(EO₆-co-PO₂₉)-b-PLL₁₀ copolymers onto silica nanoparticles in PB (pH 7.4, 10 mM) (b) Langmuir fits.

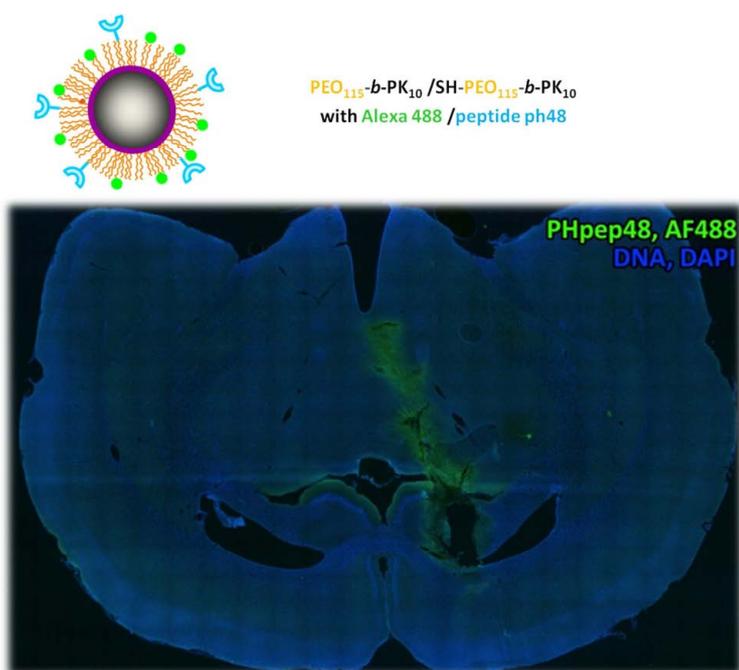
Table S5. Maximal amounts of PEO₁₁₃-b-PLL₁₀, P(EO₃₁-co-PO₁₀)-b-PLL₁₃ and P(EO₆-co-PO₂₉)-b-PLL₁₀ adsorbed on silica particles.

	Maximal adsorbed amount <i>mg/gSiO₂</i>	Maximal adsorbed amount <i>mmol eq. pep./gSiO₂</i>
PEO ₁₁₃ -b-PLL ₁₀	724	1.11
P(EO ₃₁ -co-PO ₁₀)-b-PLL ₁₃	328	1.16
P(EO ₆ -co-PO ₂₉)-b-PLL ₁₀	347	1.04

6.9 References

1. R. Epherre, E. Duguet, S. Mornet, E. Pollert, S. Louguet, S. Lecommandoux, C. Schatz and G. Goglio, *J. Mater. Chem.*, 2011.
2. A. Harada, S. Cammas and K. Kataoka, *Macromolecules*, 1996, **29**, 6183-6188.

Chapitre V. Multifunctional nanoparticles for brain diseases diagnosis



Dans le chapitre précédent nous avons démontré que l'adsorption d'un copolymère à blocs double hydrophile, le poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(L-Lysine) (PEO-*b*-PLL) sur des particules d'oxyde de manganèse enrobées par une couche de silice dans un milieu tamponné (pH 7.4, 10 mM) donnait lieu à des systèmes colloïdaux stables en milieu salin et en présence de sérum fœtal de veau. De plus, nous avons pu déterminer que les chaînes de PEO stabilisant les particules par des forces stériques adoptaient une conformation de type brosse dense (0.84 chaînes/nm²).

Dans ce chapitre, nous avons, dans un premier temps, évalué les propriétés magnétiques des particules hybrides en terme d'induction de chaleur par hyperthermie magnétique et de qualité d'agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique ainsi que la cytotoxicité des nanoparticules en présence ou non de la couronne polymère.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation des nanoparticules hybrides par des fluorophores et des ligands de ciblage. Nous avons développé une stratégie de synthèse d'un copolymère portant à l'extrémité du bloc PEO une fonction réactive permettant la bio-fonctionnalisation de la couronne de polymère. Une des pathologies ciblées dans ce projet était la sclérose en plaque, affection neurologique auto-immune du système nerveux central caractérisée par des pics d'inflammation du céphalée. Ainsi, l'agent de ciblage que nous avons considéré fut identifié par phage-display comme ayant des affinités avec les cellules endothéliales proches des sites d'inflammation chez le modèle animal (étude réalisé par Klaus Petry, Institut de Neurosciences de Bordeaux) L'évaluation de l'efficacité du ciblage des nanoparticules fonctionnalisées a été réalisée *in vivo* par IRM et *ex vivo* par microscopie de fluorescence.

1 Introduction

Over the past decades, nanoparticles (NPs) have proven to enhance the effectiveness of treatments in animal experiments, some being already in the market or in clinical evaluation.¹⁻⁴ Concerning the intravenous administration route, a huge amount of knowledge has been gained about the role of the mononuclear phagocyte system (MPS) in the NPs clearance phenomenon, the chemist solutions to make NPs long-circulating in blood, *i.e.* stealthy with regard to the MPS⁵, and the strategy of active targeting for reaching specific organs. Indeed, in order to increase the plasma half-life of NPs, the first event to avoid is the opsonization process that consists in the adsorption of plasma proteins onto NPs, triggering their recognition by phagocytes.⁶ It is now well-admitted that the control of the physico-chemical properties of the NPs surface, *e.g.* hydrophilicity and electrical charges, is crucial to overcome or delay these biological events,^{7, 8} and that NPs encapsulation in hydrophilic, flexible and non-ionic corona⁹, generally based on poly(ethylene oxide)^{10, 11} (PEO), polysaccharides¹²⁻¹⁴ or surfactants¹⁵, is particularly efficient. Additionally, grafting biorecognition molecules (ligands) onto NPs aims at increasing selective cellular binding and internalization through receptor-mediated endocytosis. Without the incorporation of targeting ligands, NPs internalization relies on non-specific interactions with cell membranes, that can be few when covered by protective layer.¹⁶ The design of NPs for brain diagnosis or therapy remains very challenging since the blood-brain barrier (BBB) exhibits a very low permeability.^{17, 18} The BBB is indeed a diffusion barrier essential for the normal function of the central nervous system (CNS). The BBB's endothelial cells differ from the ones in the rest of the body by the absence of fenestrations, more extensive tight junctions and sparse pinocytic vesicular transport. Endothelial cell tight junctions limit the paracellular flux of molecules and nanoparticles across the BBB.¹⁹ Additionally, even if molecules can pass through, the effective efflux pump system makes them pumped back into the blood stream.^{20, 21} Consequently, very few compounds can be efficiently transported into the CNS compromising the development of efficient diagnostic or therapeutic strategies for brain pathologies.¹⁸ Various types of nanoparticles have been designed to target drug into the CNS.^{22, 23}

To enhance the BBB crossing, specific ligand has been selected by phage display for having affinity with neuro-inflammatory sites. For confidential issues, the sequence is not revealed.

Lastly, biomedical imaging technologies have significantly progressed over the last years allowing observations and diagnoses at the organ, cell and molecule levels. These include X-ray computed tomography (CT), optical and fluorescence imaging, magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET), single-photon-emission computed tomography (SPECT).²⁴ Because each technique has its own strengths and weaknesses, their combination open the avenue to multimodal imaging modalities. As a single example, MRI is one of the most powerful non-invasive techniques to diagnose living organisms, but its resolution is at the millimeter level. On the other hand, epifluorescence imaging exhibits a very high sensitivity, but it is hindered by intrinsic limitations such as tissue absorption, scattering and autofluorescence.²⁵

Thus the combination of an MRI contrast agent with a fluorescent dye in a single NP would be suitable for dual imaging.²⁶⁻²⁹ Moreover, the conjugation of targeting moieties could endow it with molecular imaging.³⁰

Among the research groups that have investigated and reported the design, preparation and preliminary evaluation of multifunctional NPs for *in vivo* purposes, we developed core-corona NPs combining inorganic magnetic cores with derivatizable PEO-based coronas^{26, 31} (see chapter 4). Silica-coated lanthanum strontium manganese oxide magnetic nanoparticles $\text{La}_{0.82}\text{Sr}_{0.18}\text{MnO}_3@\text{SiO}_2$ (LSMO@silica MNPs) were chosen to act as MRI contrast agent and/or thermoregulated hyperthermia mediator.^{26, 32} We demonstrated that they can be efficiently coated with PEO through the adsorption of double hydrophilic PEO-*b*-poly(L-lysine) (PEO-*b*-PLL) block copolymers, by electrostatic interactions between positively-charged amino groups of the PLL blocks and the negatively-charged silica coating (see chapter 4). As a result, the PLL blocks are strongly adsorbed onto the silica surface while PEO chains provide efficient steric stabilization. The resulting MNPs are electrically neutral and well-dispersed in physiological conditions with a narrow size distribution. The high PEO grafting density (0.84 chain/nm²) makes these MNPs highly stable even in protein rich environments (see chapter 3). Additionally, these PEO-coated MNPs exhibit high doxorubicin loading capacity as well as the ability to release it readily in alternative magnetic fields (AMF) (see chapter 4).

We report here on further developments for pathologies involving the BBB crossing. PEO-coated MNPs were specifically labeled with the cyclic nona-peptide “ph48”, specific for brain inflammatory regions, and a fluorescent probe through the co-adsorption of end-functional PEO-*b*-PLL macromolecules (Figure 1). These MNPs were carefully studied from the view point of their cytotoxicity, ability to enhance MRI contrast and label cells in fluorescence imaging. Finally, their ability to diagnose *in vivo* brain inflammations in rats is evaluated both by MR and fluorescence imaging techniques, demonstrating their multi-functionality behavior.

