



HAL
open science

Synthèse de nanogels biocompatibles et multi-stimulables pour la libération contrôlée d'une molécule modèle par hyperthermie magnétique et photothermie

Esther del Carmen Cázares Cortés

► **To cite this version:**

Esther del Carmen Cázares Cortés. Synthèse de nanogels biocompatibles et multi-stimulables pour la libération contrôlée d'une molécule modèle par hyperthermie magnétique et photothermie. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066290 . tel-01820615

HAL Id: tel-01820615

<https://theses.hal.science/tel-01820615>

Submitted on 22 Jun 2018

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

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

Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie
École Doctorale 388 : Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre
Laboratoire Physicochimie des Électrolytes et des Nanosystèmes Interfaciaux

Présentée par

Esther CÁZARES CORTÉS

**Synthèse de nanogels biocompatibles et multi-stimulables
pour la libération contrôlée d'une molécule modèle par
hyperthermie magnétique et photothermie**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Soutenue le 20 décembre 2017

Devant un jury composé de :

Mme Laurence MOTTE	Professeur des Universités	Rapportrice
M. Olivier SANDRE	Directeur de Recherche	Rapporteur
Mme Rachel AUZÉLY-VELTY	Professeur des Universités	Examinatrice
M. Christian BONHOMME	Professeur des Universités	Examineur
Mme Christine MÉNAGER	Professeur des Universités	Directrice de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon jury de thèse, Laurence MOTTE, Olivier SANDRE, Rachel AUZÉLY-VELTY, Christian BONHOMME et Christine MÉNAGER, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et pour vos discussions enrichissantes durant ma soutenance.

Je tiens à remercier Pierre LEVITZ, directeur du Laboratoire de Physicochimie des Électrolytes et Nanosystèmes Interfaciaux (PHENIX, UMR 8234), de m'avoir accueillie et permis d'effectuer cette thèse au sein du laboratoire.

Un immense merci à Christine MÉNAGER, ma directrice de thèse, de m'avoir donné l'opportunité de mener à bien ce projet de recherche. Je n'oublierai jamais la première fois que nous nous sommes rencontrées pour discuter du sujet scientifique. Merci de m'avoir fait confiance dès le début de la thèse. Tu as su trouver les bons mots pour me donner de l'énergie et me permettre de démarrer du bon pied. Merci de m'avoir conseillée et guidée durant ces trois années, tout en me permettant d'être autonome. Merci également de m'avoir permis de travailler dans le domaine des polymères qui m'a toujours passionné et de me faire découvrir le monde des nanoparticules inorganiques pour le biomédical. J'ai beaucoup appris à tes côtés scientifiquement et humainement.

Je tiens à exprimer ma forte gratitude à Cécile RIZZI, Stéphane ROHRBACH, Grégoire NADIN et Valérie ROGÉ, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour. Votre aide et soutien à ce moment si particulier de ma vie est un véritable cadeau. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir apporté l'aide dont j'avais besoin. Plus particulièrement, je remercie Cécile et Stéphane pour vos paroles d'encouragement et vos conseils avisés tout le long de ma thèse au PHENIX, sachez que toutes les discussions que nous avons eu ensemble ont eu des effets positifs dans ma vie personnelle et professionnelle ! Je tiens également à remercier à Emeline DEBOST-ABADA, qui a su m'écouter et me donner des conseils pertinents au bon moment.

Au laboratoire PHENIX, je tiens à remercier tous les personnes que j'ai côtoyées pendant ma thèse. Notamment, je remercie Ali ABOU HASSAN de m'avoir permis de découvrir la synthèse des nanoparticules d'or et d'être toujours disponible pour répondre à mes multiples questions de chimie. Merci à Jérôme FRESNAIS et Nébéwia GRIFFETTE pour avoir répondu à mes différentes questions autour de la thématique « polymère ». Merci à Agnès BÉE de m'avoir permis d'encadrer plusieurs groupes d'étudiants de L1 pour l'UE « système référent ». Merci à Aude MICHEL pour les dosages de fer et d'or, ainsi que pour toutes les jolies images TEM des nanogels que tu as réalisées, je te remercie également pour ton temps et ton aide dans le quotidien du laboratoire. Merci à Delphine TALBOT pour l'analyse des mes échantillons en TGA, merci pour ta gentillesse et ton écoute. J'ai été ravie de participer avec toi à la Fête de la Science 2016 et 2017, à Jussieu. Merci à Frédéric GÉLÉBART pour la conception et la mise en place d'un programme d'interface, rendant

l'utilisation du Magnetherm™ plus facile ; ainsi que pour l'élaboration de la platine d'adaptation (hyperthermie + microscope) qui a été très utilisée durant le stage de Sarah. Merci également pour ta disponibilité, ton écoute et tous tes conseils avisés. Merci à Ana PORRAS pour les mesures PXR, et surtout merci pour ton amitié et pour tout le temps que nous avons passé ensemble à discuter en espagnol ; à chaque fois j'avais l'impression d'être au Mexique, me donnant des vrais moments de détente. Merci à Didier DEVILLIERS et Sandrine LECLERC de vos conseils et discussions amicales lors des « pauses café/thé » durant ma période de rédaction de thèse. Cela m'a permis de reprendre des forces et de la motivation pour l'écriture du manuscrit et la préparation de la soutenance. Je tiens à remercier également Didier DEVILLIERS pour votre disponibilité, vos conseils avisés et le temps que vous m'avez consacré pour la suite de ma carrière professionnelle. Cela m'a permis de décrocher un travail dans le domaine des polymères. Merci à Brigitte CARREZ, Lise MICHELOT, Stéphanie GRISON et Gérard GUILLARD pour leur disponibilité et leur aide avec toute la partie administrative.

Au laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC, UMR 7057), je tiens à remercier Claire WILHELM de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis d'utiliser les différents appareils pour l'étude du pouvoir chauffant des nanogels. Merci pour nos différents échanges scientifiques et ton implication dans mon travail, notamment pour toutes les manipulations *in vitro* que tu as réalisées. Je souhaite remercier également Ana ESPINOSA pour toutes les manipulations *in vitro* que tu as faites, pour tous tes conseils pour la mise en place des manipulations en hyperthermie et pour nos discussions en espagnol lors des pauses déjeuner à MSC. Dans l'équipe « déjeuners à MSC » et SF Nano (Société Française de Nanomédecine), je remercie également Vladimir MULENS et Alba NICOLAS pour nos différents échanges, votre bon accueil et votre aide à chaque fois que je venais faire des manipulations à MSC.

Par ailleurs, je tiens à remercier toutes les personnes des autres laboratoires avec qui j'ai pu collaborer, de près ou de loin, pour caractériser et mieux comprendre les différents nanogels hybrides. Merci à Jean-Michel GUIGNER (IMPMC, UMR 7590) pour les études en cryo-TEM et à Sandra CASALE (LRS, UMR 7197) pour les analyses STEM-HAADF/EDS. De même, je souhaite remercier Retinna RADJOU (Plateforme de Chimie des Polymères) pour les analyses DSC et SEC des nanogels ; je te remercie pour ta gentillesse et ta bonne humeur à chacune de nos discussions. Merci à vous tous, car ces différentes rencontres et échanges m'ont permis de réaliser une thèse pluridisciplinaire (chimie et physico-chimie de polymères et des nanoparticules inorganiques, biologie cellulaire, techniques d'imagerie électronique et confocale et des notions de physique pour comprendre le pouvoir chauffant des particules). Pendant ma thèse, j'ai participé à l'enseignement des travaux pratiques en Licence 1 en chimie (UE 1C001) et en master 1 en chimie des polymères (UE 4C601 et 4C702) à l'UPMC. Dans ce contexte, je souhaite remercier à l'équipe des polyméristes, et notamment à François STOFFELBACH, pour m'avoir permis d'enseigner les TP des polymères. Merci à Nicolas ILLY et David KREHER, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler en binôme dans les différentes salles de TP ; à Retinna RADJOU et Patrick LIENAF, toujours souriants, pour leur disponibilité et leur aide lors des séances de TP.

Ces trois années au PHENIX m'ont permis de rencontrer d'autres personnes formidables, des permanents, des doctorants et des post-docs, sans qui ma vie au laboratoire n'aurait pas été la même. Merci aux anciens doctorants de PHENIX Clément G., Véronica G., Jamoowantee B., Wilfried L., Caterina D. et Cynara K. ; aux doctorants/post-docs du 3^{ème} /2^{ème} étage, Sofia H., Karol R., Charlotte B., Yoann P., Clément C., Jean-Baptiste P., Maleki B., Mesut D., Agathe F., Adelchi A., Lisbeth P., Nathalie R., Kyle R., Anastasia C. À mes collègues du premier bureau au bâtiment F, Ali ABOU HASSAN et Sébastien ABRAMSON, qui m'ont permis de découvrir et de m'intégrer rapidement au laboratoire. Merci pour toutes ces discussions qui m'ont permis d'apprendre de nouvelles choses. À mes collègues du deuxième bureau au bâtiment F, Yasmine SAKHAWOTH, Nadia SOULMI et Gérard GUILLARD (pour moi tu fais partie de ce bureau !), merci pour tous les moments que nous avons passés ensemble, les pauses déjeuners et de m'avoir fait sourire, même dans les moments difficiles. Merci pour votre amitié durant ces trois années, en espérant que ce n'est que le début d'une longue histoire ! Un grand merci à mes collègues du troisième bureau à la barre 32-42, Blandine BOLTEAU, Caroline THEBAULT et Emilie SECRET pour les différents échanges et discussions dans le bureau de filles. Merci Blandine et Emilie d'avoir lu et corrigé mon manuscrit de thèse. De même, je tiens à remercier Sofia HOUSNI, Charlotte BOITARD et Karol RAKOTOZANDRINY, cela a toujours été un plaisir de discuter avec vous dans le restaurant universitaire, dans les salles de manipulation et en dehors du laboratoire, merci de m'avoir écoutée et aidée lorsque j'avais le plus besoin. Je tiens à remercier Sarah COHEN, qui a effectué son stage de fin d'études (Master 2) avec moi, pour son sérieux et son implication dans son travail. Merci à Amandine ANFRY pour nos différents échanges au laboratoire et ta bonne humeur, je garderai toujours un bon souvenir de notre repas « pizzas+ascenseur ». Merci également à Arturo MELÉNDEZ pour tous tes conseils et ton aide depuis ton arrivée au laboratoire ; nous ne connaissons depuis peu, mais tu es devenu rapidement mon ami !

Merci à Stéphanie HALBERT de m'avoir permis de rejoindre l'équipe du RJ-SCF Ile de France (Réseau des Jeunes Chimistes de la Société Chimie de France d'Ile de France) au cours de ma thèse. Merci pour ta bonne humeur, ton dynamisme et ton implication dans l'association. J'ai apprécié nos différents échanges dans le cadre du RJ-SCF, mais également lors des nos déjeuners à la grecque. Je suis partante pour continuer l'aventure ! Merci également aux doctorants de DocUp et notamment à Aurélien BOUR, responsable de "Les Chercheurs vont à l'école". Merci pour ton implication dans l'organisation des différents ateliers. Je suis ravie d'avoir pu animer des ateliers scientifiques auprès des enfants, en binôme avec toi. Tu m'as appris à sortir de ma zone de confort pour expliquer des sujets scientifiques différents de mon domaine de recherche et tu m'as transmis ton goût pour la médiation scientifique. Merci pour cela !

Par ailleurs, je souhaite remercier à mes anciens professeurs qui m'ont formée, guidée et transmis l'envie d'apprendre tout le long de mon parcours. J'adresse un remerciement très particulier à Marisela GUTIÉRREZ avec qui j'ai appris à travailler de manière sérieuse, organisée et qui a éveillé ma curiosité d'apprendre dès mon plus jeune âge. Un immense merci à Catherine PROST qui m'a appris à parler et écrire en français, qui m'a fait découvrir

la culture et la littérature française et qui m'a donné envie de venir découvrir ce beau pays, qui est la France. Je tiens à remercier les enseignants-chercheurs de Lille et notamment à Serge BOURBIGOT, Patrice WOISEL, Maryse BACQUET pour m'avoir transmis leur passion pour la chimie et la physico-chimie des polymères, ainsi qu'à Jean-Marie AUBRY et Christel PIERLOT de m'avoir fait aimer la chimie de formulation et la physico-chimie des colloïdes. Merci également à vous tous de m'avoir transmis votre passion pour la recherche. Vous avez tous participé à ma formation et laissé une empreinte positive en moi. Vous avez donc contribué à la réussite de cette thèse !