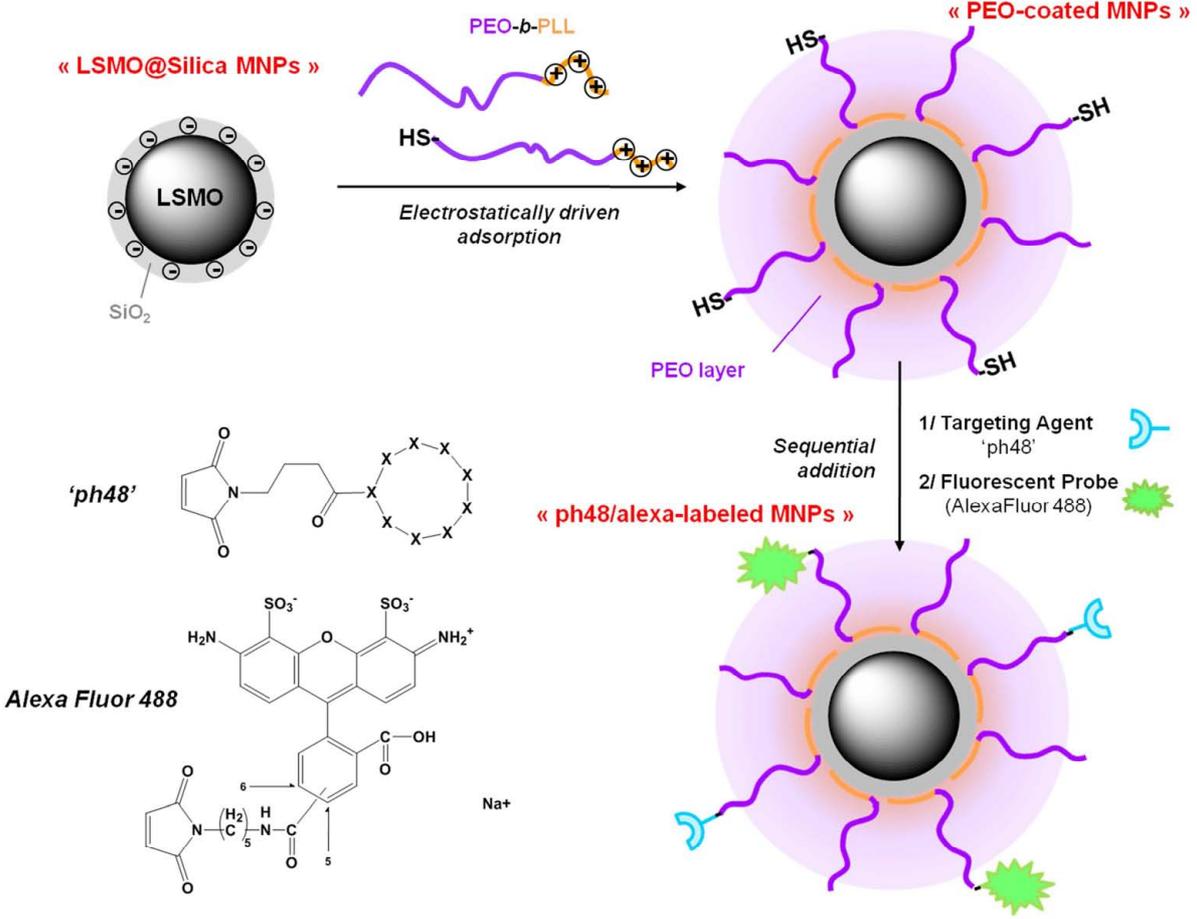


Figure 1. Scheme of the preparation of multifunctional MNPs used in this study.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Dimethylformamide (DMF, Scharlau, 99.9%) was dried over molecular sieves (3 and 4 Å) and cryodistilled prior to use. Amino-terminated PEO and α - ω -amino, trityl-protected sulfhydryl PEO (\overline{M}_n 5000 g/mol) purchased from Rapp polymer were dissolved in dioxane and lyophilized to remove water traces. Trifluoroacetic acid (TFA, Acros Organics, 99% extra pure), ϵ -trifluoroacetyl L-lysine *N*-carboxyanhydride (TFA L-Lys NCA, Isochem, +96%) and 1,2-Ethanedithiol (1,2-EDT, Fluka) were used as received. Phosphate buffer (7.4, 10 mM) was prepared from sodium phosphate dibasic dehydrate (Fluka, > 99%) and sodium phosphate monobasic monohydrate (Sigma, > 99%). Fluoresceine-5-maleimide and AlexaFluor 488 C5-Maleimide (Invitrogen) were reconstituted in anhydrous DMSO at 25 mg/mL and 1 mg/mL, respectively, aliquoted and stored at -20 °C. The targeting peptide "ph48", identified by phage display by Antoine Vekris from INS, and cyclic RGD were purchased from Eurogenetec and reconstituted in anhydrous DMSO (5 mg/mL), aliquoted and stored at -20 °C. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide was purchased from Sigma Aldrich (97.5 %) and stored at 4°C.

LSMO@SiO₂ MNPs were provided as an aqueous dispersion with a concentration of 5.6 g_{LSMO}/L. The chemical composition of the LSMO core was La_{0.82}Sr_{0.18}MnO₃ and their mean diameter was 54 nm. The silica coating thickness was estimated to be 5 nm. The determination of their T_C according to the Arrott plots method led to a value of 315 K (42°C). They were prepared according to a previously reported protocol based on the glycine nitrate process and a subsequent silica encapsulation stage, whose protocols are fully described in the Electronic Supplementary Information section {Epherre, 2011 #1}.

2.2 Synthesis of PEO-based block copolymers

According to a procedure already described, both PEO-*b*-PLL and HS-PEO-*b*-PLL copolymers were synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of TFA L-Lys NCA, initiated by an amino end-functionalized PEG or by an α - ω -amino trityl-protected sulfhydryl PEO, respectively.^{33, 34} Removal of the labile TFA protecting group of L-lysine residues was achieved by treatment with KOH (1.5 equiv.) in THF at room temperature (RT) for 24 hrs. THF was removed by rotary evaporation and the product precipitated in cold diethyl ether and dried overnight under dynamic vacuum. For the HS-PEO-*b*-PLL block copolymer, the trityl protective group was removed by dissolving the block copolymer in trifluoroacetic acid (10% w/w) containing 5% v/v of 1,2-EDT. After 4 hrs, a large excess of water was added. The reaction mixture was concentrated by evaporation and dialyzed again deionised water to remove salts. Water was evaporated by rotary evaporation and the copolymer was redispersed in THF before precipitation in cold diethyl ether. The solution was centrifuged, the liquid was removed and the powder was dried under vacuum for 24 hrs.

It is worth noting that both these compounds cannot directly be solubilized in 10 mM phosphate buffer (PB) because of remaining traces of KOH. Therefore, the polymer powder was dispersed in PB(7.4, 10 mM) and, after overnight stirring, the pH was adjusted to 7.4 with HCl 1 M.

2.3 Co-adsorption of PEO-based copolymers on LSMO@silica MNPs

The formation of PEO-coated MNPs is based on simple equivolume mixing of block copolymers solution in PB(7.4, 10 mM) (1.5 g/L) with LSMO@silica MNPs (5.6 g/L). After 24 hrs of gentle stirring, suspension was centrifuged (2291 g, 30 min, 10 °C) and resuspended in PB to remove the excess of unadsorbed block copolymers.

2.4 Peptide and dye labeling of PEO-coated MNPs

Sulfhydryl reactive molecules (peptides and fluorescent dyes) dissolved in anhydrous DMSO were added to PEO-*b*-PLL/HS-PEO-*b*-PLL-coated MNPs suspension (0.28% w/w) in PB (pH 7.4, 10 mM). After 4 hrs, the suspension was centrifuged (2291 g, 30 min, 10°C) and resuspended in PB to remove the excess of sulfhydryl reactive molecules.

Cyclic RGD and Fluorescein compounds were used as model peptide and fluorescent probe, respectively, for adjustment experiments. For quantifying the coupling efficiency, since no direct method is available to quantify the number of peptide grafted at the particles surface, an indirect titration is done : a stock solution of thiolated PEO-coated MNPs was prepared and divided in two equal aliquots. To one of them, 0.13 eq. of peptide (with regards to the number of thiol groups in the suspension) was added. After 24 hrs, 3.7 eq. of fluorescein were added to both suspensions. After 24 hrs suspensions were centrifuged (11092 g, 30 min, 10°C) and supernatants containing only free sulfhydryl reactive molecules (Fluorescein and/or cyclic RGD) were titrated by UV-Visible spectroscopy at $\lambda = 490$ nm for fluorescein quantification using a calibration curve ranging from 0 to 1×10^{-4} M in PB. The suspension where only fluorescein was added was used as reference to determine the number of accessible thiol groups. The number of grafted peptide is determined by difference between the two aliquots conditions.

2.5 MRI relaxometry

For the different MNP samples, T_2 relaxivities were measured at 20°C at 4.7 T ($f_{\text{Larmor}} = 200$ MHz) on a research MRI system (Bruker Biospec 47/50, Ettlingen, Germany). The transverse T_2 measurements were acquired using a multiple spin-echo 2D imaging sequence (TR: 10 000 ms; inter echo-time: 5 ms; number of echo images: 256; FOV: 50x50 mm; matrix, 128x128; slice thickness: 1 mm). The relaxivity values r_2 were calculated by linear fits of the relaxation rates $1/T_2$ (s^{-1}) vs. manganese concentration (mM).

The MNPs concentration (M) was estimated from the inorganic material density (6.5 g/cm^3) and transmission electron microscopy radius (27 nm) (Ref pub 3), assuming a spherical shape and neglecting the silica layer.

2.6 Heating experiments

The heating experiments were performed with LSMO@Silica and PEO-coated MNPs suspension in PB ($7.4, 10 \text{ mM}$). The manganese content was $4.2 \text{ g}_{\text{Mn}}/\text{L}$. Sample suspensions (1 mL) were introduced in a glass tubes insulated in an expanded polystyrene mantle and placed in a coil connected to a generator (Celes inductor C97104) with a magnetic field amplitude of 88 mT and a frequency of 108 kHz . Temperature was monitored by an optical fiber probe (Luxton STF-2, BFi OPTiLAS SAS).

2.7 Cell culture and cytotoxicity assay

Cell culture experiments were performed on embryonic microglia clone 5 cell lines (CHME5), grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% fetal calf serum in a water-saturated incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 . Cells were seeded at a density of 15×10^4 cells/well in 24 well transparent plates and incubated for different times with MNPs at several concentrations. The cell viability was determined by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay, based on the measurement of the dehydrogenase activity of viable cells by the reduction of the tetrazolium salt MTT to a blue formazan product. A stock solution of 5 mg/mL MTT was prepared in cell culture medium, and at the designated time intervals, 10 % MTT was added and incubated for 45 min at 37°C . The medium was removed, the wells were washed once with 1 mL PBS, and cell pellets were collected in tube by centrifugation (180 g , 5 min). Supernatant PBS was removed and 1 mL DMSO added for solubilization of formazan by centrifugation (180 g , 5 min). Each sample was finally analyzed by spectrophotometry (U-2800A, Hitachi) with absorbance detection at 570 nm . Control samples were performed with untreated cell. In parallel, control cells were collected with a scraper and counted on a Malassez slide after Trypan blue staining.

2.8 Cation leaching studies

10 mg of LSMO and LSMO@silica MNPs were diluted in 10 mL of acetate buffer ($\text{pH } 4$) and gently stirred (Selecta, movil rod) in an thermostated hood at 37°C . After 24 hrs and 48 hrs, 1 mL of suspensions were withdrawn and centrifuged (17968 g , 10 min, 25°C). $900 \mu\text{L}$ of the supernatants are diluted up to 10 mL in deionised water and injected in ICP to quantify by atomic absorption spectroscopy the La^{3+} , Sr^{2+} and Mn^{2+} leaching using calibration curves ranging from 0 to 30, 10 and 20 mM for La^{3+} , Sr^{2+} and Mn^{2+} .

2.9 Neuroinflammation induction

Two rats were anesthetized and immobilized in a stereotactic head holder. The skull was exposed and a drill was used to create a hole in the skull at a point 3-mm posterior and 2-mm right lateral to the bregma. A 0.5-mm microsyringe needle was slowly inserted perpendicularly to the brain surface to a depth of 5 mm. This needle was then used to infuse interleukin solution (IL-1 β LPS). The needle was gently removed after completion of the infusion. Finally the scalp was sutured. After 22 hrs, during which the neovascularization occurred, ph48/alexa-labeled MNPs (or alexa-labeled MNPs for control experiments) suspensions (100 μ L at 2.24 % w/w for fluorescence imaging and 3*200 μ L at 2.24 % w/w for MRI) in PB (pH 7.4, 10 mM) were injected in caudal vein.

The rationale for high dose injected for MRI lied with a presumed intracellular accumulation of MNPs. Since, after 2 hrs, no circulating MNPs had been detected by fluorescence, 200 μ L of the ph48/alexa-labeled MNPs dispersion were injected 3 times along a 3 hrs period to increase the MNPs concentration in the targeted cells.

2.10 In vivo MR imaging

30 minutes after the last ph48/alexa-labeled MNPs injection by IV, MRI of rats were performed using a custom-built MRI coil in a 0.5 T MRI scanner (Bruker Biospec 47/50, Ettlingen, Germany) to visualize MNPs distribution. The T_2^* measurements were acquired using gradient-echo sequence : TE/TR : 20/58 ms, Flip angle : 6.8°, 1 average, total accumulation time : 11 min 52 s, FOV : 35 x 30 x 30 mm, matrix : 192 x 128 x 96, resolution : 182 microns x 234 microns x 312 microns.

2.11 Ex vivo fluorescence imaging

Rats were sacrificed and organs (brain, kidney, lung, spleen and liver) were resected and perfused with PBS (\approx 100 mL) and paraformaldehyde (4 % w/w in PBS). Tissues were treated 18 hrs in PFA (4 % w/w in PBS) then stored in PBS with sodium azide (0.3 % w/w). For histological examination, tissues were cut in 40 μ m thick slices with a vibratom and mounted in Vectashield with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) which was used as nuclear counterstaining. Alexa-labeled MNPs were detected with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 90i). Image capture was done at 10x magnification with NIS software.

3 Results and discussion

3.1 Synthesis of PEO-b-PLL copolymers

A series of biocompatible block copolymers based on PEO as hydrophilic neutral block and pH-sensitive poly(L-lysine) block were synthesized by the ring-opening polymerization of ϵ -trifluoroacetyl-L-lysine *N*-carboxyanhydride in DMF at RT for 40 hrs using amino-terminated PEO or hetero bifunctional α, ω -amino, trityl-protected sulfhydryl-PEO, respectively.^{35, 36} The synthetic route of HS-PEO-*b*-PLL is presented in (Figure 2). The degree of polymerization (\overline{DP}) of the poly(TFA L-lysine) (P(TFALL)) block within the PEO-*b*-P(TFALL) copolymer was determined by comparing the peak integration of end methyl group of PEO ($-\text{CH}_3$, $\delta = 3.217$ ppm) with ϵ -methylene protons of the lysine chain ($-\text{CH}_2$, $\delta = 3.106$ ppm) or with the 6 equivalent methylene protons of the lysine side chain ($(\text{CH}_2)_3$, $\delta = 1.1 - 2$ ppm). For the end-functionalized sulfhydryl version of the block copolymer, the two peaks corresponding to the methylene protons in α - and β - positions of the protected thiol ($-\text{CH}_2$, $\delta = 2.06 - 2.25$ ppm) were used as reference. This allowed determining a \overline{DP} of 10 for each PLL blocks in PEO-*b*-PTFALL and S(Trt)-PEO-*b*-PTFALL. The deprotection reaction by removal of the labile TFA protective groups of L-lysine was confirmed by ^{13}C -NMR through the disappearance of the signal of the fluorinated carbon (CF_3 : $\delta = 110-120$ ppm) and by ^1H -NMR through the shift of the ϵ -methylene protons of the lysine side chains ($\epsilon\text{-CH}_2$: $\delta = 2.704$ ppm). Also, a shift of the carbonyl signal of the peptide bond was observed comparing the Lys(TFA) form ($\delta = 157$ ppm) with the deprotected Lys form ($\delta = 165$ ppm) which is consistent with an helix to coil transition (Figure 3).³⁷

Triphenylmethyl (trityl) is a common thiol-protecting group used to avoid disulfide bonds formation and to prevent the thiol group from reacting with other sensitive functional groups.³⁸ The deprotection of the sulfhydryl group was carried out in TFA/1,2 EDT mixture for 4 hrs.³⁹⁻⁴¹ 1,2 EDT was added as a reductive agent preventing the formation of disulfide bonds. At the end of the reaction, addition of water to the reaction medium afforded the trapping the trityl carbocation converted into triphenylmethanol. Since, TFA is known to form a maximum boiling azeotrope with water (20.6 % w/w water, boiling at 105.5 °C), the removal of all TFA by rotative evaporation required the addition of a large excess water to the reaction medium. This was verified by ^1H spectroscopy in D_2O with DCI showing the complete disappearance of trityl protons ($\delta = 7.2$ ppm) and the shifts of the α - and β -methylene protons from sulfhydryl group from $\delta = 2$ and 2.3 ppm to $\delta = 2.35$ and 2.6 ppm (Figure 3). These shifts are concomitant with the slight change in negative inductive effect of the group linked to the sulfhydryl. The molecular characteristics of the synthesized block copolymers are summarized in Table 1.

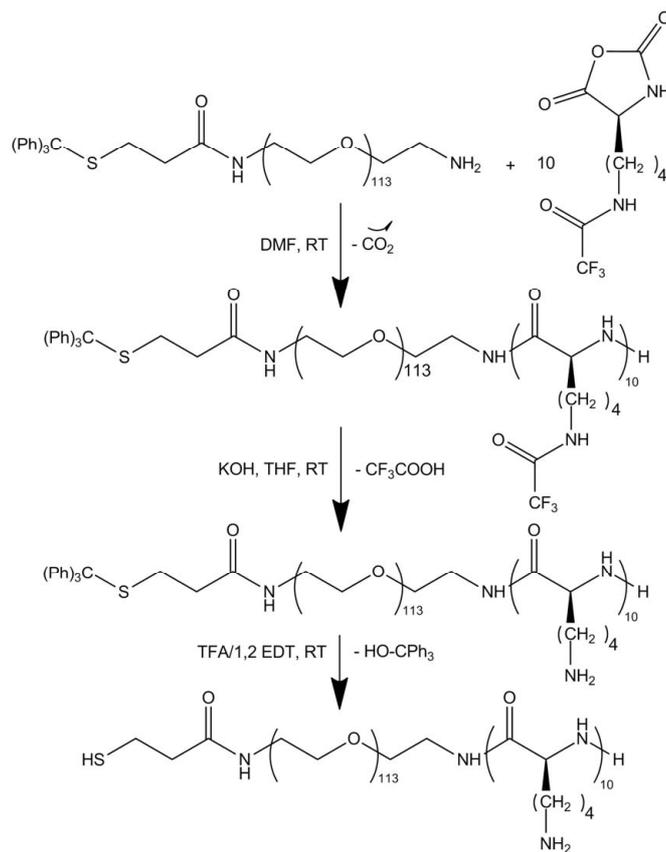


Figure 2. Reaction scheme of HS-PEO113-b-PLL10 copolymer

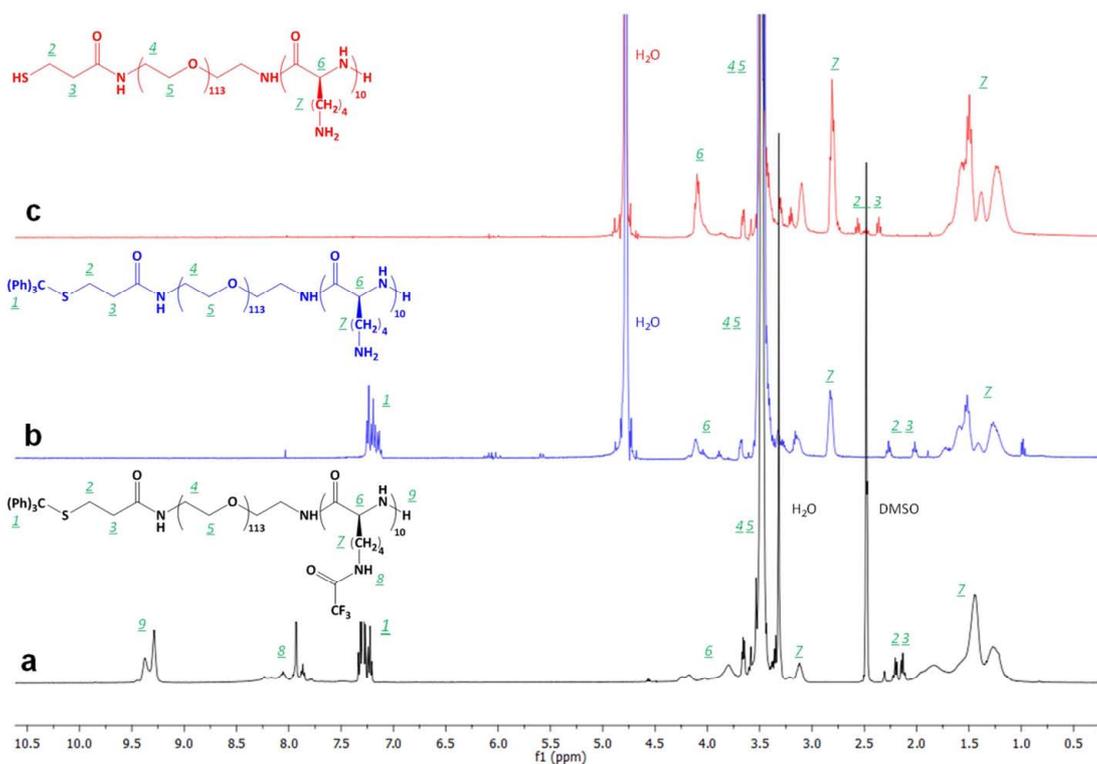


Figure 3. Overlay of ¹H NMR spectra of S(Trt)-PEG₁₁₃-b-PTFALL₁₀ in d₆-DMSO (a), S(Trt)-PEG₁₁₃-b-PLL₁₀ in D₂O with DCI (b) and HS-PEG₁₁₃-b-PLL₁₀ in D₂O with DCI (c)

Table 1. Chemical compositions of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and HS-PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ copolymers

	DP _{PEO}	DP _{PLL}	pdi	Mn
	-	-	-	<i>g/mol</i>
PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀	113	10	1.09	6290
HS-PEO ₁₁₃ - <i>b</i> -PLL ₁₀	113	10	1.14	6310

3.2 Co-adsorption of PEO-*b*-PLL block copolymers onto LSMO@silica MNPs and their derivatization

LSMO@silica MNPs were stabilized by co-adsorption of PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ and HS-PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀. So, the SH groups were introduced at the surface of the PEO brush for the post-functionalization reactions with targeting agents or fluorescent probes. Similar approach was reported with the biotin-derivatized poly(L-lysine)-*g*-poly(ethylene glycol) coating of oxide surface as biosensor⁴², with doxorubicin and maghemite loaded PLGA nanoparticles coated with PLL-*b*-PEO-folate⁴³ or with iron oxide nanoparticles coated with poly(2-hydroxyethyl aspartamide) derivatives that were conjugated with HER2/neu antibody for breast cancer imaging.⁴⁴

Because fluorescent molecules and targeted peptides are rather large as compared to the polymer, the MNPs functionalization was performed after the PEO-*b*-PLL copolymer adsorption, in order to better control the process and its reproducibility. (See supporting information)

In order to estimate the efficiency of the coupling reaction, control experiments were carried out with fluorescein and cyclic RGD. Both compounds bear maleimide group that reacts by thio-alkylation with thiol to generate stable thioether product. Since no direct method enables the quantification of the peptide amount grafted onto nanoparticles, a fluorescent probe was used as indirect measurement.

A stock solution was prepared by co-adsorption of PEO-*b*-PLL / HS-PEO-*b*-PLL (50 % w/w) copolymers onto LSMO@silica MNPs. In a previous reported work, it had been shown that the driving force governing the adsorption of PEO-*b*-PLL based copolymers was the electrostatic attraction between PLL block with negatively charged silica layer and that the composition of the stabilizing block did not affect the grafting density (see chapter 3). Thus, we assumed that roughly 50 % of PEO blocks were ended by a thiol group, because the initial composition of the copolymer mixture was 50 % w/w, which corresponded to roughly 8×10^{-5} mol of thiol group per gram of PEO-coated MNPs. This stock solution was divided into three equal volumes A, B and C, each containing therefore about 3.8×10^{-9} mol of -SH groups. To the solution A, 0.13 eq. (5×10^{-10} mol) of cyclic RGD were added and 3.7 eq. (1.24×10^{-8} mol) of fluorescein 24 hrs later. After 24 hrs, the suspension was centrifuged (11092 g, 30 min, 10 °C) and the supernatant containing free fluorescein was withdrawn and analyzed by UV-Visible spectroscopy for fluorescein quantification.

A similar protocol was applied for the solutions B and C, except that no peptide was added and both peptide and fluorescein were added simultaneously, respectively. Therefore, the experiment on solution B allowed us to determine the total number of thiol groups accessible for the coupling reaction, while the two others allowed to quantify the percentage of peptide functionalization, as a function of reagents addition order (Table 2).

Table 2. Evaluation of the functionalization efficacy of the PEO-coated MNPs

			Solution A	Solution B	Solution C	
HS-PEO-coated MNPs			μL	200	200	200
Day1	Cyclic RGD	eq.	0.13	-	-	
Day2	Cyclic RGD	eq.	-	-	0.13	
	Fluorescein	eq.	3.7	3.7	3.7	
Excess of Fluorescein			mol	9.8×10^{-9}	9.34×10^{-9}	9.41×10^{-9}
Functionalization yield^a ($\pm 2\%$)	Cyclic RGD	%	14	0	2	
	Fluorescein	%	85	100	100	
Coupling yield^b ($\pm 2\%$)	Cyclic RGD	%	90	-	12	

^a : functionalization yield determined by taking solution B as reference; ^b : coupling yield derived from the amount of grafted cyclic RGD and the initial peptide amount.

As seen in Table 2 from the experiment conducted only with fluorescein (solution B), the number of accessible sites was calculated to be 3.1×10^{-9} mol. This value was close to the theoretical one derived from the adsorption isotherm measurement. It means that roughly 80% of the thiol reactive groups were available for their coupling with maleimido-terminated molecules. The efficiency of the binding depended not only on the reactivity of the functional groups but also on their accessibility. The observed deviation may rely on the distribution of thiol reactive groups, which may be partially distributed inside the brush and not entirely at the surface of the PEO layer.

The feasibility of HS-PEO-coated MNPs functionalization with two chemically different molecules was also assessed. A sequential addition (solution A) allowed the quantitative coupling of peptide and fluorescent probe directly onto the particles since 90% of the initial peptide amount was recovered on the particles prior to the binding of fluorescein, corresponding to 14% of the total available –SH groups. Additionally, comparing solutions A and C, it appeared that the simultaneous addition of both compounds favored the binding of fluorescein to the detriment of cyclic RGD. In this case, only 12 % of the initial peptide amount reacts, probably due to its higher molar mass and steric hindrance.