À chaque étape de ma vie, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes inestimables et qui sont devenus des amis très proches. Je tiens à remercier tous mes amis que j'ai rencontrés au Mexique, qui malgré la distance et le passage du temps sont restés à mes côtés dans les moments de joies et les moments difficiles de ce projet : merci à Dayanara NAVA, Jussem NAVA, Beatriz CARPINTEIRO, Erick GONZÁLES, Jonathan ORTEGA, Diego CISNEROS, Sergio ZEPEDA, Néstor VARELA et Olmo DURAN. À mes amis que j'ai rencontrés en France : merci à Aïssa DEMBÉLÉ, Alba ORDOÑEZ, Paula AGUILERA, Patrice ESPINASSE, Sabrina ADAMS, Amélia SIGNOR, Marie BERRETROT et Julie DELCLAUX. Qu'aurais-je fait si vous n'étiez pas là ? Cela aurait été sûrement plus difficile d'arriver au bout du chemin ! Plus particulièrement, je tiens à remercier Alexandre CREYSSELS pour tout le temps que nous avons passé ensemble, pour ta patience, ton soutien et tous ces moments de joie et de détente avant et pendant la thèse (voyages, sorties cinéma/théâtre, soirées jeux, soirées entre amis). Grâce à toi, j'ai réussi à accomplir l'un de mes rêves, devenir docteur en chimie ! Merci pour tout cela du fond du cœur !

Finalmente, quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional durante toda mi vida: a mi mamá Josefina CORTÉS, quien desde muy pequeña me inculcó el gusto por la lectura y las ganas de aprender. Gracias igualmente por haberme enseñado a ser una mujer fuerte, que nunca se rinde ante las adversidades, y de haberme enseñado a siempre tener un plan B o hasta un plan Z para resolver los problemas. Esta cualidad siempre me será útil tanto en mi vida personal como en mi carrera futura de investigadora. Gracias a mi papá Francisco CÁZARES, a mis hermanos Josefina y Juan Francisco CÁZARES, a mi tía Carmen CORTÉS y a mi abuela Carmen MARTÍNEZ por su cariño, su presencia (gracias internet !) y sus palabras de aliento en todo momento. Gracias Güera, por tu apoyo incondicional en todos estos años en Francia y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas. Gracias igualmente Frédéric MIRALLES por tu apoyo, cariño y amistad desde que nos conocemos.

J'ai certainement oublié de personnes, si c'est le cas je vous demande de m'en excuser.

Encore une fois merci à vous tous !

*La vie n'est pas facile pour aucun d'entre nous. Mais que dire de qui ?
Nous devons persévérer et surtout avoir confiance en nous-mêmes.
Nous devons croire que nous sommes doués pour quelque chose
et que nous devons l'atteindre.*

Marie Skłodowska-Curie
(1867 - 1934)

Sommaire

Remerciements	3
Abréviations	11
Introduction Générale.....	13
CHAPITRE I : Étude Bibliographique	
1. La nanomédecine pour le traitement du cancer	18
1.1. Les nanosystèmes pour la nanomédecine	21
1.2. Biodistribution des nanoparticules	22
2. Les briques élémentaires de nos systèmes.....	23
2.1. Les nanogels stimulables	23
2.2. Les nanogels hybrides	36
2.3. Les nanoparticules magnétiques.....	41
2.4. Les nanoparticules d'or	45
3. Nouvelles thérapies à base de nanoparticules hybrides.....	50
3.1. Des nanosystèmes hybrides pour la libération de molécules contrôlée à distance....	50
3.2. Des nanosystèmes pour la thérapie	53
Références	55
CHAPITRE II : Les nanogels pH-sensibles et thermosensibles	
1. Synthèse et caractérisation de nanogels pH- et thermosensibles	68
1.1. Matériel.....	68
1.2. Synthèse des nanogels	68
1.3. Synthèse des nanogels fluorescents	72
1.4. Synthèse des nanogels cœur@coquille.....	73
1.5. Purification des nanogels.....	76
2. Structure et propriétés des nanogels	77
2.1. Les dispersions colloïdales de nanogels	78
2.2. Propriétés physico-chimiques des nanogels	80
3. Paramètres expérimentaux influençant les propriétés physico-chimiques des nanogels.....	91
4. Effet de la température et du pH	93
4.1. Effet de la température	93
4.2. Effet du pH	96
Conclusion.....	98
Références	100
CHAPITRE III : Les nanogels hybrides magnétiques	
1. Les nanoparticules magnétiques	106
1.1 Matériel.....	106
1.2 Synthèse des NPMs	106
1.3 Tri en taille.....	108
1.4 Stabilité colloïdale des NPMs.....	110
1.5 Morphologie, taille et charge des NPMs	112
1.6 Structure cristallographique des NPMs	113
1.7 Propriétés magnétiques des NPMs	117
2. Les Nanogels magnétiques.....	121
2.1 Matériel.....	121
2.2 Synthèse des MagNanoGels	121
2.3 Synthèse des MagNanoGels fluorescents.....	123
2.4 Purification	123

2.5	Composition chimique des MagNanoGels	124
2.6	Morphologie et taille des MagNanoGels	127
3.	Effet de la température et du pH sur les MagNanoGels.....	129
3.1	Effet de la température	129
3.2	Effet du pH	131
3.3	Effet du champ magnétique	132
4.	Libération contrôlée de doxorubicine encapsulée dans les MagNanoGels sous stimuli	138
4.1	Matériel.....	139
4.2	Encapsulation de doxorubicine dans les MagNanoGels.....	140
4.3	Libération de DOX des MagNanoGels par chauffage en bain thermostaté	143
4.4	Libération de DOX par diminution du pH.....	144
4.5	Libération de DOX par application d'un champ magnétique alternatif	145
4.6	Estimation de la température locale induite sous AMF.....	148
5.	Libération de DOX intracellulaire déclenchée sous AMF	149
5.1	Matériel.....	149
5.2	Etudes intracellulaires des MagNanoGels	152
	Conclusion et Perspectives	160
	Références	162
CHAPITRE IV : Les nanogels hybrides magnéto-plasmoniques		
1.	Les nanobâtonnets d'or	169
1.1	Matériel.....	169
1.2	Synthèse des nanobâtonnets d'or.....	170
1.3	Chimie de surface des AuNRs.....	173
1.4	Morphologie et taille des AuNRs	176
1.5	Propriétés plasmoniques des AuNRs.....	177
2.	Les nanogels plasmoniques – PlasmNanoGels.....	184
2.1	Matériel.....	184
2.2	Synthèse des nanogels plasmoniques – PlasmNanoGels	184
2.3	Morphologie, taille et charge des PlasmNanoGels.....	186
2.4	Effet de la lumière	188
3.	Les nanogels magnéto-plasmoniques MagPlasmNanoGels.....	191
3.1	Matériel.....	192
3.2	Synthèse des MagPlasmNanoGels à structure simple	192
3.3	Synthèse des MagPlasmNanoGels à structure cœur@coquille	193
3.4	Morphologie, taille et charge des MagPlasmNanoGels	195
4.	Vers des nanogels pour la thérapie	201
	Conclusions et Perspectives	206
	Références	208
	Conclusion générale et Perspectives	213
ANNEXES		
	Annexe 1. Techniques de caractérisation et appareils.....	216
	Annexe 2. Schéma du montage pour la synthèse de nanogels	223
	Annexe 3. Estimation du nombre de nanoparticules inorganiques à l'intérieur des nanogels hybrides	224
	Annexe 4. Structure cristallographique des AuNRs.....	225
	Annexe 5. Quantification de l'eau adsorbée à la surface des NPMs par ATG	226
	Annexe 6. Article : Cazares-Cortes E. <i>et al.</i> ACS Appl. Mater. Interfaces 2017	216

Abréviations

Acronymes et symboles

AMF	Champ Magnétique Alternatif (Alternative Magnetic Field)
DDS	Systèmes de délivrance de molécules (Drug Delivery System)
EPR	Effet EPR (Enhanced Permeability and Retention Effect)
EWC	Teneur en eau à l'équilibre (Equilibrium Water Content)
IC ₅₀	Concentration Minimale Inhibitrice (Half maximal inhibitory concentration)
LSPR	Résonance de Plasmon de Surface Localisée (Localized Surface Plasmon Resonance)
NIR-L	Lumière Proche Infrarouge (Near-Infrared Light)
PC	Teneur en polymère (Polymer Content)
PPTT	Thérapie photothermal-plasmonique (Plasmonic Photothermal Therapy)
PTT	Thérapie photothermique ou photothermie (Photothermal Therapy)
RC-DDS	Systèmes de délivrance de molécules contrôlée à distance (Remotely-Controlled Drug Delivery System)
SAR	Taux d'Absorption Spécifique (Specific Absorption Rate)
VPTT	Température de Transition de Phase Volumique (Volume Phase Temperature Transition)

Produits chimiques

AuNRs	Nanobâtonnets d'or (Gold Nanorods)
DOX	Doxorubicine
DTT	1,4-dithiothréitol
KPS	Persulfate de potassium
MAA	Acide méthacrylique
MEO ₂ MA	Di (éthylène glycol) méthyle éther méthacrylate (Mn = 188,22g.mol ⁻¹)
NPMs	Nanoparticules magnétiques (Magnetic NanoParticles)
OEGDA ₂₅₀	Poly (éthylène glycol) diacrylate (Mn = 250g.mol ⁻¹)
OEGMA ₅₀₀	Poly (éthylène glycol) méthyle éther méthacrylate (Mn = 500g.mol ⁻¹)
PC-3	Cellules humaines de cancer de prostate
SDS	Dodécylsulfate de sodium

Techniques de caractérisation

AAS	Spectroscopie par Absorption Atomique de Flamme (Atomic Absorption Spectroscopy)
CLSM	Microscopie Confocale (Confocal laser scanning microscopy)
Cryo-TEM	Microscopie Électronique à Transmission Cryogénique (Cryogenic-Transmission Electronic Microscopy)
DLS	Diffusion Dynamique de la Lumière (Dynamic Light Scattering)
DSC	Calorimétrie Différentielle à Balayage (Differential Scanning Calorimetry)
EDX- STEM	STEM couplé à une analyse de spectroscopie aux rayons X à dispersion d'énergie pour une cartographie chimique (Chemical mapping using energy dispersive X-ray spectrometry-STEM)
FT-IR	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (Fourier Transform InfraRed Spectroscopy)
HAADF-STEM	STEM en champ noir annulaire à grand angle (High-Angle Annular Dark-Field imaging-STEM)
ICP-AES	Spectrométrie à plasma à couplage inductif, (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy)
JCPDS-PDF	Fichier standard de diffraction des rayons X de poudre (Joint Committee on Powder Diffraction Standards-Powder Diffraction File)
NMR	Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (Nuclear Magnetic Resonance)
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
PXRD	Diffraction des rayons X de poudre (Powder X-Ray Diffraction)
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique (Size Exclusion Chromatography)
SLP	Pouvoir chauffant, (Specific Loss Power)
SQUID	Dispositif supraconducteur à interférence quantique (Superconducting Quantum Interference Device)
STEM-	Microscope électronique à balayage par transmission (Scanning Transmission Electron Microscopy)
TEM	Microscopie Électronique à Transmission (Transmission Electron Microscopy)
TGA	Analyse ThermoGravimétrique (ThermoGravimetric Analysis)
UV-vis	Spectroscopie ultraviolet-visible (UV-visible Spectroscopy)
VSM	Magnétomètre à échantillon vibrant (Vibrating Sample Magnetometer)

Introduction Générale

La prise de médicaments pour le traitement de diverses maladies peut engendrer des effets secondaires. L'utilisation de nanomédicaments est une des stratégies possibles pour réduire ces effets en encapsulant le principe actif autant que possible lors de son transport vers l'organe à soigner. Pour autant, l'efficacité de ces nanomédicaments peut être augmentée et les effets secondaires encore réduits, avec des nanosystèmes à libération de molécules contrôlée à distance (RC-DDS) permettant de libérer les molécules actives uniquement à l'endroit et au moment voulu, avec un contrôle spatio-temporel.