The concentration of peptide ligands at the surface of nanoparticles is a parameter that is known to affect the targeting efficiency and the particles stability.⁴⁵ Increasing the peptide density should increase the recognition process, but also should decrease the stealthy-making role of the PEO corona, resulting in a faster clearance from blood circulation and higher accumulation into liver and kidneys: a compromise between the two effects had to be found.⁴⁶

In the present work, for *in vivo* experiments, the number of targeting peptide was set to 40 per MNP, corresponding to about 0.5 % of total number of tethered chains. This value was chosen to mimic the surface density of spikes on icosahedric adenoviruses (\approx 50-90 nm), which mediates adenoviruses attachment and internalization. For a better fluorescence observation, the probe concentration at the MNPs surface should be as large as possible, provided their presence did not alter the colloidal stability. The effect of increasing fluorescent probe grafted ratio was assessed by DLS (Table 3). HS-PEO-coated MNPs (with 52 % of the total number of tethered PEO chains bearing thiol groups) were prepared and washed by centrifugation to remove the excess (unadsorbed) polymer chains. They exhibited a monomodal size distribution ($D_H = 162$ nm) with a low polydispersity index (PDI = 0.103). Addition of cyclic RGD (2 %) as well as alexa fluor 488 up to 20% did not induce aggregation (Table 3). However, MNPs functionalized with 50% of alexa fluor 488 started to aggregate after coupling ($D_H = 243$ nm) and were never properly redispersed after centrifugation (1466 g, 30 min, 10°C).

Table 3. Dispersion states of PEO-coated MNPS at the different steps of the sequential addition process of cyclic RGD and alexa fluor 488.

Alexa fluor 488 ^a	Step1 : Cyclic RGD addition		Step2 : alexa fluor 488 addition		Step3 : MNPs washing by centrifugation	
	D_H (nm)	PDI	D_H (nm)	PDI	D_H (nm)	PDI
5%			160	0.1	162	0.13
10%	156	0.11	162	0.15	164	0.14
20%			160	0.14	158	0.11
50%			243	0.27	>1000	-

^a : % relative to the total number of tethered chains

3.3 Heating experiments in AMF

Heating experiments were carried out with both PEO-coated and uncoated MNPs suspended in PB at the same manganese concentration and in similar AMF conditions (88 mT, 108 kHz). They revealed that the heating temperature (T_{heat}) course vs. time was not affected by the presence of the PEO corona (Figure 4). Similar curves were indeed observed for both samples: T_{Heat} increased sharply with time before reaching a plateau corresponding to the maximum heating temperature $T_{heat}^{max} = 33^\circ\text{C}$.

The heating efficiency was estimated from the specific absorption rate (SAR) defined as followed:

$$SAR = \frac{C_p}{w} \times \frac{dT_{heat}}{dt}$$

where C_p is the specific heat capacity of the sample and w is the weight fraction of the manganese element.

The $T_{heat} = f(t)$ course and the SAR value are known to depend on not only the parameters of the applied AMF and the magnetic properties of MNPs, but also on the dispersion state of the particles.⁴⁷ The better the dispersion state, the higher the SAR value.^{48, 49} In our situation, both MNPs samples were in a fully dispersed state, as assessed by their small hydrodynamic diameters and low polydispersity indexes (LSMO@silica MNPs : $D_H \approx 120$ nm with $PDI \approx 0.09$ et PEO-coated MNPs : $D_H \approx 151$ nm with $PDI \approx 0.08$). As a consequence, the measured SAR values (13 W/g) at RT are equal.

In such concentration conditions, the observed plateau was not assigned to the Curie temperature (T_C) of the LSMO cores (43°C) which is supposed to act as fuse, but to the thermal balance between the heat released by the MNPs and the heat dissipated because of the imperfect thermal isolation of the calorimeter. But it is assumed that around each MNP the temperature was locally close to T_C and would efficiently increase the release rate of a drug that would be physically entrapped within the polymer shell⁵⁰⁻⁵³, as already reported with this type of MNPs (see chapter 4).

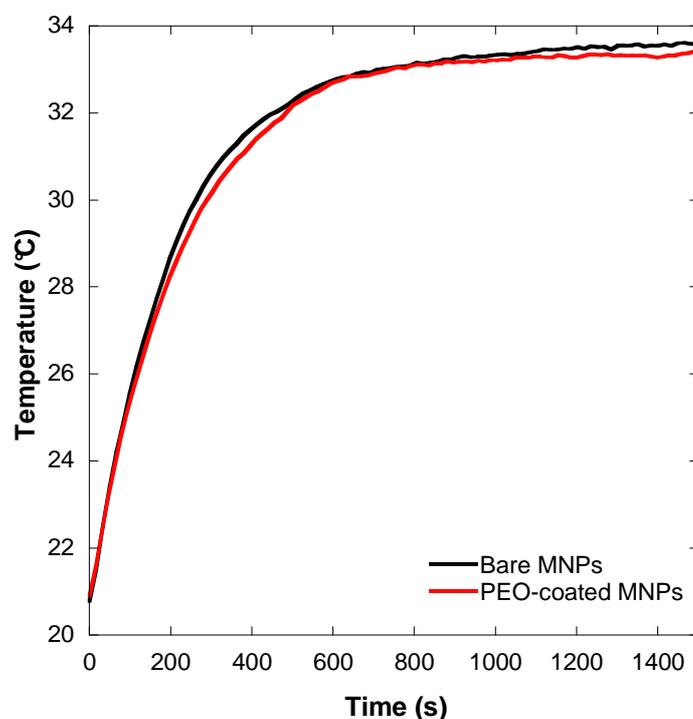


Figure 4. Magnetic heating experiments ($[Mn] = 4.2$ g/L; ac field conditions : 88 mT, 108 kHz)

3.4 MRI relaxometry

LSMO MNPs are known to be capable to alter proton relaxation times.²⁶ The influence of the silica coating and PEO corona was studied at 4.7 T. Usually, the MRI contrasting capability is evaluated by measuring the T_1 (longitudinal relaxation time describing spin-lattice interactions) and T_2 (transverse relaxation time describing spin-spin interactions) relaxation time of the proton spins relaxations. The plots of the relaxation times $1/T_1$ and $1/T_2$ versus total magnetically active compounds concentration (expressed in mM) can be linearly fitted and the slopes represent the relaxivity rates r_1 and r_2 , respectively.

For LSMO, LSMO@silica and PEO-coated LSMO@silica MNPs, r_2 values were measured at 141, 99 and 76 $\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$, respectively (Table 4). These values were also expressed as a function of NPs concentration (nM) which gives a better idea of the contrasting ability of such material and enable comparison with other reported MRI contrast agents. As expected, r_2 was found to depend strongly on the thickness of the coating, confirming that the mean distance between the LSMO cores and water molecules is a crucial parameter. The presence of the silica layer (≈ 5 nm) surrounding LSMO nanoparticles induced indeed a decrease by approximately 30% of the r_2 value, this effect being increased again when the PEO layer was added. These observations are in good agreement with previous reports on $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ coated with silica⁵⁴ or polymeric shell.⁵⁵

To evidence the effect of LSMO cores on T_2 -weighted MR images, Figure 5. shows the dose dependent T_2 map images. A clear negative contrast enhancement, *i.e.* image darkening, was observed even at low MNPs concentration. From these experiments, Gao *et al.* defined the MRI detection limit as the particles concentration at which the MRI signal intensity decreases up to 50% from the value corresponding to pure water.⁵⁶ For LSMO, this value was estimated at 0.24 nM (Figure 5). When LSMO are coated with silica layer, this value is shifted to 0.34 nM and to 0.44 nM when an additional PEO layer is adsorbed (Table 4). These values are similar to the one obtained with poly(trimethylene carbonate)-*b*-poly(L-glutamic acid) based vesicles loaded with hydrophobically modified maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) whose MRI evaluation were performed in a similar manner (apparatus, sequences)⁵⁷.

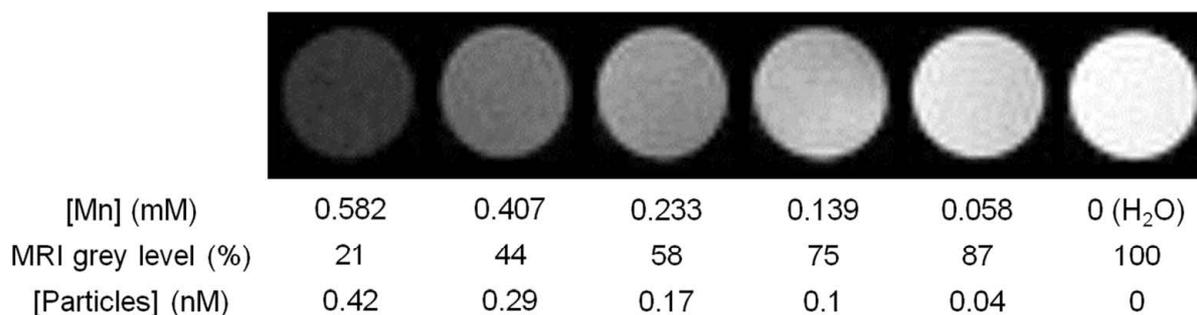


Figure 5. T_2 -weighted MRI images (TE = 40 ms) extracted from T_2 measurements experiments of LSMO MNPs at different dilution factors (b).

Table 4. Transverse relaxation rates (r_2) and MRI detection limit for LSMO, LSMO@silica and PEO-coated MNPs.

	LSMO MNPs	LSMO@silica MNPs	PEO-coated MNPs
r_2 ($s^{-1}.mM^{-1}$) ^a	141	99	76
r_2 ($s^{-1}.nM^{-1}$) ^b	197	138	106
MRI detection limit (nM)^b	0.24	0.34	0.44

^a and ^b are expressed by reference to the manganese concentration and NPs concentration, respectively.

Even if, the acquisition conditions for *in vivo* experiments are very different (sequences parameters, magnetic field homogeneity, ...), the evaluation clearly shows an MRI contrast enhancement induced by MNPs, suggesting their potential use as MRI contrast agent for *in vivo*.

3.5 Cytotoxicity assays

Cytotoxicity assays of PEO-coated and uncoated LSMO@silica MNPs were performed by MTT and cell counting methods on microglia cell lines. First, cytotoxicity-concentration dependence with uncoated MNPs at 24 and 48 hrs were investigated (Figure 6a and b). After 24 hrs of incubation with nanoparticles at 50 mM and 20 mM in Mn, the dehydrogenase activity decreased by 30% from the control experiment (Figure 6a). Below 10 mM in Mn, specific activities, *i.e.* the dehydrogenase activities reported to the number of cells, exceeded 80%. A nearer trend was observed after 48 hrs of incubation, where the dehydrogenase activity as well as the number of cells increased with decreasing the MNPs concentration (Figure 6b). Below 0.1 mM in Mn, the number of cells and the specific dehydrogenase activities exceeded 80%. As a result, we determined a maximal tolerated dose after 24 hrs incubation of about 10 μ M in Mn; this value dropped to 0.1 μ M in Mn after 48 hrs incubation.

Different work reports on cytotoxicity of similar LSMO MNPs: Bhayani *et al.*⁵⁸ reported on cytotoxicity level after 24 hrs of incubation with skin carcinoma (44 μ M in Mn), human fibrosarcoma (22 μ M in Mn) and neuroblastome (177 μ M in Mn) cell lines and Kacenska *et al.*²⁶ reported that up to 350 μ M in Mn, HeLa cells and fibroblast cells lines exhibit more than 80% of cell viability after 48 hrs of incubation. The comparison with our results is however difficult since from an experiment to another cell line, incubation time and evaluation techniques are different. Different cells lines would have different doubling time and toxicity sensitivity. Also depending on the technique used, different level of information are obtained. A correct cytotoxicity evaluation implies the combinaison of different cytotoxicity assays. As an example, XTT assays (method used by Bhayani *et al.*) evaluate the potential disorder of metabolic activity (one of the earliest intracellular events that occurs prior to cells apoptosis⁵⁹) but has to be complemented by cell counting to appreciate the cellular specific activity. Moreover, in the two cited work, no controls and no deviations were reported which compromise the cytotoxicity evaluation.