Les nanogels hybrides constitués de polymères thermosensibles et de nanoparticules inorganiques stimulables telles que des nanoparticules magnétiques (NPMs) ou des nanobâtônnets d'or (AuNRs) sont extrêmement intéressants pour être utilisés en tant que RC-DDS. En effet, leur matrice en polymère permet d'encapsuler et de libérer de grandes quantités de molécules actives, alors que les nanoparticules peuvent générer de la chaleur lorsqu'elles sont exposées à un champ magnétique alternatif (AMF) pour les NPMs et à une irradiation proche infrarouge (NIR-L) pour les AuNRs. Cette étude porte sur la synthèse et la caractérisation de nanogels biocompatibles, pH- et thermosensibles, à base de monomères en oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs), d'acide méthacrylique (MAA) et encapsulant des NPMs et/ou des AuNRs pour déclencher de manière contrôlée, par hyperthermie magnétique ou par photothermie, la libération d'une molécule anticancéreuse, la doxorubicine (DOX).

Notre stratégie est de combiner les propriétés de plusieurs nanomatériaux : (1) Les nanogels, particules sphériques à base de polymères réticulés, sont capables d'encapsuler une grande quantité de molécules. Les polymères que nous avons choisi, à base de monomères en oligo (éthylène glycol), sont biocompatibles et possèdent une température de transition de phase volumique (VPTT). Ainsi, lorsque la température du milieu augmente, la taille de nanogels diminue drastiquement et le principe actif est libéré. (2) La chaleur générée par les NPMs et les AuNRs peut déclencher à distance la libération des molécules contenues dans les nanogels en appliquant un AMF ou une NIR-L. La chaleur fournie par ces particules permet également d'envisager une thérapie simple ou combinée pour détruire les cellules cancéreuses. Ce manuscrit de thèse s'articule autour de quatre chapitres. Nous présentons la synthèse et la caractérisation de plusieurs types de nanogels multi-simulables, en allant des

nanogels les plus simples, constitués uniquement des polymères réticulés pH- et thermosensibles, aux nanogels de plus en plus complexes : nanogels hybrides composés des polymères et des particules inorganiques magnétiques.

Le Chapitre I est une introduction à la nanomédecine et rassemble les avancées scientifiques concernant l'élaboration de systèmes hybrides polymériques, magnétiques, plasmoniques et magnéto-plasmoniques. Deux principales applications, basées sur la capacité de ces systèmes polymériques à générer de la chaleur seront présentées : (1) la libération contrôlée de molécules par application d'un stimulus externe et (2) la destruction de cellules tumorales par une élévation forte de la température pour des thérapies (l'hyperthermie magnétique sous AMF, la photothermie sous NIR-L, ou une thérapie combinée AMF+NIR-L). Enfin, nous présenterons les différentes voies de synthèse et les principales propriétés des trois constituants de ces systèmes : les nanogels, les nanoparticules d'oxyde de fer et les nanobâtonnets d'or. Les Chapitre II à IV rassemblent les principaux résultats de cette thèse.

Le Chapitre II est consacré à la synthèse et à la caractérisation des nanogels pH- et thermosensibles à base d'oligo (éthylène glycol) méthyle éther méthacrylate. Nous étudierons notamment les propriétés de gonflement-dégonflement en réponse aux variations de pH et de température, ainsi que les principaux paramètres influençant les propriétés physico-chimiques des nanogels dans la perspective d'une utilisation future des nanogels pour l'encapsulation et la libération de molécules actives.

Le Chapitre III présente la synthèse et la caractérisation des nanogels hybrides magnétiques (MagNanoGels), constitués d'un réseau polymère pH- et thermosensible et des nanoparticules d'oxyde de fer. La réponse de MagNanoGels à plusieurs stimuli, tels que la température, le pH et les champs magnétiques permanents et alternatifs (AMF) est évaluée. Des études d'encapsulation et de libération de DOX en solution et dans des cellules cancéreuses en réponse à ces stimuli seront présentées. De même, une méthode pour estimer la température locale induite sous AMF sera proposée.

Enfin, le Chapitre IV décrit l'élaboration et la caractérisation des nanogels hybrides plasmoniques (PlasmNanoGels) constitués du même réseau de polymères biocompatibles que précédemment et des nanobâtonnets d'or. Nous présenterons notamment leur capacité à gonfler-dégonfler sous NIR-L, ainsi que leur capacité à chauffer efficacement. Puis, des

nanogels hybrides magnéto-plasmoniques (MagPlasmNanoGels), contenant à la fois des nanoparticules d'oxyde de fer et des nanobâtonnets d'or seront présentés. Leur réponse à plusieurs stimuli, tels que la température, le champ magnétique alternatif (AMF) et l'irradiation laser dans le proche infrarouge (NIR-L) seront étudiés. Enfin, leur pouvoir chauffant sous AMF, NIR-L et (AMF+NIR-L) sera évalué.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit se sont déroulés au Laboratoire de Physicochimie des Électrolytes et Nanosystèmes Interfaciaux PHENIX et proposent des nouveaux nanosystèmes polymériques pour des thérapies innovantes pour lutter contre le cancer. Toutefois, ils s'inscrivent dans un contexte pluridisciplinaire, en allant de la chimie de synthèse et à la physico-chimie de polymères et des nanoparticules inorganiques, la biologie cellulaire, les techniques d'imagerie (électronique, confocale) et à des notions physiques concernant les propriétés d'hyperthermie magnétique et de photothermie. Plusieurs personnes et laboratoires ont ainsi apporté leurs connaissances scientifiques à ce projet :

- Laboratoire de Physicochimie des Électrolytes et Nanosystèmes Interfaciaux PHENIX, UMR 8234, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris. Synthèse des nanogels, des nanoparticules magnétiques, des nanobâtonnets d'or. Caractérisations magnétiques (VSM, hyperthermie magnétique). Spectroscopie UV-visible. Spectroscopie Infrarouge. Diffusion dynamique de la Lumière. Étude de libération de molécules en solution sous différents stimuli (pH, T°, AMF). Les dosages par spectroscopie d'absorption atomique ont été réalisés par Aude Michel. La synthèse de nanobâtonnets d'or a été effectuée avec l'aide d'Ali Abou Hassan. Le programme d'interface pour l'utilisation du MagnethermTM a été conçu par Frédéric Gélébart. Les analyses TGA ont été réalisées par Delphine Talbot. Les mesures PXRD ont été effectuées par Ana Porrás-Gutiérrez. La thèse s'est déroulée au sein de ce laboratoire sous la direction de Christine Ménager.
- Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, Université Paris Diderot. Analyses NTA. Études du pouvoir chauffant des NPMs et AuNRs et nanogels hybrides sous AMF, NIR-L et (AMF+NIR-L), et mesure de l'évolution de la température avec une caméra infrarouge d'imagerie thermique. Les mesures de magnétophorèse et les études cellulaires (viabilité, libération de molécules, microscopie confocale) ont été réalisées par Claire Wilhelm et Ana Espinosa.

- L'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie IMPMC, UMR 7590 – CNRS/IRD/MNHN, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris. Les observations en cryo-TEM ont été effectuées par Jean-Michel Guigner.

J'ai pu également avoir accès à différentes plateformes :

- Plateforme de Microscopie Électronique de l'UFR de Chimie. Les analyses TEM ont été effectuées par Aude Michel et Sandra Casale. Les analyses STEM-HAADF/EDS ont été réalisées par Sandra Casale.
- Plateforme UPMC de mesures physiques à basse température MPBT, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris. Courbes d'aimantation au SQUID.
- Plateforme de Chimie des Polymères, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris. Les analyses DSC et SEC ont été réalisées par Rettina Radjou.

CHAPITRE I

Étude Bibliographique

1. La nanomédecine pour le traitement du cancer	18
1.1. Les nanosystèmes pour la nanomédecine	21
1.2. Biodistribution des nanoparticules	22
2. Les briques élémentaires de nos systèmes.....	23
2.1. Les nanogels stimulables	23
2.1.1. Synthèse de nanogels thermosensibles par précipitation	31
2.1.2. Paramètres expérimentaux influençant les propriétés physico-chimiques des nanogels.....	32
2.1.3. Propriétés physico-chimiques des nanogels stimulables en solution	33
2.2. Les nanogels hybrides	36
2.2.1. Composition et morphologie	37
2.2.2. Voies de synthèse des nanogels hybrides.....	38
2.3. Les nanoparticules magnétiques	41
2.3.1. Voies de synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer	42
2.3.2. Propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer	44
2.3.3. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer.....	45
2.4. Les nanoparticules d'or	45
2.4.1. Voies de synthèse des nanoparticules d'or.....	46
2.4.2. Propriétés optiques des nanoparticules d'or.....	47
2.4.3. Propriétés plasmoniques et de photothermie.....	49
2.4.4. Toxicité des NPs d'or.....	50
3. Nouvelles thérapies à base de nanoparticules hybrides.....	50
3.1. Des nanosystèmes hybrides pour la libération de molécules contrôlée à distance....	50
3.2. Des nanosystèmes pour la thérapie	53
Références	55

CHAPITRE I :

Étude bibliographique

Ce chapitre propose une description de la nanomédecine pour le traitement du cancer et rassemble les avancées scientifiques concernant l'élaboration de systèmes hybrides polymériques, magnétiques, plasmoniques et magnéto-plasmoniques afin d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer. Deux principales applications seront détaillées : la libération contrôlée de molécules par application de stimuli externes et la thérapie simple ou combinée. Enfin, les différentes voies de synthèse et les principales propriétés des trois constituants de ces systèmes : les nanogels, les nanoparticules d'oxyde de fer et les nanobâtonnets d'or, seront présentées.

1. La nanomédecine pour le traitement du cancer

La nanomédecine est une discipline émergente basée sur la conception d'objets à l'échelle nanométrique, dont la taille varie de quelques nanomètres et à quelques centaines de nanomètres¹. Ces nano-objets peuvent être utilisés en tant qu'agents thérapeutiques pour la délivrance de principes actifs ou la génération de chaleur et en tant qu'agents de contraste pour le diagnostic de diverses maladies. Lorsque le diagnostic et l'agent thérapeutique sont couplés dans le même système, on parle de nanosystèmes théranostiques.

Même si la nanomédecine est une discipline récente, les nanomatériaux existent depuis longtemps. Dès 2 500 av. J.-C., l'amiante naturelle a été utilisée pour renforcer un mélange céramique à des fins décoratives. Au fil des années l'utilisation de nanomatériaux en médecine a significativement augmentée. Les nanoparticules magnétiques ont commencé à être utilisées en médecine dans les années 70 et les premières nanoparticules d'or fonctionnalisées ont vu le jour dans les années 90.² La Figure 1 indique les dates importantes dans l'utilisation des nanomatériaux de 2 500 av. J.-C. à nos jours. Aujourd'hui, les nanosystèmes permettent d'envisager de nouvelles façons de s'attaquer à de nombreuses maladies, y compris le cancer. En effet, les propriétés uniques des nanoparticules, telles qu'un ratio surface/volume élevé, une petite taille, la capacité de pouvoir modifier à façon leur chimie de surface et la capacité d'encapsuler plusieurs molécules, leur confèrent beaucoup d'avantages par rapport à leurs

homologues de grande taille¹. Grâce à ces propriétés, ils peuvent interagir de façon ciblée avec les tissus, les cellules et les molécules du corps humain.