The relatively high cytotoxicity of these MNPs is most probably due to the leaching of lanthanum, strontium or manganese cations that have been reported to be highly neurotoxic.⁶⁰ Cell compartments involved in the internalization pathway, such as endosome or lysosome, exhibit indeed low pH values (4.5 – 5). We studied the possible leaching of metal cations from LSMO cores as a function of time in acidic conditions (Figure 7). It was shown that at neutral pH, the cation release (La^{3+} , Sr^{2+} and Mn^{2+}) from LSMO@silica MNPs was negligible (data not shown), while it was considerably faster in acidic conditions (pH 4) where a “burst” release was observed during the first two days (Figure 7b). After 48 hrs at pH 4, the released fraction of La^{3+} , Sr^{2+} and Mn^{2+} cations were 35 %, 25 % and 40 %, respectively. The presence of the silica layer decreased this leaching rate without suppressing it since the release fraction of La^{3+} , Sr^{2+} and Mn^{2+} cations from LSMO MNPs after 48 hrs were 78 %, 73 % and 18 %, respectively.

Additionally, the polymer coating cytotoxicity was also assessed using pure silica nanoparticles as substrate for the polymer adsorption (Figure 6c) as a control, and then with LSMO@silica MNPs (Figure 6d). Poly(L-lysine) is actually known for inducing cytotoxicity due to its high positive charges density, this effect being more pronounced for higher molar masses.⁶¹ However, once adsorbed at the nanoparticles silica surface (silica particles and LSMO@silica), no cytotoxicity was observed: after 72 hrs of incubation with PEO-*b*-PLL coated silica nanoparticles, specific dehydrogenase activity as well as the number of cell did not decrease as compared with control experiment. Interestingly, the polymer coating seemed to prevent the slight cytotoxicity induced by silica NPs observed after 72 hrs incubation. A decrease in the dehydrogenase activity (up to 50% compared to control experiment) was observed for pure silica, while the number of cells remained constant. This suggested a loss of the specific dehydrogenase activity induced by a metabolism change of microglia cells. The origin of this phenomenon is not well understood but has already been observed by Brunner et al. who found that silica nanoparticles were nontoxic to human mesothelioma cells and mouse embryonic fibroblast cells within the concentration range of 0–15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.⁶² Chang et al. also reported on high concentration of silica nanoparticles cytotoxicity and suggest that it depends strongly cell metabolic activity.⁶³

Similarly, cells incubated with LSMO@silica and PEO-coated LSMO MNPs at 1 μM in Mn did not show cytotoxicity effect after 48 hrs (Figure 6d).

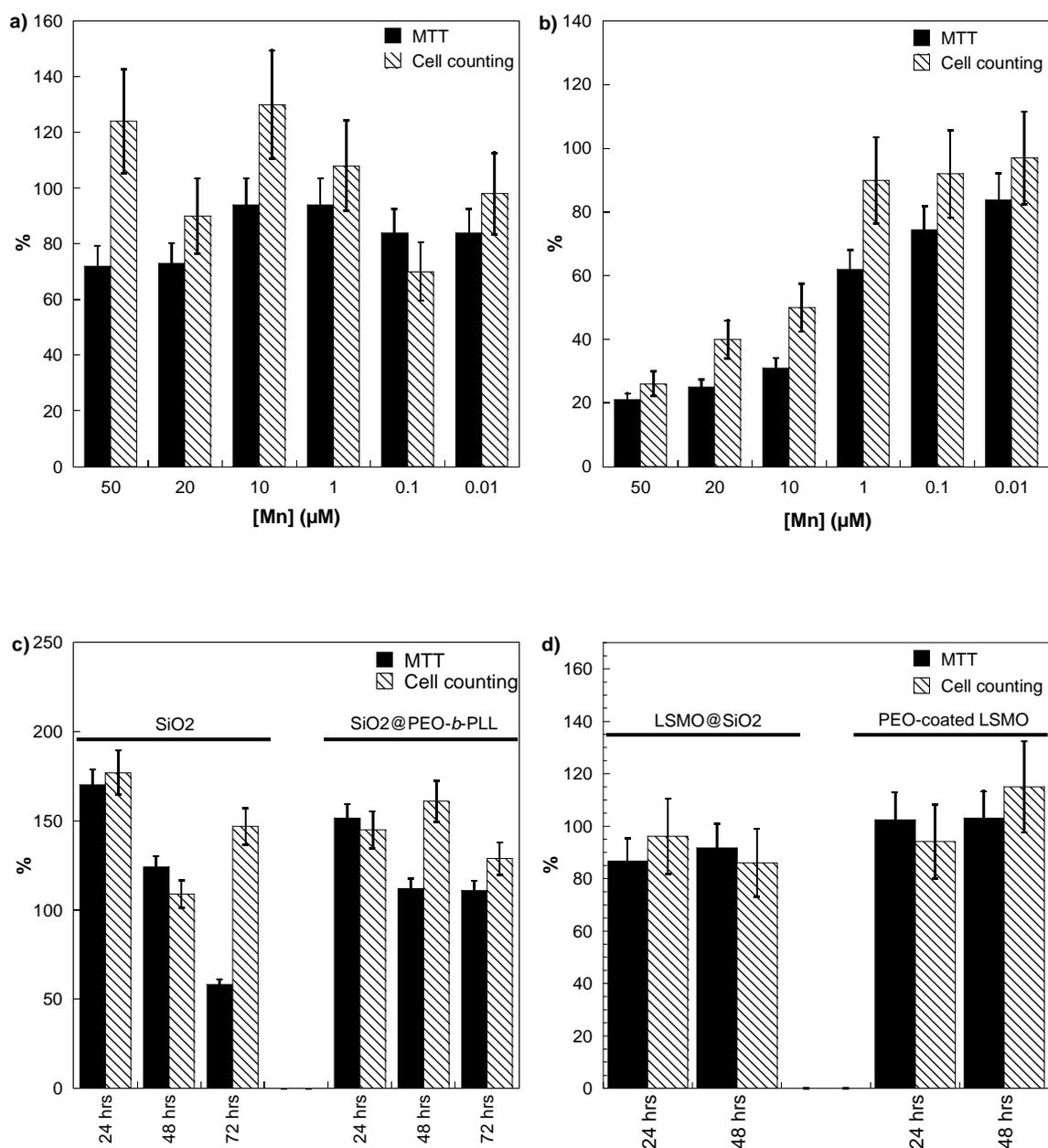


Figure 6. Cell viability of microglia cells and cells counting treated with (a) LSMO@silica MNPs at various Mn concentration after 24 hrs of incubation and (b) after 48 hrs of incubation; (c) with uncoated and PEO-coated silica NPs at 14 $\mu\text{g/mL}$ of silica for various incubation time and (d) with uncoated and PEO-coated LSMO@silica MNPs at 1 μM in Mn for 24 hrs and 48 hrs of incubation time.

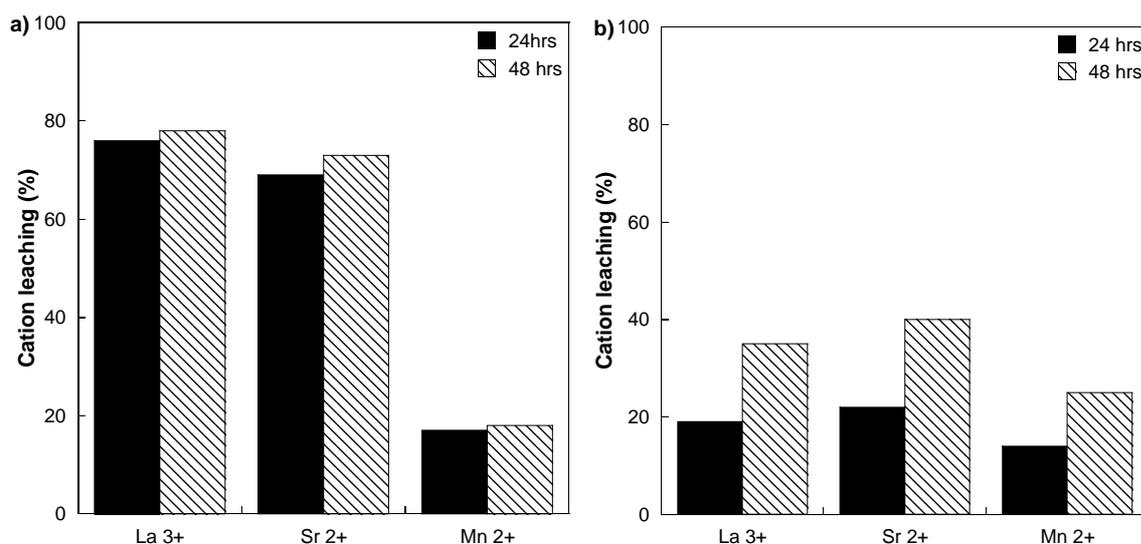


Figure 7. Cation leaching determined by ICP-OES for LSMO (a) and LSMO@silica MNPs (b) in acetate buffer at pH 4 at 24 hrs and 48 hrs.

Cytotoxicity issue is crucial for *in vivo* application. The MTT assay evaluates cellular metabolism activity and therefore gives an indication about cells viability. Potential disorder of mitochondrial activity is one of the earliest intracellular events that occurs prior to cells apoptosis.⁵⁹ Our experiments clearly demonstrated that the cellular survival is not insured *in vivo* with the LSMO@silica MNPs for concentration exceeding 1 μM . Conceptually, LSMO-based nanoparticles have interesting original properties (*i.e.* hyperthermia sensitivity with Curie temperature, MRI contrast agent capability) but a modification of the inorganic core composition appears mandatory to allow their long term use *in vivo*.

3.6 In-vivo evaluation of multimodal imaging particles: MRI and fluorescence

For fluorescence imaging and targeting purposes, PEO-coated MNPs were functionalized with alexa fluor 488 and the cyclic peptide ph48, respectively. The optimal number of ligands at the surface was fixed and the number of alexa fluor 488 was maximized at the limit where no MNPs aggregation occurred ($\approx 20\%$ of the total number of tethered PEO chains) (see above section). Unreacted ligands and dyes were removed by centrifugation.

The localization *in vivo* of the MNPs at the neuro-inflammation site was first observed in rats by MRI. 22 hrs after the creation of the neuro-inflammatory lesion, ph48/alexa-labeled MNPs were intravenously injected in the caudal vein. As a control experiment, MNPs only functionalized with the fluorescent probe were injected. The animals were then imaged by MRI 20 min after nanoparticles injection. The ph48/alexa-labeled MNPs were observed along the neuro-inflammation site (see arrow 1 on Figure 8a).

Indeed, distal to the lesion, the T_2^* signal intensity was apparently lower compared to the proximal segment. On the contrary, no accumulation of particles was observed close to the needle trace (see arrow 2 on Figure 8b).

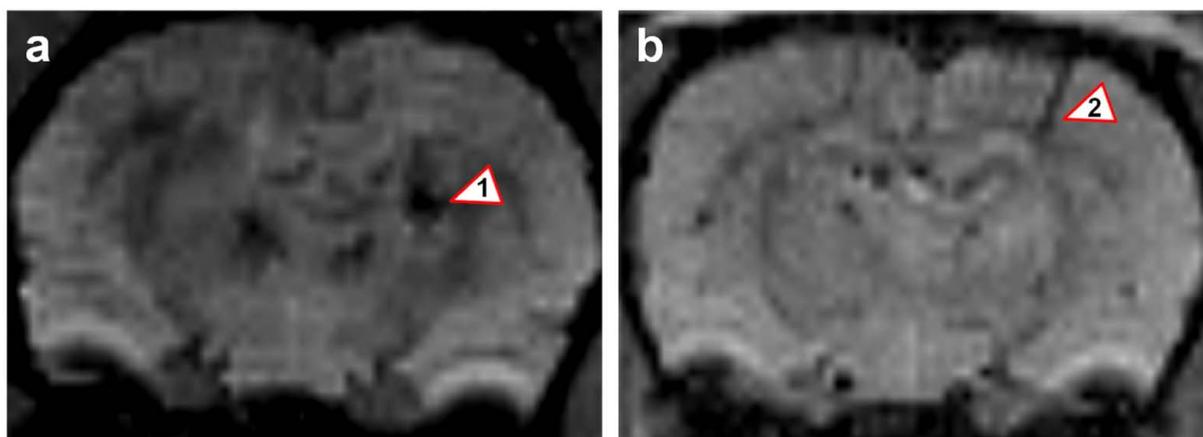


Figure 8. 0.5-T *in vivo* MR images of brain after injection of ph48/alexa-labeled MNPs (a) and alexa-labeled MNPs (for control experiment) (b) into the caudal vein of the rat. Arrows 1 ph48/alexa-labeled MNPs accumulation and arrow (2) mark the needle trace without MNPs accumulation (control).