Le cancer est caractérisé par la prolifération anormale de cellules au sein d'un tissu formant une masse appelée tumeur. Cette prolifération peut être due à des mutations génétiques contrôlant le cycle cellulaire et le faisant fonctionner de manière incorrecte, à des facteurs héréditaires ou à des facteurs externes, tels que la consommation de tabac ou d'alcool. Les techniques les plus utilisées pour le traitement du cancer sont : la chimiothérapie, consistant en l'injection de principes actifs ; et la radiothérapie, basée sur l'application de rayonnements de hautes énergies pour endommager l'ADN. Ces deux techniques ont pour but de tuer les cellules cancéreuses, mais endommagent également les cellules saines, provoquant ainsi des effets secondaires. Un effet secondaire est une réaction provoquée par la prise d'un médicament qui n'est pas souhaitée, et qui peut se manifester, soit par une allergie médicamenteuse passagère, soit par une toxicité très élevée.

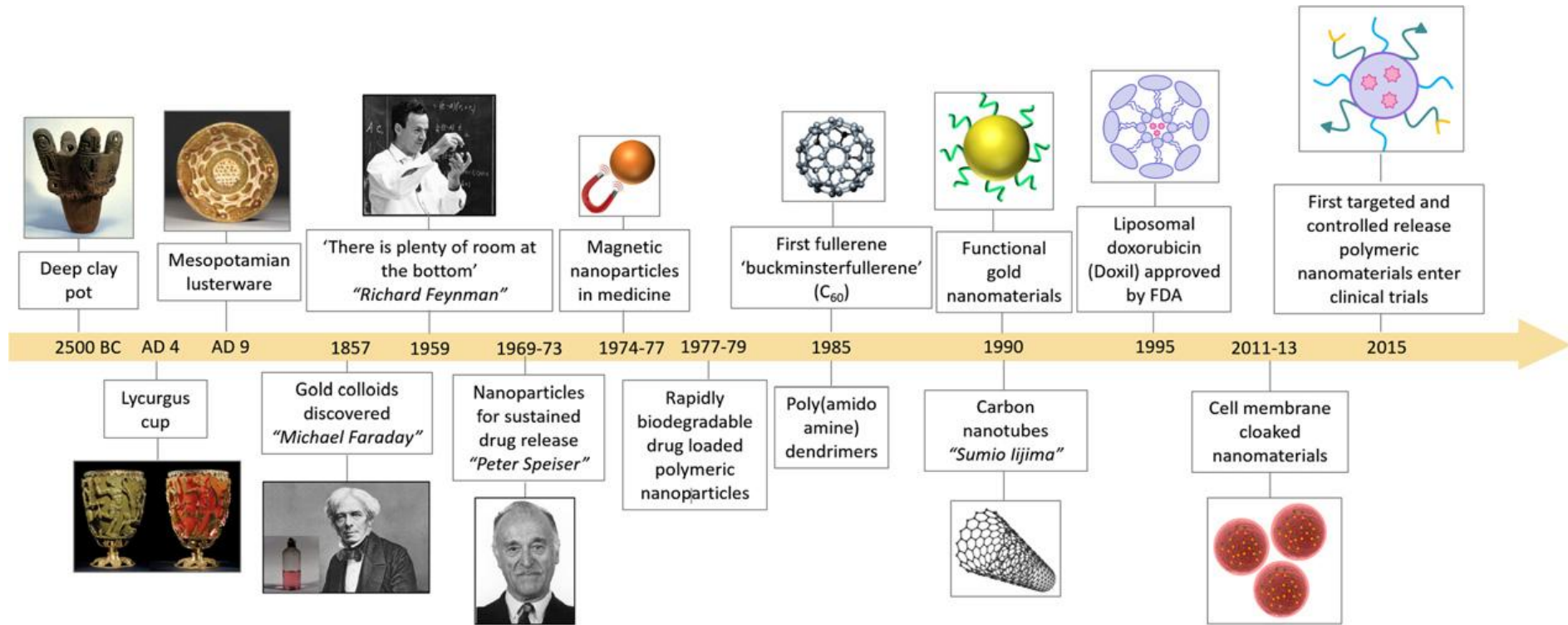


Figure 1. Chronologie montrant l'évolution des nanomatériaux utilisés en nanomédecine. Extrait de Hassan *et al.*, Nano Today (2017)².

1.1. Les nanosystèmes pour la nanomédecine

Un des avantages que peut apporter les nanosystèmes à la nanomédecine est le contrôle spatio-temporel. En effet, un nanovecteur peut permettre de vectoriser une drogue jusqu'à sa cible par différents modes de ciblage et de contrôler la libération de cette drogue. Cette modification de la distribution permet d'augmenter les concentrations actives au niveau de l'organe cible, tout en réduisant la toxicité liée à la dispersion des molécules au sein de l'organisme. De même, l'encapsulation permet de protéger les molécules actives des phénomènes d'inactivation et d'améliorer le passage des barrières biologiques, en augmentant ainsi l'efficacité du traitement. Il existe de nombreuses nanoparticules (NPs) pouvant être utilisées en nanomédecine. La Figure 2 donne un aperçu de la diversité des objets existants à ce jour. Ils sont classés dans deux catégories : (1) les NPs organiques, telles que les liposomes, les nanogels, les micelles, les capsides de virus et les dendrimères ; (2) les NPs inorganiques, telles que les quantum dots, les NPs d'oxyde de fer, d'or, de silice, les nanotubes de carbone, les nanodiamants. Certains de ces objets peuvent être utilisés pour le transport et la libération d'agents thérapeutiques, d'autres pour le diagnostic. Ainsi, la combinaison de plusieurs matériaux permettrait d'élaborer des systèmes théranostiques. La composition chimique, le comportement vis-à-vis des cellules, ainsi que les propriétés de ciblage varient d'un système à l'autre.

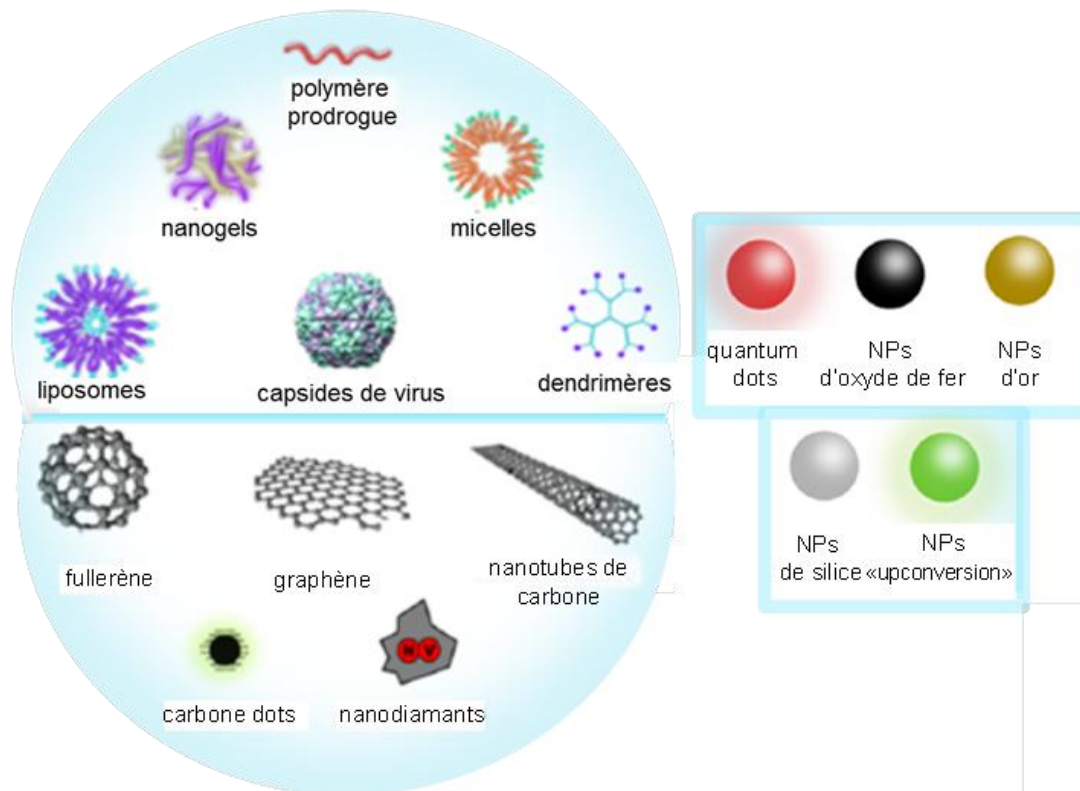


Figure 2. Vue d'ensemble des matériaux (polymères, lipides, particules inorganiques) pour la nanomédecine. Adapté de Ulbrich *et al.*, Chemical Reviews (2016)³.

1.2. Biodistribution des nanoparticules

Bien que la nanomédecine soit généralement considérée comme prometteuse pour de nouvelles stratégies de diagnostic et de traitement, la biodistribution et les effets toxiques des nouveaux nanomatériaux doivent être soigneusement évalués avant toute utilisation clinique. La taille, la forme et la surface des nanoparticules déterminent la manière dont elles seront filtrées du sang vers les organes du corps humain, tels que les poumons, le foie, la rate ou les reins. Comme illustré Figure 3, les particules sphériques de diamètre inférieur à 5 nm seront rapidement filtrées par les reins tandis que celles ayant un diamètre compris entre 20 et 150 nm seront essentiellement capturées par le foie et la rate. Au-dessus de 150 nm, les captures par le foie et la rate restent importantes et les poumons vont filtrer de plus en plus les NPs. Pour $d > 2 \mu\text{m}$, l'élimination pulmonaire est très rapide. Lorsque les NPs sont chargées positivement, la capture des NPs par les poumons, le foie et la rate s'effectue plus rapidement, comparée à celle effectuée pour des NPs négatives ou neutres⁴.

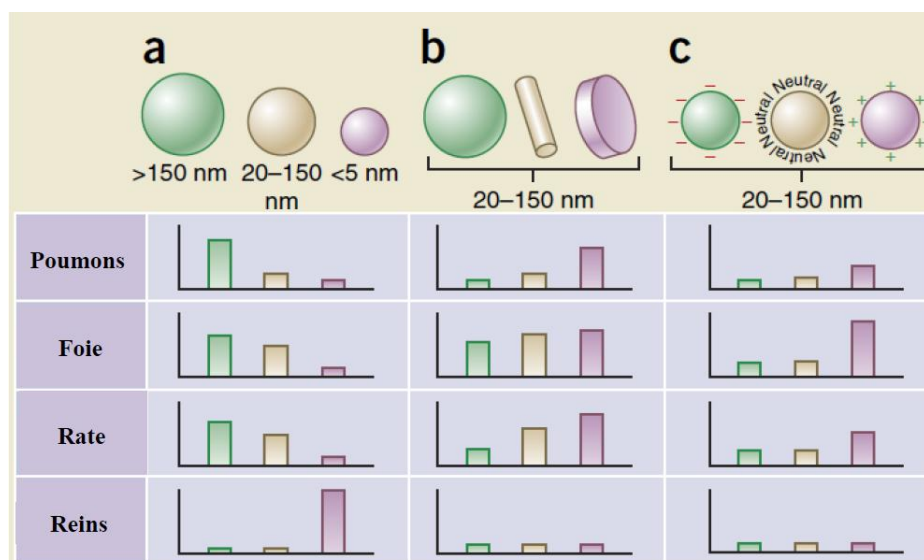


Figure 3. Biodistribution des nanoparticules dans les poumons, le foie, la rate et les reins en fonction de leur taille, leur forme et leurs charges de surface. Adapté de Blanco *et al.*, Nature Biotechnology (2015)⁴.

La biodistribution naturelle des NPs peut être modifiée en mettant en place des stratégies de ciblage. Le ciblage est très intéressant pour le traitement du cancer lorsque les tumeurs sont nombreuses ou inaccessibles pour être traitées par chirurgie, et notamment à cause de la cytotoxicité des molécules antitumorales. Le ciblage des molécules consiste à associer une substance active (molécules, protéines, ADN, ARN, etc.) à un vecteur pour l'orienter dans l'organisme vers une cible particulière, afin d'obtenir une concentration locale plus importante à cet endroit et donc un traitement plus efficace. Il existe trois principales stratégies de ciblage :

(1) **Ciblage passif** : Désigne l'accumulation naturelle des NPs dans certains organes, de part leur taille et la nature de leur surface. Dans les tissus normaux, seules de petites molécules peuvent diffuser à travers les parois des vaisseaux sanguins. Dans le cas des tumeurs, la porosité est accentuée, et des objets plus grands, tels que les macromolécules et les nanoparticules peuvent diffuser dans le tissu. La taille maximale des pores des tumeurs se situe entre 380 et 780 nm.⁵ Les NPs vont donc s'accumuler dans la tumeur, à des concentrations cinq à dix fois supérieures à celles observées pour un tissu sain. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*)^{6,7}.

(2) **Ciblage actif** : Désigne l'accumulation des NPs grâce à une reconnaissance de celles-ci par des cellules spécifiques. La reconnaissance peut être effectuée en modifiant la chimie de surface des NPs, par exemple en greffant des ligands spécifiques de la tumeur visée. Ceci amplifie l'affinité passive des NPs pour les cellules cibles.

(3) **Ciblage physique** : Fait référence à l'utilisation d'une force extérieure à l'organisme permettant d'augmenter l'accumulation des NPs au niveau de la zone tumorale. Un exemple de ciblage physique est l'utilisation d'un gradient de champ magnétique (aimant) pour accumuler des nanosystèmes hybrides magnétiques dans la tumeur.

2. Les briques élémentaires de nos systèmes

2.1. Les nanogels stimulables

Il existe un éventail de nanostructures possibles à base de polymères stimulables, tels que des agrégats, des nanoparticules cœur@coquille, des capsules, des nanogels, des micelles, des membranes, des films (*layer-by-layer*), des broches. Les polymères peuvent être seuls ou associés à des nanoparticules hybrides pour la formation de systèmes hybrides (Figure 4).

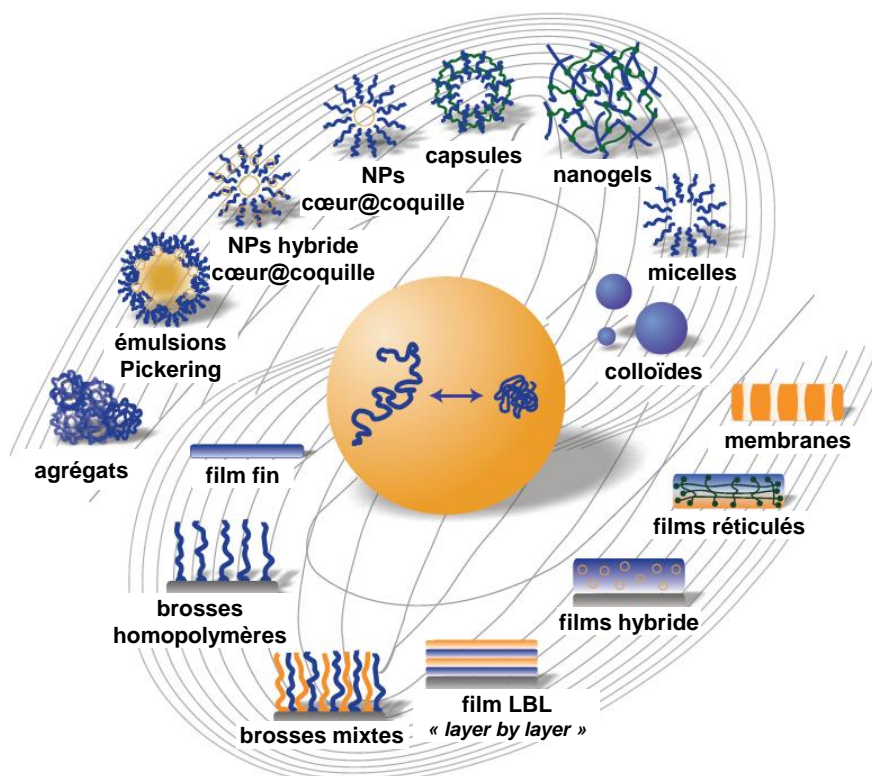


Figure 4. Variété de nanostructures à base de polymères stimulables : agrégats, émulsions hybrides, nanoparticules cœur@coquille, capsules, nanogels, micelles, colloïdes, membranes, films réticulés, films LBL, brosses. Adapté de Stuart *et al.*, Nature Materials (2010)⁸.

Les *microgels* ont été définis pour la première fois par Baker en 1949. Le terme *micro* faisait allusion à la taille des particules en gel de polybutadiène synthétisées par Baker, que l'on pourrait désormais appeler *nano*, étant donné que le diamètre de ces particules était inférieur à 1000 nm. Ce sont des particules colloïdales constituées d'un réseau tridimensionnel de polymère réticulé gonflé (maille) dans un solvant, possédant un diamètre compris entre 0,1 et 1 μm ⁹. Aujourd'hui dans la littérature, la distinction entre les termes *microgel* et *nanogel* reste floue et ces termes sont utilisés indifféremment pour désigner des particules dont la taille est comprise dans la gamme du nanomètre ($d = 10$ à 1000 nm) ou du micromètre ($d > 1 \mu\text{m}$). Dans ce manuscrit de thèse, les particules de gel étudiées ont une taille comprise entre 100 et 600 nm, elles seront donc appelées *nanogels*.

On parle de *nanogels stimulables* si les polymères constituant la maille réticulée sont capables de changer d'état en solution sous l'effet d'un stimulus externe. Ceci est dû à un changement d'affinité entre les chaînes polymères et le solvant, par exemple un changement de solubilité et/ou de conformation du polymère. Cette affinité est un équilibre entre les interactions de type solvant-solvant, polymère-solvant et polymère-polymère. Le stimulus peut être dû à un changement des propriétés du milieu de dispersion (stimulus interne) tel que

le pH, la force ionique, la température, la présence/absence d'une molécule. Le stimulus peut également être actionné de l'extérieur, par exemple lors de l'application d'un champ électrique et/ou magnétique, d'une irradiation lumineuse infrarouge et/ou visible⁸. Les polymères vont passer d'un état hydrophile à un état hydrophobe dans le solvant, ou vice-versa (transition de phase)¹⁰, comme illustré Figure 5.

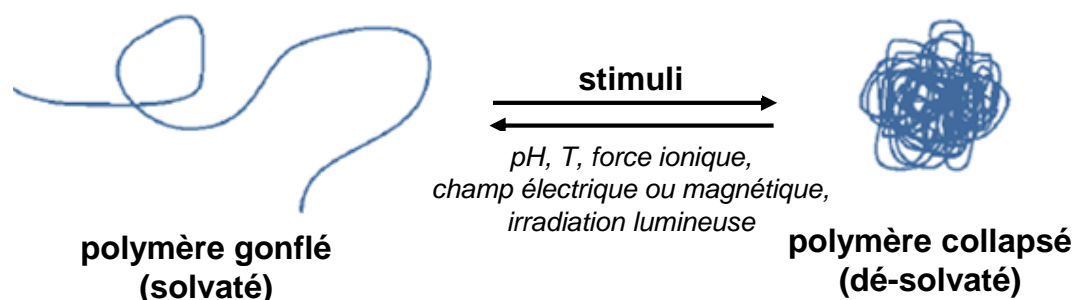


Figure 5. Schéma illustrant la transition de phase d'une chaîne de polymère stimuable en solution par variation du pH, de la température (T), de la force ionique, d'un champ électrique ou magnétique ou d'une irradiation lumineuse. Adapté de Nayak *et al.*, Angewandte (2005)¹⁰.

A. Les polymères thermosensibles

Les polymères sensibles à une variation de la température sont très largement étudiés dans la littérature¹¹⁻¹⁵. Le caractère thermosensible repose sur la structure chimique des polymères, notamment sur la balance hydrophile-hydrophobe des chaînes de polymère. Ces polymères possèdent une température critique à partir de laquelle, le polymère passe d'un état hydrophile à un état hydrophobe, ou inversement.

Lorsque les polymères sont solubles à basse température (hydrophiles) et insolubles à haute température (hydrophobes), ils présentent une température critique inférieure de solubilité (LCST, *Lower Critical Solution Temperature*). Un exemple de polymère à LCST est le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) avec une LCST autour de 32 °C, proche de la température du corps humain¹⁶. Par ailleurs, lorsque les polymères sont insolubles à basse température et solubles à haute température, ils possèdent une température critique supérieure de solubilité (UCST, *Upper Critical Solution Temperature*). Un exemple de polymère à UCST est le poly(méthacrylamide) (PMAA), avec une température de transition de phase d'environ 57 °C¹⁷. D'un point de vue macroscopique, la solution se trouble lorsque le polymère en solution devient hydrophobe. Les polymères passent d'une solution monophasique, constituée d'un mélange polymère-solvant, à une solution biphasique, avec le polymère précipité dans le solvant lors de la variation de température. Les diagrammes de phases des polymères à LCST et UCST sont donnés Figure 6. Les températures de transition

de phase dépendent de la nature chimique, de la masse molaire et de la concentration volumique des polymères en solution. Le Tableau 1 donne une liste non exhaustive de polymères à LCST et UCST. Les polymères à LCST sont majoritaires, il existe très peu d'exemples de polymères à UCST.

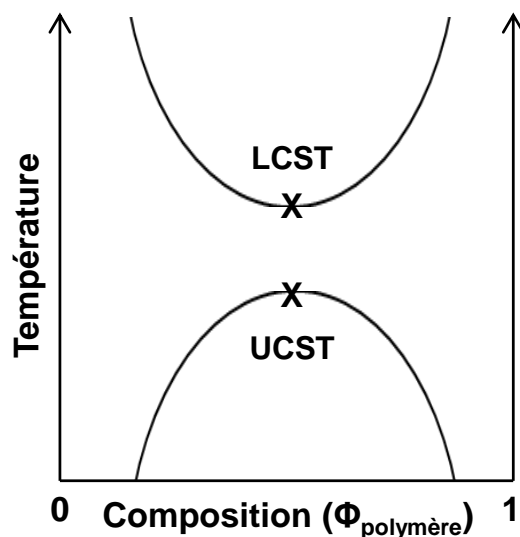


Figure 6. Diagramme de phases de mélange binaire polymère-solvant présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) et une température critique supérieure de solubilité (UCST).