After MRI observations, rats were sacrificed and brains, kidney, spleen, lung and liver were resected and sectioned for histological examination. As seen in Figure 9a, strong green fluorescence from ph48/alexa-labeled MNPs was located along the endothelial cells of the superficial region of the inflamed site. The co-localization of MNPs by both MR and fluorescence imaging techniques show that the integrity of the assembly is preserved in physiological conditions.

The fluorescent staining of the ventricles surfaces was due to the diffusion of IL-1 β LPS through the cerebrospinal fluid inducing an inflammation. In addition to the brain observation, MNPs distribution was also assessed in the kidney, spleen, lung and the liver by fluorescence imaging. Fluorescence imaging allowed the visualization of the cortical accumulation of ph48/alexa-labeled MNPs in kidney (Figure 9b) while, surprisingly, no particle were detected in the other organs, especially the liver. This massive cortical accumulation in kidney suggests that the targeting peptide would mediate a MNPs binding to the renal structure. (Renal structures would exhibit similar receptor than endothelial cells close to the inflamed site).

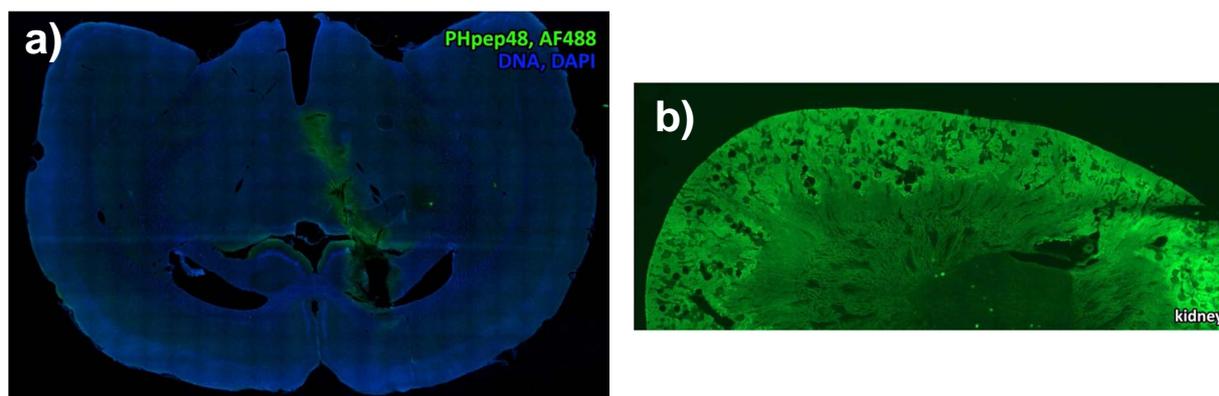


Figure 9—Epifluorescence images of brain (a) and kidney (b) slices with ph48/alexa-labeled MNPs.

Positive and negative control and biodistribution experiments with radiolabeled NPs have to be done to confirm our first hypothesis. In addition, to confirm the relevance of the amino acids sequence, control experiments with a scrambled version are in progress.

4 Conclusion

Functionalized silica-coated LSMO nanoparticles were designed to target inflamed tissues with multimodal detection using MR and fluorescence imaging. Poly(ethylene oxide)-*b*-poly(L-lysine) copolymers adsorption onto LSMO@silica allows the formation of a dense PEO brush surrounding the inorganic particles which did not affect their magnetic properties, *i.e.* hyperthermia induction and MRI contrast agent enhancement. A thiol-ended grade of the block copolymer was successfully synthesized and co-adsorbed with thiol-free copolymers in order to control the surface density of thiol groups and therefore of fluorescent probes and/or targeting ligands. The maximal number of chains that can be modified without affecting the colloidal stability was around 20% from the total number of grafted chains.

In vivo MRI and *ex vivo* fluorescence imaging revealed a site-specific accumulation of targeted MNPs to the neuro-inflamed site across the blood brain barrier in rats. Importantly, this inflammation was induced via injection of proinflammatory cytokine directly in rat brain while the MNPs were intravenously injected in the caudal vein. This proven that the MNPs blood circulation time is long enough to enable them to interact with cellular receptors to generate a contrast enhancement for MRI visualization.

The major challenge is now to decrease the LSMO@silica core cytotoxicity since microglia cell viability was affected after 48 hrs of incubation at 1 μ M in Mn. However, the promising properties of these inorganic cores for MRI contrast enhancement and heat release in AMF combined to polymeric corona properties, *i.e.* the stealthiness with regard to the MPS, drug entrapment and ease of functionalization, make this type of nanodevices suitable for diagnosis and therapeutic applications.

5 References

1. Y. Matsumura and K. Kataoka, *Cancer Science*, 2009, **100**, 572-579.
2. R. Tong, D. A. Christian, L. Tang, H. Cabral, J. R. Baker, K. Kataoka, D. E. Discher and J. J. Cheng, *Mrs Bulletin*, 2009, **34**, 422-431.
3. K. K. Upadhyay, H. G. Agrawal, C. Upadhyay, C. Schatz, J. F. Le Meins, A. Misra and S. Lecommandoux, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2009, **26**, 157-205.
4. E. Duguet, S. Vasseur, S. Mornet and J.-M. Devoisselle, *Nanomedicine*, 2006, **1**, 157-168.
5. G. Storm, S. O. Belliot, T. Daemen and D. D. Lasic, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1995, **17**, 31-48.
6. C. Passirani, G. Barratt, J.-P. Devissaguet and D. Labarre, *Pharm. Res.*, 1998, **15**, 1046-1050.
7. M. Roser, D. Fischer and T. Kissel, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, **46**, 255-263.
8. S. M. Moghimi, A. C. Hunter and J. C. Murray, *Pharmacological Reviews*, 2001, **53**, 283-318.
9. R. Gref, Y. Minamitake, M. Peracchia, V. Trubetsky, V. Torchilin and R. Langer, *Science*, 1994, **263**, 1600-1603.
10. J. M. Harris and R. B. Chess, *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**, 214-221.
11. S. L. Yowell and S. Blackwell, *Cancer Treatment Reviews*, 2002, **28**, 3-6.
12. E. Österberg, K. Bergström, K. Holmberg, J. A. Riggs, J. M. Van Alstine, T. P. Schuman, N. L. Burns and J. M. Harris, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1993, **77**, 159-169.
13. S. L. McArthur, K. M. McLean, P. Kingshott, H. A. W. St John, R. C. Chatelier and H. J. Griesser, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2000, **17**, 37-48.
14. C. Perrino, S. Lee, S. W. Choi, A. Maruyama and N. D. Spencer, *Langmuir*, 2008, **24**, 8850-8856.
15. J. Kreuter, P. Ramge, V. Petrov, S. Hamm, S. E. Gelperina, B. Engelhardt, R. Alyautdin, H. von Briesen and D. J. Begley, *Pharm. Res.*, 2003, **20**, 409-416.
16. K. Kim, J. H. Kim, H. Park, Y.-S. Kim, K. Park, H. Nam, S. Lee, J. H. Park, R.-W. Park, I.-S. Kim, K. Choi, S. Y. Kim, K. Park and I. C. Kwon, *J. Controlled Release*, 2010, **146**, 219-227.
17. A. J. Kastin, V. Akerstrom and W. Pan, *Mol. Brain Res.*, 2003, **114**, 168-171.
18. H. Sun, H. Dai, N. Shaik and W. F. Elmquist, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, **55**, 83-105.
19. P. Ballabh, A. Braun and M. Nedergaard, *Neurobiology of Disease*, 2004, **16**, 1-13.
20. D. J. Begley, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1996, **48**, 136-146.
21. J. Kreuter, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, **47**, 65-81.
22. I. Brasnjevic, H. W. M. Steinbusch, C. Schmitz and P. Martinez-Martinez, *Progress in Neurobiology*, 2009, **87**, 212-251.
23. L. Costantino, *Future Medicinal Chemistry*, 2010, **2**, 1681-1701.
24. T. F. Massoud and S. S. Gambhir, *Genes Dev.*, 2003, **17**, 545-580.
25. F. Leblond, S. C. Davis, P. A. Valdés and B. W. Pogue, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2010, **98**, 77-94.
26. M. Kacenska, O. Kaman, J. Kotek, L. Falteisek, J. Cerny, D. Jirak, V. Herynek, K. Zacharovova, Z. Berkova, P. Jendelova, J. Kupcik, E. Pollert, P. Veverka and I. Lukes, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 157-164.
27. J. Kim, Y. Piao and T. Hyeon, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 372-390.
28. E. V. Groman, J. C. Bouchard, C. P. Reinhardt and D. E. Vaccaro, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 1763-1771.
29. M. Tsotsalas, M. Busby, E. Gianolio, S. Aime and L. De Cola, *Chem. Mater.*, 2008, **20**, 5888-5893.
30. H. Yang, Y. M. Zhuang, H. Hu, X. X. Du, C. X. Zhang, X. Y. Shi, H. X. Wu and S. P. Yang, *Adv. Funct. Mater.*, 2010, **20**, 1733-1741.

31. R. Epherre, E. Duguet, S. Mornet, E. Pollert, S. Louguet, S. Lecommandoux, C. Schatz and G. Goglio, *Journal of Materials Chemistry*, 2011.
32. S. Vasseur, E. Duguet, J. Portier, G. Goglio, S. Mornet, E. Hadová, K. Knízek, M. Marysko, P. Veverka and E. Pollert, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2006, **302**, 315-320.
33. W. Agut, A. Brulet, D. Taton and S. Lecommandoux, *Langmuir*, 2007, **23**, 11526-11533.
34. J. Rodriguez-Hernandez, M. Gatti and H.-A. Klok, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 249-258.
35. A. Harada and K. Kataoka, *Macromolecules*, 1995, **28**, 5294-5299.
36. J. Rodriguez-Hernandez and S. Lecommandoux, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 2026-2027.
37. A. Harada, S. Cammas and K. Kataoka, *Macromolecules*, 1996, **29**, 6183-6188.
38. T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, New York, 1991.
39. R. G. Hiskey, T. Mizoguchi and H. Igeta, *J. Org. Chem.*, 1966, **31**, 1188-1192.
40. I. Photaki, J. Taylor-Papadimitriou, C. Sakarellos, P. Mazarakis and L. Zervas, *J. Chem. Soc. C.*, 1970, 2683-2687.
41. L. Zervas and I. Photaki, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 3887-3897.
42. N.-P. Huang, J. Vörös, S. M. De Paul, M. Textor and N. D. Spencer, *Langmuir*, 2001, **18**, 220-230.
43. J. Kim, J. E. Lee, S. H. Lee, J. H. Yu, J. H. Lee, T. G. Park and T. Hyeon, *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)*, 2008, **20**, 478-483.
44. H. M. Yang, C. W. Park, M. A. Woo, M. I. Kim, Y. M. Jo, H. G. Park and J. D. Kim, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 2866-2872.
45. M. Gantert, F. Lewrick, J. Adrian, J. Rössler, T. Steenpaß, R. Schubert and R. Peschka-Süss, *Pharm. Res.*, 2009, **26**, 529-538.
46. F. Gu, L. Zhang, B. A. Teply, N. Mann, A. Wang, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer and O. C. Farokhzad, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, **105**, 2586-2591.
47. E. Pollert, O. Kaman, P. Veverka, M. Veverka, M. Marysko, K. Zaveta, M. Kacenska, I. Lukes, P. Jendelova, P. Kaspar, M. Burian and V. Herynek, *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 2010, **368**, 4389-4405.
48. D. H. Kim, D. E. Nikles, D. T. Johnson and C. S. Brazel, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2008, **320**, 2390-2396.
49. O. Kaman, E. Pollert, P. Veverka, M. Veverka, E. Hadova, K. Knizek, M. Marysko, P. Kaspar, M. Klementova, V. Grunwaldova, S. Vasseur, R. Epherre, S. Mornet, G. Goglio and E. Duguet, *Nanotechnology*, 2009, **20**.
50. S. Purushotham, P. E. J. Chang, H. Rumpel, I. H. C. Kee, R. T. H. Ng, P. K. H. Chow, C. K. Tan and R. V. Ramanujan, *Nanotechnology*, 2009, **20**.
51. S. Purushotham and R. V. Ramanujan, *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**, 502-510.
52. J. Zhang and R. D. K. Misra, *Acta Biomaterialia*, 2007, **3**, 838-850.
53. T. Y. Liu, S. H. Hu, K. H. Liu, R. S. Shaiu, D. M. Liu and S. Y. Chen, *Langmuir*, 2008, **24**, 13306-13311.
54. S. L. C. Pinho, G. A. Pereira, P. Voisin, J. Kassem, V. Bouchaud, L. Etienne, J. A. Peters, L. D. Carlos, S. Mornet, C. Geraldès, J. Rocha and M. H. Delville, *ACS Nano*, 2010, **4**, 5339-5349.
55. H. Duan, M. Kuang, X. Wang, Y. A. Wang, H. Mao and S. Nie, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2008, **112**, 8127-8131.
56. H. Ai, C. Flask, B. Weinberg, X. Shuai, M. D. Pagel, D. Farrell, J. Duerk and J. M. Gao, *Advanced Materials*, 2005, **17**, 1949-+.
57. C. Sanson, O. Diou, J. Thévenot, E. Ibarboure, A. Soum, A. Brûlet, S. Miraux, E. Thiaudière, S. Tan, A. Brisson, V. Dupuis, O. Sandre and S. b. Lecommandoux, *ACS Nano*, 2011, null-null.
58. K. R. Bhayani, S. N. Kale, S. Arora, R. Rajagopal, H. Mamgain, R. Kaul-Ghanekar, D. C. Kundaliya, S. D. Kulkarni, R. Pasricha, S. D. Dhole, S. B. Ogale and K. M. Paknikar, *Nanotechnology*, 2007, **18**.