Tableau 1. Exemples de polymères thermosensibles UCST et LCST

Dérivés de Poly(N-méthacrylamide)				
Sigles	Polymère	Type	T (°C)	Réf.
PMA	Poly(méthacrylamide)	UCST	57	18
PNAAM	Poly(N-acryloylasparaginamide) ^o	UCST	4-28	18
PNAGA	Poly(N-acryloylglycinamide) ^o	UCST	22-23	19
PNcPAM	Poly(N-cyclopropylacrylamide) ^o	LCST	53	20
PDEAM	Poly(N-diéthylacrylamide)	LCST	32	18
PEAM	Poly(N-éthylacrylamide)	LCST	82	18
PNIPMAM	Poly(N-isopropylméthacrylamide)	LCST	47	21
PNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamide)	LCST	30-35	16
PnPAM	Poly(N-propylacrylamide)	LCST	10	22
Poly(N-vinylcaprolactame)				
Sigles	Polymère	Type	T (°C)	Réf.
PVCL	Poly(N-vinylcaprolactame)	LCST	32	23
Dérivés de Poly(alkyl oxazoline)				
Sigles	Polymère	Type	T (°C)	Réf.
PcPOz	Poly(2-cyclopropyl-2-oxazoline)	LCST	30-54	24
PEOz	Poly(2-éthyl-2-oxazoline)	LCST	62-65	25
PiPOz	Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)	LCST	36-39	26
PnPOz	Poly(2-n-propyl-2-oxazoline)	LCST	24-43	25
Dérivés d'oligo(éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate				
Sigles	Polymère	Type	T (°C)	Réf.
PMEO ₂ MA n=2 ^o	Poly(2-(2-méthoxyéthoxy)éthyl méthacrylate)	LCST	26	27
PmDEGA n=2	Poly(di(éthylène glycol) éthyl éther acrylate)	LCST	13	28
PeDEGA n=2	Poly(di(éthylène glycol) éthyl éther acrylate)	LCST	40	28
PmOEGA n=8-9	Poly(éthylène glycol) méthyl éther acrylate)	LCST	92	28
POEGMA 300 n=4-5	Poly(éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate	LCST	64	29
POEGMA 475 n=8-9	Poly(éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate	LCST	90	30
PeTEGA n=3	Poly(tri(éthylène glycol) méthyl éther acrylate)	LCST	35	28

Les températures de transition de phase (LCST, UCST) peuvent être détectées par spectroscopie UV-visible ou par diffusion dynamique de la lumière (DLS), car la séparation de phase du polymère dans l'eau provoque le collapse des chaînes de polymère sur elles-mêmes et la dispersion des polymères dans l'eau devient trouble. D'autres techniques, telles que la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) permettent de mettre en évidence les mécanismes de transition de phase des polymères thermosensibles. H. G. Schild *et al.* ont montré par des analyses DSC que la transition de phase est due à une rupture des liaisons hydrogènes entre les polymères et l'eau lorsque la température augmente. Ce phénomène est observé par la présence d'un pic exothermique sur les courbes DSC³¹. Par ailleurs, C.V. Rice *et al.* ont étudié la LCST par spectroscopie RMN haute résolution en rotation à l'angle magique (HRMAS-NMR) et ont proposé un mécanisme en deux étapes pour cette transition : tout d'abord une réorganisation des chaînes de polymère, puis une rupture des liaisons hydrogènes entre le polymère et l'eau³².

Le PNIPAM est le polymère thermosensible à LCST le plus étudié dans la littérature. Il est composé d'un groupement amide (polaire) pouvant former des liaisons hydrogènes, et de groupements isopropyl (hydrophobes). Ces groupements sont à la base du caractère thermosensible de ce polymère. Le monomère NIPAM est hautement toxique, certaines études ont montré que la cytotoxicité du NIPAM après polymérisation est moindre, voire nulle. Cependant, malgré plusieurs cycles de purification, lorsque les chaînes polymères sont réticulées, des monomères peuvent rester piégés dans la matrice polymère, rendant le nanosystème toxique^{33,34}. En outre, de part de sa structure chimique et la présence de groupements amides, le PNIPAM peut interagir avec les protéines du corps humain, rendant difficile son utilisation pour des applications biomédicales³⁵. Plus récemment, des polymères thermosensibles biocompatibles, tels que des dérivés du poly(N-vinylcaprolactam) (PVCL)^{33,36–38} et des dérivés d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs)^{28,39–41} ont été également étudiés. La valeur de la LCST du PVCL est proche de celle du PNIPAM (LCST \approx 32-35 °C). Le PVCL est composé d'un cycle amide (5 carbones) permettant la formation de liaisons hydrogènes et d'une chaîne carbonée hydrophobe. Néanmoins, contrairement au PNIPAM, la transition de phase du PVCL est fortement dépendante de la masse molaire et de la concentration massique du polymère en solution^{42,43}.

Par ailleurs, les polymères-OEGMAs sont une nouvelle famille de polymères thermosensibles et biocompatibles^{28,39–41}. Ces polymères sont constitués de plusieurs

groupements éthylène glycol (motif de répétition), de groupements esters (hydrophiles) et d'une chaîne carbonée (hydrophobe). La balance hydrophile-hydrophobe de ces polymères est reliée au nombre d'unités (n). Lorsque n augmente le polymère devient de plus en plus hydrophile. La valeur de n permet donc de faire varier la valeur de la LCST entre $T = 26\text{ °C}$ et $T > 90\text{ °C}$. De même, le mélange de deux ou plusieurs monomères à LCST différentes, permet d'obtenir un copolymère avec une nouvelle valeur de LCST. Il est donc possible d'ajuster la LCST sur une large gamme de températures^{44,45}. Les structures chimiques et les valeurs de LCST de ces polymères sont données Figure 7.

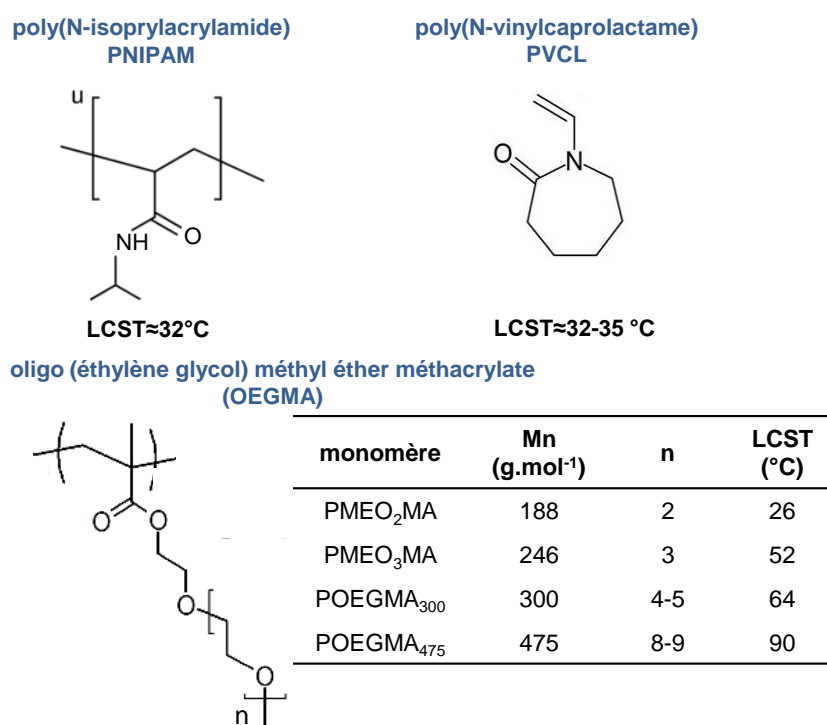


Figure 7. Structures chimiques et valeurs de LCST des polymères thermosensibles PNIPAM, PVCL et POEGMA.

La température de transition de phase des polymères thermosensibles peut être modulée en faisant varier la structure chimique finale du polymère (balance hydrophile-hydrophobe) ou en faisant varier la composition du milieu de dispersion (force ionique, co-solvant).

B. Les polymères sensibles au pH

Les polymères sensibles au pH sont constitués des groupements acides et/ou basiques⁴⁶. Parmi les monomères possédant des groupements acides avec des protons labiles, nous pouvons citer l'acide carboxylique ($-\text{COOH}/-\text{COO}^-$), l'acide sulfonique ($-\text{SO}_3\text{H}/-\text{SO}_3^-$), l'acide phosphorique ($-\text{PO}_4\text{H}_2/-\text{PO}_4\text{H}^-$). Les polymères formés

avec ces groupements sont des polyacides. L'équilibre entre la forme protonée et la forme déprotonée est défini par la constante d'acidité (pK_a). À $pH < pK_a$, les interactions polymère-polymère sont favorisées, caractérisées par la formation des liaisons hydrogènes entre les groupements acides et la chaîne carbonée et le polymère est hydrophobe ; à $pH > pK_a$, les polymères deviennent hydrophiles grâce à l'apparition de répulsions électrostatiques. Par ailleurs, les polymères dits polybases sont formés par de groupements chargés positivement (cationiques) et neutres ; par exemple les groupements amides. Ils ont un comportement opposé : à $pH < pK_a$, les groupements sont chargés positivement et les polymères sont hydrophiles ; et à $pH > pK_a$, les groupements sont neutres et les polymères sont hydrophobes. Des exemples de polymères sensibles au pH sont donnés Figure 8. Ces polymères sont également sensibles à la force ionique de la dispersion. Ainsi, l'ajout de sels dans la solution provoque l'écrantage des charges ioniques des polymères dû à la présence de contre-ions, les répulsions électrostatiques vont donc diminuer et la balance hydrophile-hydrophobe sera modifiée.

C. Les polymères sensibles à la lumière et au champ électrique

Les polymères sensibles à la lumière possèdent des groupements chimiques capables de changer de conformation en présence d'une irradiation lumineuse. Les dérivés de l'azobenzène, possédant une double liaison $-N=N-$, sont les plus connus. Sous irradiation UV, la molécule passe d'une conformation de type *trans* vers une conformation *cis*⁴⁷. D'autres molécules, telles que le 2-diazo-1,2-naphtoquinone (DNQ) peuvent rompre des liaisons covalentes et former des ions au sein de la molécule⁴⁸. Par ailleurs, les polymères sensibles au champ électrique possèdent des charges ioniques en solution, ce sont de polyélectrolytes. Ces polymères ne subissent pas de changement de solubilité. Le champ électrique va provoquer un mouvement des ions au sein de la solution, et par conséquent provoquer le déplacement des chaînes de polymère. Les polyélectrolytes sensibles au champ électrique sont aussi sensibles au pH et à la force ionique du milieu⁴⁹.

Dans cette thèse, on s'intéressera particulièrement aux polymères thermosensibles dérivés d'oligo (éthylène glycol) méthyle éther méthacrylate (OEGMAs) pour l'élaboration de nanogels.

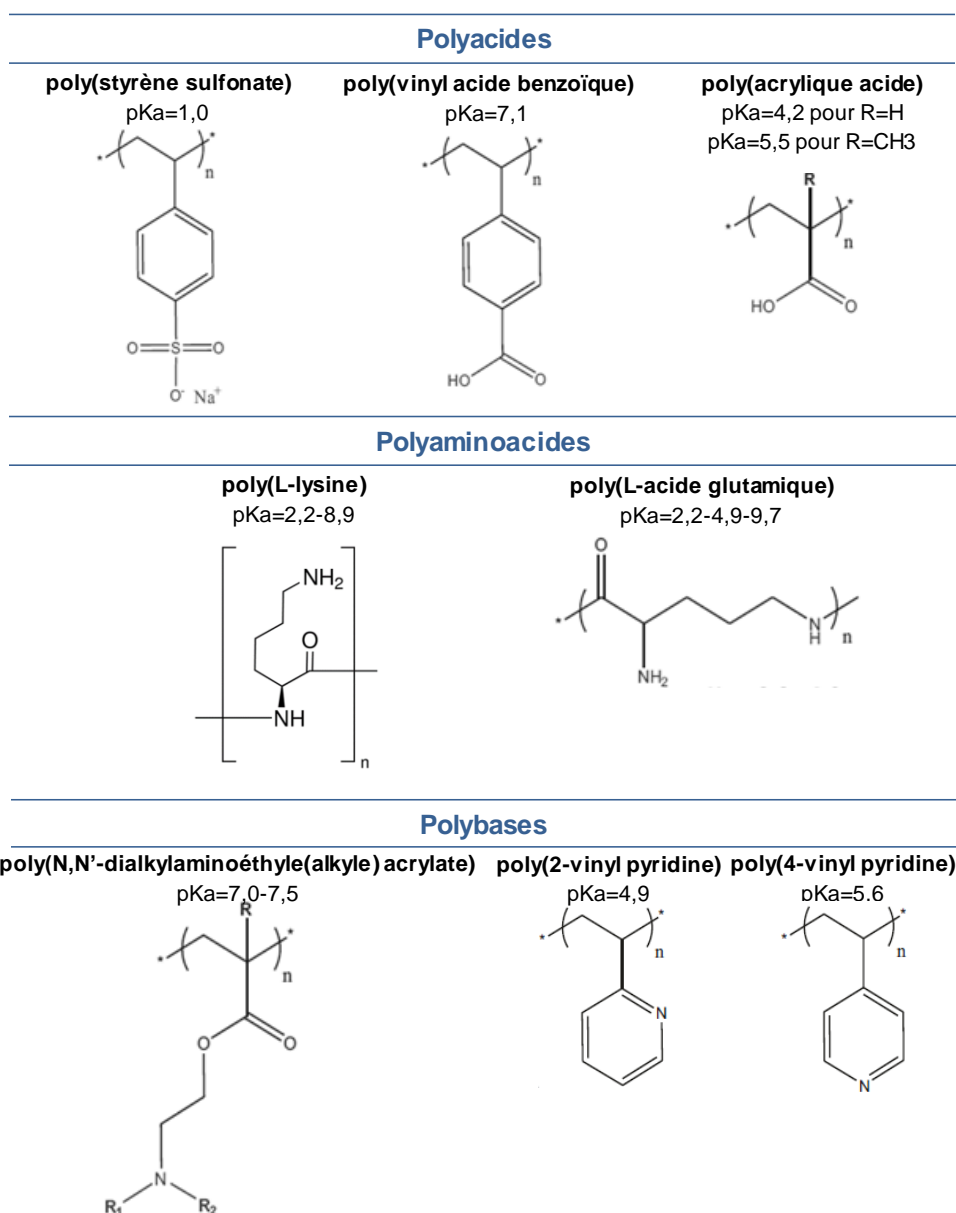


Figure 8. Structures chimiques et valeurs de pKa des polymères sensibles au pH. Adapté de Cayre *et al.*, Soft Matter (2011)⁴⁸.

2.1.1. Synthèse de nanogels thermosensibles par précipitation

Plusieurs protocoles pour la synthèse de nanogels thermosensibles ont été mis au point dans la littérature. Ils peuvent être classés dans deux catégories⁵⁰ :

- (1) **Polymérisation en milieu initial biphasique** : polymérisation en émulsion, miniémulsion, microémulsion, suspension.
- (2) **Polymérisation en milieu initial monophasique** : polymérisation en dispersion ou par précipitation. Dans le cas d'une polymérisation par dispersion, les nanogels sont

stabilisés par la présence de tensioactifs, alors que dans la polymérisation par précipitation, ce sont les charges de l'amorceur qui jouent ce rôle.

La polymérisation radicalaire par précipitation dans l'eau repose sur le changement de la balance hydrophile / hydrophobe des chaînes polymères thermosensibles, lorsque la température du milieu devient supérieure à leur température de transition de phase (VPTT). Au début de la réaction, $T < VPTT$, tous les réactifs (monomères, réticulant, amorceur) sont solubles dans l'eau. Pour déclencher la polymérisation, le mélange de réactifs est chauffé entre 40 et 90 °C en fonction des monomères utilisés, avec $T > VPTT$. À cette température, l'amorceur va former des radicaux (étape d'amorçage). Puis, les monomères vont former des chaînes de plus en plus longues jusqu'à une taille critique (étape de propagation). Ensuite, les chaînes de polymères formées vont précipiter et adopter une conformation globulaire en formant des nucléi (étape de nucléation). La solution devient trouble en quelques minutes. Les nucléi vont continuer à croître (étape de croissance du nucléi). La fin de la polymérisation est atteinte lorsque le nombre de particules en dispersion est constant. Ce mécanisme de polymérisation, illustré au chapitre II, est bien connu^{51,52}. Les particules obtenues sont sphériques et constituées de polymères réticulés. La stabilité colloïdale des nanogels est assurée soit par répulsion électrostatique des charges à leur surface, soit par encombrement stérique des chaînes de polymères.

2.1.2. Paramètres expérimentaux influençant les propriétés physico-chimiques des nanogels

A. Influence du taux de solide des réactifs

Pour pouvoir effectuer la polymérisation par précipitation, le taux de solide des réactifs doit être très faible, de l'ordre de 1 à 2% maximum^{37,53}. À des taux de solide très élevés, les nanogels vont précipiter et former des nœuds de réticulation inter-particulaires⁵⁴.

B. Influence des co-monomères

L'ajout de co-monomères hydrophiles modifie l'étape de précipitation des chaînes de polymère. Plus la quantité du co-monomère augmente, plus le polymère formé est hydrophile et moins il pourra précipiter pour former les nucléi. Ainsi, R. Pelton *et al.* ont montré qu'au-delà d'une fraction molaire de 10% d'acrylamide (AM, co-monomère hydrophile), les nanogels poly(NIPAM-co-AM) ne précipitent plus⁵³. De même, l'ajout de co-monomères

hydrophiles déplace la VPTT vers de plus hautes températures⁴⁵. Par ailleurs, l'ajout d'un co-monomère chargé (cationique ou anionique) modifie également l'étape de précipitation. Ces co-monomères vont stabiliser fortement les nucléi et réduire le diamètre final des nanogels⁵⁵. Pour des co-monomères hydrophiles et non chargés, par exemple du poly(éthylène glycol), la taille des nanogels augmente^{56,57}.

C. Influence du réticulant et des tensioactifs

Le taux de réticulant ne doit pas excéder une fraction molaire de 15% par rapport aux monomères afin de limiter les phénomènes de réticulation inter-particules. La capacité des nanogels à gonfler, et donc le taux de gonflement (Q) est directement relié à la quantité de réticulant utilisé lors de la synthèse. À faible taux de réticulant, les nanogels sont très déformables, et la variation du volume entre l'état gonflé et dégonflé est importante. Les nanogels sont dits *mous*. H. Bachman *et al.* ont réussi à synthétiser des nanogels à base de monomères-OEGMAs et sans ajout de réticulant. Les nanogels obtenus sont capables d'encapsuler une plus grande quantité d'eau ; ils sont très souples et très déformables. Les auteurs les ont nommé nanogels *ultramous* (*ultrasoft nanogels*). À contrario, lorsque le taux de réticulation est élevé, les nanogels sont dit *durs*, car ils sont de moins en moins déformables et leur capacité à gonfler-dégonfler est réduite. Les propriétés physico-chimiques de ces nanogels sont proches de celles des nanoparticules inorganiques dures. Par ailleurs, l'ajout de tensioactifs lors de la polymérisation par précipitation des nanogels permet de faire varier le diamètre final des nanogels. Plus la quantité initiale de tensioactif augmente, plus les nanogels obtenus seront petits^{50,58}.

2.1.3. Propriétés physico-chimiques des nanogels stimulables en solution

Les nanogels en solution ont un comportement similaire aux gels macroscopiques, car ces deux systèmes sont constitués d'un réseau polymérique réticulé tridimensionnel et gonflé dans l'eau ; la différence principale étant leur taille (échelle nanométrique vs. échelle macroscopique). Dans la littérature, plusieurs auteurs ont étudié le comportement des gels macroscopiques et des nanogels en solution par rapport à leurs propriétés physico-chimiques (structure chimique des polymères, densité de réticulation, teneur en eau, teneur en polymère, caractère hydrophobe/hydrophile, chaînes neutres ou chargées)⁵⁹⁻⁶¹. Le gonflement des gels dépend de plusieurs paramètres : l'affinité des polymères pour le solvant permettant un bon ou un mauvais gonflement de la matrice polymère ; la densité de réticulation, reliée

directement au taux de gonflement, limite la quantité d'eau encapsulée ; l'existence de répulsions électrostatiques (pour des polymères chargés) et/ou d'encombrement stérique.

D. Théorie de Flory et Rehner

Dans la littérature, plusieurs modèles théoriques ont été établis pour décrire la transition de phase gonflement-dégonflement des nanogels thermosensibles. La plupart de ces modèles sont basés sur la théorie de gonflement de Flory et Rehner⁶²⁻⁶⁵. La théorie de Flory-Rehner est une extension de la théorie du comportement des polymères non réticulés en solution. Selon cette théorie, pour les polymères réticulés, l'équilibre thermodynamique d'un gel dans un solvant est atteint lorsque les potentiels chimiques du solvant à l'intérieur (μ_s^{int}) et à l'extérieur (μ_s^{ext}) du gel sont tels que : $\mu_s^{int} = \mu_s^{ext}$. À l'équilibre, la pression osmotique du gel (π) en solution est nulle et est définie telle que :

$$\pi = \frac{\mu_s^{int} - \mu_s^{ext}}{v_s} = 0 \quad \text{et} \quad \pi = -\frac{N_A}{v_s} \frac{\partial \Delta G}{\partial N_s} \quad \text{Eq. 1}$$

avec v_s le volume molaire du solvant, N_A le nombre d'Avogadro, N_s le nombre de molécules du solvant et ΔG la variation de l'énergie libre du système.

Si π augmente, le gonflement des nanogels est favorisé, alors que si π diminue, le gonflement des nanogels est défavorisé. D'après la théorie de Flory-Rehner, la variation de l'énergie libre d'un gel en solution est telle que :

$$\Delta G = \Delta G_{mélange} + \Delta G_{élastique} + \Delta G_{ionique} = 0 \quad \text{Eq. 2}$$

avec $\Delta G_{mélange}$, $\Delta G_{élastique}$, $\Delta G_{ionique}$ l'énergie libre, élastique et ionique du mélange polymère-solvant.

Donc, le gonflement du gel est à l'équilibre si :

$$\pi = \pi_{mélange} + \pi_{élastique} + \pi_{ionique} = 0 \quad \text{Eq. 3}$$

$\Delta G_{mélange}$ décrit la solubilité du polymère dans le solvant. Pour des nanogels thermosensibles, à faible température, $\Delta G_{mélange} < 0$ et $\pi_{mélange} > 0$, provoquant le gonflement des nanogels (et vice-versa). La modification du milieu de dispersion peut induire une augmentation de la pression osmotique de mélange, par exemple lors de l'ajout de sels, réduisant ainsi la valeur de la VPTT. $\Delta G_{élastique}$ prend en compte l'effet de réticulation du gel sur le gonflement dans l'eau. L'étirement des chaînes polymères conduit à une variation de

cette énergie d'ordre entropique. Lorsque le degré de réticulation augmente, $\Delta G_{\text{élastique}}$ aussi, le gonflement maximal des nanogels diminue^{66,67}. $\Delta G_{\text{ionique}}$ prend en compte les charges ioniques présentes dans le réseau de polymères réticulés. Ainsi les nanogels constitués de polyélectrolytes, chargés (+) ou (-), auront une pression osmotique supérieure à celle des nanogels neutres, augmentant ainsi le gonflement par le mouvement des espèces ioniques en solution, entre l'extérieur et l'intérieur du gel.

Dans cette théorie, la présence de répulsions électrostatiques entre les charges des chaînes polymères dans la matrice en gel n'est pas prise en compte dans la valeur de $\Delta G_{\text{ionique}}$. La théorie de Flory-Rehner est un modèle simple, prenant en compte les différents paramètres mis en jeu lors du gonflement des nanogels. Néanmoins, cette théorie est basée sur quelques approximations à prendre en compte :

- Elle considère que les contributions de mélange, élastique et ionique sont distinctes. Or, des études ont montré que dans les cas de nanogels thermosensibles ces contributions sont corrélées⁶⁸.
- Elle considère une distribution homogène des monomères et groupements fonctionnels au sein de la matrice polymère. Or dans la réalité, il est difficile de contrôler complètement la structure interne des nanogels lors de la synthèse par polymérisation par précipitation. Récemment, A. Pich *et al.* ont développé un modèle mathématique, dérivé de la théorie de Flory-Rehner, et prenant en compte la structure hétérogène des nanogels de type cœur@coquille^{12,69}.
- Les phénomènes de répulsion électrostatique sont négligés dans la contribution ionique ($\Delta G_{\text{ionique}}$), assumant que la mobilité des contre-ions est le phénomène prédominant. Or les contributions électrostatiques des charges fixes dans la matrice polymère (forces attractives et/ou répulsives) doivent être prises en compte. T. Hoare *et al.* ont développé récemment un modèle mathématique prenant en compte les contributions électrostatiques des groupements –COOH dans le gonflement de nanogels de PNIPAM⁷⁰.