59. Z. Beji, A. Hanini, L. S. Smiri, J. Gavard, K. Kacem, F. Villain, J. M. Grenèche, F. Chau and S. Ammar, *Chem. Mater.*, 2010, **22**, 5420-5429.
60. A. Barbeau, N. Inoué and T. Cloutier, *Advances in neurology*, 1976, **14**, 339-352.
61. F. Hudecz, D. Gaál, I. Kurucz, Á. Lányi, A. L. Kovács, G. Mezö, É. Rajnavölgyi and M. Szekerke, *J. Controlled Release*, 1992, **19**, 231-243.
62. T. J. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink and W. J. Stark, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 4374-4381.
63. J.-S. Chang, K. L. B. Chang, D.-F. Hwang and Z.-L. Kong, *Environ. Sci. Technol.*, 2007, **41**, 2064-2068.

6 Annexes

6.1 LSMO@SiO₂ MNPs synthesis

LSMO@SiO₂ MNPs were synthesized according to an already described protocol based on the Glycine Nitrate Process (GNP) and a subsequent silica encapsulation stage¹. Briefly, Mn(NO₃)₂, (Sigma Aldrich, > 97%), Sr(NO₃)₂ (Riedel-de Haën, 99%) and La(NO₃)₃ (Riedel-de Haën, aqueous solution 0.1 M) were mixed in demineralized water in stoichiometric conditions in order to get 2 g of LSMO in about 150 mL. Glycine (Sigma Aldrich, 99%) was dissolved in this solution with a glycine/nitrate molar ratio (G/N) of 1. The solution was heated on a hot plate (~125°C) under stirring to evaporate water excess. On further heating (~250°C), the resulting viscous liquid self-ignited to produce voluminous ashes associated with the emission of large amounts of gases. Ashes (1 g) were introduced in a 45 mL agate bowl with 18 agate balls (Ø = 10 mm) and milled in a planetary device (Fritsch-Pulverisette) at 200 rpm during 9 x 30 min (reverse mode). They were then calcined in an alumina boat into a tubular furnace (rate of 10 K.min⁻¹ up to 1073 K for 30 min) and subjected to a second milling step including a manual milling (about 15 min in agate mortar) and a planetary one with the same experimental conditions as those used before calcination, except the powder mass (~650 mg) and milling duration (24 x 30 min). The exact chemical composition and final concentration of LSMO MNPs were determined by elemental analysis, performed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP/OES 720ES Varian) after MNPs dissolution in hydrochloric acid. The chemical composition was found to be La_{0.82}Sr_{0.18}MnO₃.

Silica encapsulation process started with the activation of the LSMO MNPs surface by an acidic treatment (HNO₃, 1M) in a sonicator bath for 15 min at rt. After washing with ultrapure water by several centrifugation cycles, the particles were flocculated by the addition of citric acid (0.01 M) and washed with acetone by centrifugation. Peptization was performed by adding some drops of ammonia on the pellets. Then, the sol of citrated particles was poured into a volume of ethanol/water/ammonia solution 75/23.5/1.5 v/v/v %. To tune the silica shell thickness, the exact amount of tetraethylorthosilicate (TEOS, Sigma Aldrich) was calculated from the initial d and expected D MNPs diameters, taking into account the number N_p of MNPs, by means of the formula $V_{TEOS} = 3.89 * N_p * (D^3 - d^3)$, where V_{TEOS} was directly expressed in mL and D and d in cm. The 3.89 scaling factor was computed from the molecular weights of SiO₂ formula unit and TEOS, the densities of silica and TEOS (2 and 0.934 g.cm⁻³, respectively) and assuming that particles are spherical. In our case, the silica shell thickness was targeted in the range 4-5 nm. The final step consisted in a size selection of the particles by centrifugation in order to remove residual aggregates. The final concentration of LSMO@SiO₂ MNPs was determined by elemental analysis, according to the previously described protocol. This final concentration was adjusted to 5.6 g LSMO/L.

6.2 MNPs functionalization

Different strategies can be used for nanoparticles functionalization. Indeed, the coupling reaction between the molecules of interest and the block copolymer may be done either before or after the polymer adsorption on MNP. However, fluorescent molecules and targeted peptides are rather large and their presence at the extremity of PEO moieties may hinder the adsorption process of PEO-*b*-PLL copolymers.

Table 1 presents the results of DLS measurements on MNPs dispersions before and after coating with PEO-*b*-PLL copolymers or with pre-functionalized PEO-*b*-PLL copolymers. In this latter case, HS-PEO-*b*-PLL copolymers were functionalized with cyclic RGD and fluorescein, prior to their adsorption onto MNP and gave rise to aggregated particles suspension ($D_H \approx 307$ nm, $PDI \approx 0.24$) contrarily to pristine PEO-*b*-PLL adsorption ($D_H \approx 151$ nm, $PDI \approx 0.08$). Consequently, the MNPs functionalization was done on preformed PEO-coated MNPs to improve stability and avoid any aggregation.

Table 1 – Evolution of the hydrodynamic size and polydispersity index of the LSMO@silica MNPs as a function of the chemical composition of the copolymer mixture let to adsorb on their surface in PB (7.4, 10 mM)

	D_H (nm)	PDI
Before adsorption	120	0.09
After adsorption of PEO- <i>b</i> -PLL/HS-PEO- <i>b</i> -PLL (50 % w/w)	151	0.08
After adsorption of PEO- <i>b</i> -PLL/cyclic RGD-PEO- <i>b</i> -PLL/Fluorescein-PEO- <i>b</i> -PLL (70/2/28 % w/w)	307	0.24

6.3 References

1. R. Epherre, E. Duguet, S. Mornet, E. Pollert, S. Louguet, S. Lecommandoux, C. Schatz and G. Goglio, *Journal of Materials Chemistry*, 2011.

Conclusion générale

L'objectif du travail de thèse était la mise au point de nanoparticules hybrides bio-fonctionnalisées thermo-sensibles pour la vectorisation et la libération contrôlée de principes actifs dans le système nerveux central (SNC). Les affections du SNC comme les infections, les trauma, les tumeurs ou les maladies neuro-dégénératives sont difficilement curables. En effet, le SNC est un organe difficile à atteindre car la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui isole les vaisseaux sanguins du parenchyme cérébral est étanche à la diffusion de nombreux composés. Depuis quelques années, les nanoparticules polymères sont considérées comme très prometteuses dans le cadre des pathologies du SNC. Elles fournissent un volume pour l'encapsulation d'agents thérapeutiques ou d'agents de contraste pour l'imagerie médicale. De plus, la pegylation des nanoparticules qui est relativement simple à mettre en œuvre, permet de rendre les particules « invisibles » aux macrophages du système réticulo-endothélial et, ainsi, d'augmenter leur temps de circulation dans l'organisme avec une probabilité accrue d'atteindre les cibles biologiques visées.

Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi de fonctionnaliser des nanoparticules d'oxyde de manganèse ($\text{La}_{0.82}\text{Sr}_{0.18}\text{MnO}_3$), préalablement enrobées par une couche de silice, par une voie non covalente mettant en jeu l'adsorption de chaînes biocompatibles de poly(oxyde d'éthylène)-*bloc*-poly(L-lysine) (PEO-*b*-PLL). Des nanoparticules modèles de silice ont été utilisées pour étudier précisément les mécanismes d'adsorption du copolymère. L'étude physico-chimique que nous avons réalisée a permis de mettre en évidence un processus d'adsorption relativement complexe car les deux blocs constituant le copolymère ont une affinité pour la surface de la silice. Le PEO interagit avec la surface de la silice par liaison hydrogène entre les groupes éther de la chaîne polymère et les groupes silanols du substrat. La PLL, chargée positivement à pH physiologique, s'adsorbe par complexation électrostatique avec les groupements silanols dissociés. Trois régimes d'adsorption ont été mis en évidence en fonction du rapport (Z) entre les charges positives du polymère et négatives de la silice lors de l'ajout séquentiel du copolymère sur une suspension de particules de silice : un état légèrement agrégé ($Z < 0.05$), un état floculé ($0.05 < Z < 1$) et un état stable ($Z > 1$). Les deux blocs ayant une forte affinité pour la surface, à mesure que le rapport Z augmente, les forces de répulsion décroissent et les particules s'agrègent jusqu'à avoir des tailles micrométriques. A partir de $Z=1$ les particules se désagrègent jusqu'à la disparition complète des floes. Les études de compétition d'adsorption et de désorption réalisées avec les homopolymères correspondants ont permis d'expliquer cette désagrégation à savoir que l'ajout de copolymère (Z croissant) sur les particules agrégées induit la désorption (complète ou partielle) des blocs de PEO en faveur des segments de PLL en excès. Ainsi l'adsorption préférentielle du bloc PLL par une combinaison de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques permet au copolymère d'adopter une conformation à la surface de la silice où seul le bloc PLL est adsorbé, le bloc PEO assurant la stabilisation stérique des particules. Cette adsorption préférentielle n'est obtenue qu'à la condition que les particules soient préparées en présence d'un large excès de copolymère.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié les facteurs influençant la conformation des chaînes à la surface de particules de silice et étudié l'interaction de ces surfaces pegylées avec une protéine modèle, la BSA. Pour ce faire, nous avons synthétisé une gamme de 5 copolymères présentant des longueurs de blocs différentes. Nous avons montré que la longueur du bloc PLL détermine la densité de greffage, plus le bloc polypeptide est grand, plus la densité de greffage diminue. Pour les plus petites longueurs de PLL (10 motifs de lysine), la densité de greffage est voisine de 0.8 chaîne/nm². Par de simples considérations géométriques, nous avons calculé, à partir de ces densités de greffage, les distances entre points d'ancrage (D) des chaînes de PEO. Ces dernières, comparées aux tailles des chaînes de PEO en bon solvant (R_F) nous ont permis de déduire la conformation que les chaînes de PEO adoptaient à la surface des particules de silice : conformation en champignon si $D > 2R_F$ et en brosse si $D < R_F$. Ainsi, nous avons défini trois systèmes pertinents pour l'étude sur les interactions des particules avec la BSA : le PEO₄₅-*b*-PLL₃₇, le PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ et le PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀. Les deux premiers copolymères forment des brosses de PEO denses dont l'épaisseur dépend de la longueur du bloc PEO. Le dernier, quant à lui, présente une densité de greffage bien moindre, proche de celle donnant lieu à des conformations en champignon. L'étude des quantités de BSA adsorbées sur les particules hybrides combinée à la diffusion dynamique de la lumière et à la calorimétrie de titration isotherme nous ont permis de mieux appréhender les modèles théoriques d'interaction de protéines sur des brosses pegylées décrits par Halperin. Selon son modèle, l'interaction entre des brosses de PEO et une protéine résulte de l'équilibre entre les forces attractives protéine/surface et les forces répulsives brosse polymère/protéine. Deux paramètres sont primordiaux : la distance entre les chaînes de PEO qui permet ou non, l'insertion de molécules de protéines dans la couche polymère, et la hauteur de la brosse, qui définit sa compressibilité. Ainsi, pour les brosses les plus denses, l'adsorption de protéine advient à la périphérie de la brosse et est plus faible dans le cas où les chaînes de PEO sont les plus longues (113 unités). Dans le cas où la distance entre chaînes permet l'insertion de la protéine (cas du PEO₁₁₃-*b*-PLL₂₇₀), celle-ci s'adsorbe de manière significative sur les particules devenues instables. Outre l'aspect fondamental que revêt ce type d'étude, le système hybride issu de l'adsorption du PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ semble être le meilleur candidat par rapport à la finalité du projet puisque la brosse polymère formée s'oppose à l'adsorption des protéines. Ceci a d'ailleurs été confirmé par l'étude de stabilité des particules hybrides dans un milieu riche en protéines (sérum fœtal de veau).

Les principales expériences nous ayant permis de déduire la conformation des chaînes adsorbées de copolymères PEO-*b*-PLL ont été réalisées avec des nanoparticules de silice. L'adsorption de PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ sur des nanoparticules magnétiques enrobées d'une couche de silice a donné lieu à des résultats tout à fait similaires. Les systèmes colloïdaux hybrides obtenus sont de taille contrôlée, de charge nulle, stables en milieu salin et en présence de sérum fœtal de veau. En outre, les propriétés magnétiques des particules d'oxyde de manganèse (agent de contraste pour l'IRM, induction de chaleur par hyperthermie) ne s'avèrent pas être modifiées de façon trop importante par l'adsorption du polymère.

Un des challenges de ce projet de thèse consistait en l'élaboration de vecteurs dits « intelligents » capables d'encapsuler et de libérer un principe actif de manière contrôlée sous l'effet d'un champ magnétique. Pour réaliser cet objectif, nous avons étudié la possibilité de moduler la thermosensibilité de la couronne polymère formée des chaînes de PEO de telle sorte qu'elle corresponde à la température d'échauffement des cœurs inorganiques ($\approx 43\text{ }^{\circ}\text{C}$). D'après la littérature la thermosensibilité d'une chaîne polymère est contrôlée par sa balance hydrophile/hydrophobe. De nombreuses études ont montré que l'introduction de groupements hydrophobes sur une chaîne thermosensible abaissait sa température critique, et inversement dans le cas de l'introduction de groupements hydrophiles. Nous nous sommes inspirés de ces travaux et avons étudié l'effet de la co-adsorption de polymères de type polyéther-*b*-PLL avec des blocs polyéther à LCST variable. Deux copolymères statistiques d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène (PO) ont été utilisés comme macro-amorceurs pour la synthèse du bloc peptidique lysine, le $\text{P}(\text{EO}_{31}\text{-stat-PO}_{10})\text{-b-PLL}_{13}$ et le $\text{P}(\text{EO}_6\text{-stat-PO}_{29})\text{-b-PLL}_{10}$.

D'une part, une étude en diffusion de la lumière a mis en évidence l'apparition d'une transition de volume de la couronne polymère induite par élévation de la température. Cette transition est accompagnée d'une variation de l'indice de réfraction de la couronne, caractéristique de sa contraction et donc de sa densité de chaînes. D'autre part, la co-adsorption des copolymères à blocs $\text{P}(\text{EO}_{31}\text{-stat-PO}_{10})\text{-b-PLL}_{13}$ / $\text{PEO}_{113}\text{-b-PLL}_{10}$ ou $\text{P}(\text{EO}_6\text{-stat-PO}_{29})\text{-b-PLL}_{13}$ / $\text{PEO}_{113}\text{-b-PLL}_{10}$ a permis de montrer que la transition en température de la couronne variait linéairement en fonction de la quantité de PO contenue dans la couronne, corroborant ainsi le postulat initial selon lequel la balance hydrophile/hydrophobe du polymère définit sa thermosensibilité. La couronne polymère mixte présentant une variation de volume maximale entre $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ est obtenue par co-adsorption d'un mélange équimassique de copolymères $\text{P}(\text{EO}_{31}\text{-stat-PO}_{10})\text{-b-PLL}_{13}$ et $\text{PEO}_{113}\text{-b-PLL}_{10}$.

Une étude portant sur la doxorubicine, un agent anti-tumoral, a mis en évidence les capacités d'encapsulation de ce principe actif dans la couronne polymère, représentant environ 45% du volume final de la particule hybride. Cette capacité d'encapsulation fut attribuée, premièrement, aux possibles effets hydrophobes entre la doxorubicine et les domaines hydrophobes de la couronne polymère et, d'autre part, aux interactions électrostatiques entre les amines protonées de la doxorubicine et les fonctions SiO^- non-complexées de la silice.

La libération de la doxorubicine encapsulée a été étudiée dans différentes conditions : sans chauffage, en chauffant à $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ et sous champ magnétique alternatif. Dans tous les cas, une libération passive du principe actif est mesurée. Par ailleurs, l'élévation de la température jusqu'à $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou l'application d'un champ magnétique induisent tout deux une augmentation de la cinétique de libération, démontrant ainsi l'effet synergétique de l'hyperthermie magnétique avec la thermosensibilité de la couronne polymère.

Finalement, le dernier enjeu de ce projet de thèse concernait la bio-fonctionnalisation des nanoparticules magnétiques avec des fluorophores et/ou des agents de ciblage. Dans cette optique, une version thiolée du copolymère PEO₁₁₃-*b*-PLL₁₀ a été synthétisée.

Du fait de la forte densité de greffage des chaînes de PEO adsorbées à la surface des particules (conformation en brosse), l'extrémité fonctionnelle des chaînes des blocs PEO-SH demeurent accessibles pour leur couplage via une réaction de thio-alkylation avec des molécules portant des groupements maléimide. La réaction de couplage est quantitative comme cela a été démontré à l'aide d'un fluorophore modèle, la fluorescéine, ainsi qu'avec un peptide RGD cyclique modèle. En outre, une étude visant à déterminer le meilleur compromis entre la stabilité colloïdale et la quantité de fluorophore greffée a montré que 20% des chaînes de PEO « greffées » à la surface pouvaient être fonctionnalisées sans que la stabilité colloïdale n'en soit affectée.

L'agent de ciblage choisi pour ce projet est un peptide cyclique comprenant neuf acides aminés, sélectionné par une technique basée sur le phage display permettant d'identifier les séquences peptidiques ciblant les marqueurs moléculaires surexprimés au niveau des cellules endothéliales de la BHE lors des affections du CNS. Ce peptide a été modifié par une fonction maléimide afin de le coupler avec les fonctions thiols aux extrémités des blocs PEO. L'évaluation du ciblage induit par la présence de ce peptide à la surface des nanoparticules hybrides magnétiques a été réalisée sur une série de rats présentant une inflammation sur le cerveau induite par l'injection d'une solution d'interleukine au niveau du cortex cérébral. 2 heures après injection par voie intraveineuse des particules dans la veine caudale des animaux, une forte fluorescence ainsi qu'un contraste positif en IRM ont pu être détectés au niveau de l'inflammation.

L'ensemble de l'étude a démontré de façon satisfaisante que les nanoparticules hybrides imaginées au début de ce projet ont pu être effectivement obtenues. En effet, la capacité d'encapsulation de principe actif dans la couronne polymère, sa libération en présence d'un champ magnétique ainsi que les capacités de ciblage des vecteurs ont toutes été confirmées par de nombreuses expériences. La stratégie consistant à élaborer une plateforme multifonctionnelle à base de copolymère PEO-*b*-PLL semble donc viable et probablement utilisable pour de nombreuses applications. Néanmoins, une difficulté majeure persiste puisque des études de viabilité cellulaire sur des cellules microgliales ont montré la relative forte toxicité de ces matériaux. Effectivement, au-delà de 48 heures d'incubation, la survie de ce type de cellules n'est effective que pour des concentrations en particules inférieures à 1 μM d'équivalent en manganèse. Cette toxicité pourrait être due à la désorption accélérée en milieu acide des cations neurotoxiques (La^{3+} , Sr^{2+} et Mn^{2+}) composant la structure du cœur inorganique. Des travaux en cours ont pour objet d'inhiber la désorption des cations de la matrice inorganique en utilisant divers procédés tels que la densification de la couche de silice ou la création d'une barrière électrostatique au sein de la couche de silice.

La méthode d'incubation utilisée pour l'encapsulation de la doxorubicine à la surface des particules hybrides est simple à mettre en œuvre et permet l'encapsulation de quantités appréciables de principes actifs à l'intérieur de la couronne polymère. De plus, l'influence de la température et de la composition de la couronne polymère a mis en évidence une relation directe entre l'hydrophobicité de la couronne et la quantité de doxorubicine encapsulée.

Il semble donc pertinent d'étendre cette étude à l'encapsulation d'autres agents anti-cancéreux possédant un caractère hydrophobe plus marqué.

Les expériences *in vivo* préliminaires semblent concluantes mais doivent être complétées par des contrôles (positif, négatif et avec un peptide composé des mêmes acides aminés mais séquencés de manière aléatoire).

Outre cet aspect, la méthodologie développée lors de l'étude fondamentale des interactions entre les particules pegylées et la protéine modèle a permis d'observer des tendances claires, corrélables avec les modèles théoriques existants. Il serait intéressant de poursuivre cette étude en incluant d'autres protéines plasmatiques (IgM, fibrinogène, fibronectine, complément C3 ...). Egalement, il est envisageable d'étendre cette étude à d'autres systèmes polymères, tel que le dextrane-*b*-PLL. Historiquement le PEO est le plus utilisé en vectorisation mais les polysaccharides sont de plus en plus considérés comme à-même de minimiser les interactions avec les protéines. La chimie de couplage de ce type de copolymère ayant déjà été validée au sein du LCPO, il est donc possible de contrôler la taille des blocs de telle sorte à obtenir des copolymères équivalents à ceux étudiés dans le chapitre 3. Après avoir vérifié que les mécanismes d'adsorption sont similaires pour les deux types de copolymère, il s'agirait de comparer leurs propriétés respectives de résistance à l'adhésion des protéines.

Résumé

Cette étude concerne le développement de nanoparticules hybrides offrant de nouvelles stratégies pour la thérapie et le diagnostic médical. Elles sont constituées d'un cœur magnétique jouant le rôle d'agent de contraste pour l'IRM et d'inducteur de chaleur par hyperthermie, d'une couronne de polymère thermosensible permettant d'encapsuler des principes actifs et de peptides de reconnaissance biologique. Une grande partie de l'étude a consisté à étudier les processus d'adsorption de copolymères poly(éther)-*b*-poly(L-lysine) de composition variable sur les particules magnétiques et à comprendre le rôle de la conformation des chaînes polymère à la surface des particules sur la stabilité des colloïdes en milieu physiologique. Un agent antitumoral a été encapsulé puis libéré de façon contrôlée sous l'effet d'un champ magnétique alternatif en exploitant le caractère thermosensible des blocs polyéthers. Des séquences peptidiques ciblant les zones d'inflammation de la barrière hémato-encéphalique ont été greffées sur les copolymères. L'efficacité du ciblage a été validée par IRM et fluorescence sur un modèle animal démontrant ainsi la multifonctionnalité des nanoparticules.

Mots-clés: théranostique, nanoparticules magnétiques, oxyde de manganèse, copolymères à blocs, polypeptides, PEG, polymère thermosensible, délivrance contrôlée, hyperthermie, IRM, agents de contraste, nanoparticules multifonctionnelles.

Summary

This work deals with the development of hybrid nanoparticles that could offer new strategies for therapy and diagnostic. These are based on a magnetic core which can play the role of contrast agent for MRI as well as heat inductor in AC magnetic field. This inorganic core is surrounded by a thermo-responsive polymeric brush that controls the loading and the release of drugs, and can be functionalized by specific ligands ensuring the targeting specificity. A large part of this work consists in studying the adsorption mechanism of poly(ether)-*b*-poly(L-lysine) based block copolymers onto magnetic particle and to better understand the influence of the polymer chain conformation at particles surface on the colloidal stability under physiological conditions. An anticancer drug has been loaded and released in a controlled manner under alternative magnetic field by taking advantage from the thermosensitivity of the polyether block. Targeting peptides specific of inflammation sites at the blood brain barrier have been grafted onto copolymers. The targeting specificity has been demonstrated by MRI and fluorescence imaging in rats attesting the multifunctionality of such nanoparticles.

Keywords: theranostic, magnetic nanoparticles, manganese oxide, block copolymers, polypeptides, PEG, thermosensitive polymer, controlled release, hyperthermia, MRI, contrast agent, multifunctional nanoparticles.