E. Structure interne des nanogels

La structure interne des nanogels peut être modifiée en fonction de la nature des monomères utilisés et du protocole de synthèse employé. T. Hoare et D. McLean ont proposé deux procédés pour faire varier la structure interne des nanogels à base de PNIPAM : un procédé durant lequel le monomère le plus réactif est ajouté en continu ; et un procédé en

batch en utilisant des monomères avec des rapports de réactivité très différents de celui du monomère principal⁶⁶. De même, Pelton *et al.* ont préparé différents lots de nanogels de PNIPAM fonctionnalisés avec des co-monomères acides ayant une réactivité différente (acide acrylique, acide méthacrylique, acide de vinyle acétique et acide fumarique). Les auteurs ont démontré que les groupements carboxyliques étaient localisés différemment au sein de la matrice polymère en fonction de rapport de réactivité co-monomères/PNIPAM, comme illustré Figure 9. En faisant varier la nature et la réactivité du co-monomère, la répartition des groupements –COOH peut être modulée⁶⁷.

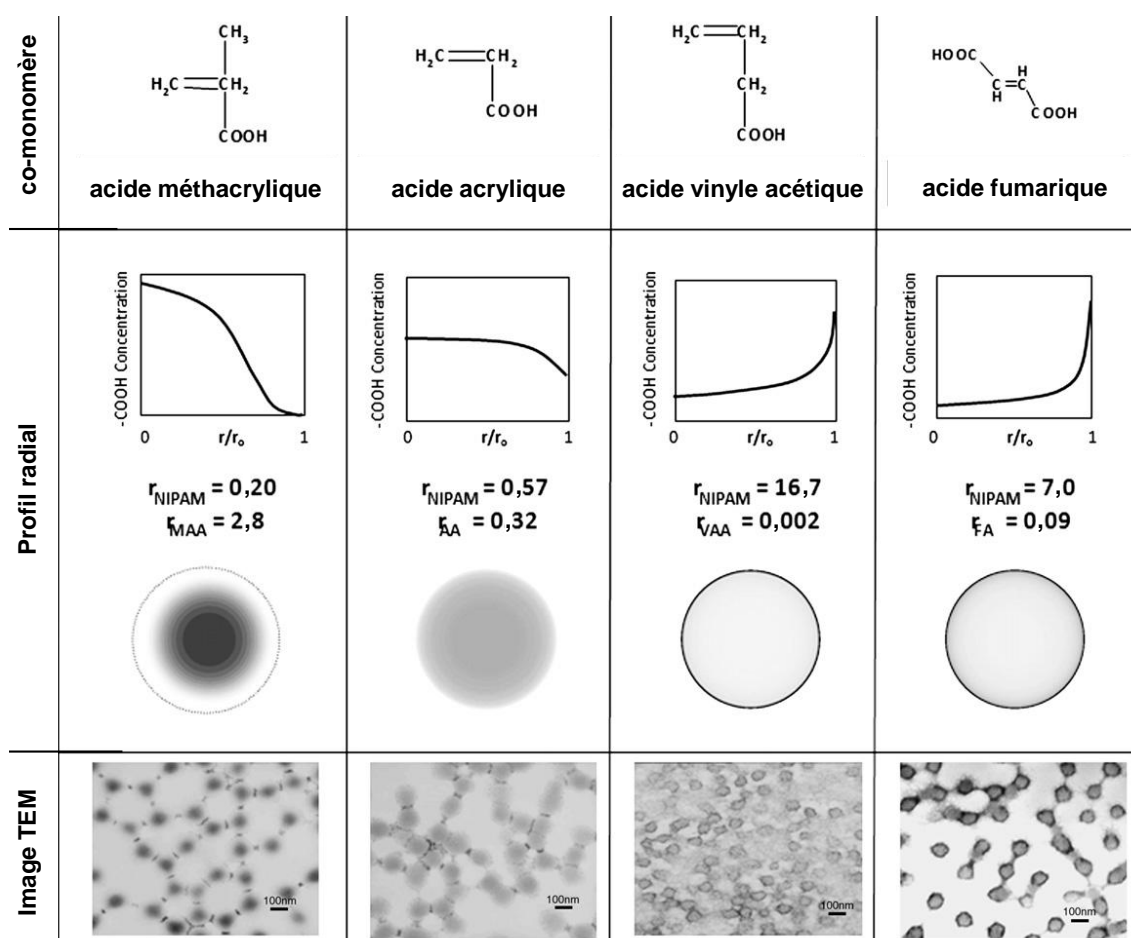


Figure 9. Structure interne des nanogels thermosensibles de PNIPAM fonctionnalisés avec des co-monomères acides de réactivité différente : acide méthacrylique (MAA), acide acrylique (AA), acide de vinyle acétique (VAA) et acide fumarique (FA). Adapté de Hoare *et al.*, Current Opinion in Colloid&Interface Science (2008)⁶⁷.

2.2. Les nanogels hybrides

Les nanogels hybrides sont constitués de polymères (partie organique) et de nanoparticules inorganiques, à base d'oxydes métalliques (SiO₂, Fe₂O₃, Fe₃O₄, TiO₂, ZnO), de la silice, de quantum dots, de métaux nobles (or, argent) et d'autres métaux (cuivre, zinc, cobalt) et non-métaux (sélénium). On se limitera ici au cas des polymères thermosensibles.

Les nanogels hybrides combinent les propriétés intrinsèques des différents matériaux les constituant. Leur matrice polymère permet d’encapsuler et de libérer de grandes quantités de molécules actives, alors que les nanoparticules inorganiques peuvent générer de la chaleur (NPs d’oxyde de fer, d’or), émettre de la fluorescence (quantum dots). Parmi les NPs inorganiques les plus utilisées pour le traitement anticancéreux figurent les quantum dots (QD), les NPs d’or et les oxydes métalliques magnétiques. Toutes ces NPs présentent des propriétés physiques particulièrement intéressantes pour les applications biomédicales.

2.2.1. Composition et morphologie

Les nanogels hybrides et thermosensibles peuvent être classés selon la nature chimique de l’association organique-inorganique, de type covalente ou non-covalente, comme illustré Figure 10.

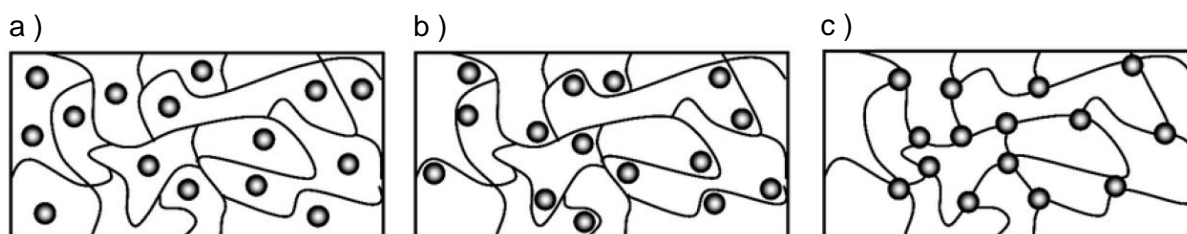


Figure 10. Illustration des différentes structures de nanogels hybrides contenant des nanoparticules inorganiques. (a) NPs encapsulées et (b) adsorbées dans un réseau réticulé de polymères. (c) NPs liées de manière covalente et servant de nœuds de réticulation dans un réseau de polymères. Adapté de Messing *et al.*, Polymer Chemistry (2010)⁷¹.

En outre, les nanogels hybrides peuvent également être classés en fonction de leur morphologie et de la distribution des NPs au sein de la matrice polymère. Les parties organique et inorganique peuvent être organisées en une structure de type cœur@coquille (Figure 11a et 11b), ou bien les NPs inorganiques peuvent être distribuées au sein de la matrice en gel (Figure 11c).

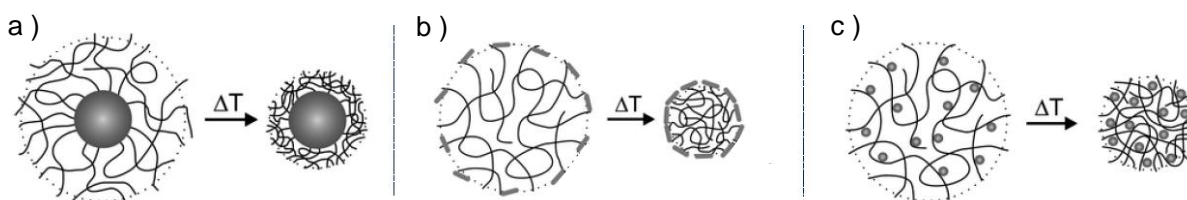


Figure 11. Illustration de nanogels hybrides thermosensibles avec de morphologies différentes : (a) cœur-inorganique@coquille-organique, (b) cœur-organique@coquille-inorganique, et (c) NPs inorganiques distribuées au sein d’une matrice organique. Adapté de Karg *et al.*, Journal of Materials Chemistry (2009)⁷².

2.2.2. Voies de synthèse des nanogels hybrides

Les principales voies de synthèse de nanogels hybrides thermosensibles, constitués par une matrice de polymères réticulés et des nanoparticules inorganiques décrites dans la littérature sont détaillées ci-dessous :

A. Synthèse par polymérisation en présence de nanoparticules

Ce protocole de synthèse consiste à polymériser les monomères thermosensibles en présence des NPs inorganiques préalablement synthétisées. Cette voie de synthèse exige de contrôler plusieurs paramètres, tels que la stabilité des NPs inorganiques dans le milieu réactionnel au cours de la polymérisation⁷³ et les interactions entre les NPs et les chaînes de polymère en croissance^{73,74}.

Ainsi, Kondo *et al.* ont synthétisé des nanogels hybrides de PNIPAM contenant des NPs de Fe₃O₄. Pour permettre la dispersion des NPs de Fe₃O₄, les auteurs ont synthétisé autour des NPs une coquille de polystyrène (PS). Cette coquille permet également de créer des interactions avec les chaînes de PNIPAM en croissance et de faciliter la polymérisation autour des NPs⁷³. Cette méthode permet de synthétiser des nanogels hybrides thermosensibles et magnétiques capables d'interagir avec des protéines pour leur bioséparation. Néanmoins, cette méthode ne permet pas de contrôler le diamètre des nanogels (100 à 400 nm), ni la quantité de NPs incorporée (5–20 % massique)^{73,75}. Plus récemment, l'effet de la stabilisation des NPs sur la synthèse de nanogels hybrides Fe₃O₄/PNIPAM a été étudié par Jaiswal *et al.*⁷⁶. Lors de cette étude, différents ligands (acide citrique, éthylène diamine, chitosane) ont été utilisés. Il a été constaté que lorsque les NPs sont stables dans la solution durant la polymérisation, le ratio massique en NPs (%) au sein des nanogels est incrémenté jusqu'à 40%. Ce procédé de synthèse permet d'élaborer des nanogels hybrides en une seule étape. Cependant, il est très difficile de contrôler les propriétés physico-chimiques des nanogels (taille, polydispersité, distribution des NPs au sein de la matrice polymère), ainsi que la quantité de NPs incorporée au sein de la matrice. En outre, la polymérisation du polymère en présence de NPs a tendance à former des nanogels hybrides avec une structure cœur@coquille, avec un cœur contenant principalement des NPs et une coquille composée essentiellement de polymère.

B. Synthèse *in situ* des nanoparticules dans les nanogels

Les nanogels hybrides peuvent également être élaborés en synthétisant *in situ* les NPs au sein de la matrice polymère. Pour cela, des nanogels thermosensibles chargés (cationiques ou anioniques) sont synthétisés préalablement, puis les NPs sont préparées dans la dispersion de nanogels par réduction de sels métalliques. Les sels métalliques vont s'adsorber préférentiellement au sein des nanogels avant la réduction, grâce aux charges des chaînes de polymère. Cette technique a été utilisée par Kumacheva *et al.* pour synthétiser des nanogels hybrides thermosensibles et sensibles au pH de PNIPAM fonctionnalisés avec de l'acide acrylique (AA) et encapsulant des quantum dots⁷⁷, de NPs d'argent⁷⁸ et des NPs d'oxyde de fer⁷⁹. De même, Wu *et al.* ont synthétisé des nanogels hybrides contenant des NPs bimétalliques Au-Ag dans des nanogels de poly(NIPAM-co-AA-AM). Ces nanogels possèdent des propriétés optiques de fluorescence intéressantes pour des applications biomédicales⁸⁰. Par ailleurs, des nanogels hybrides biocompatibles PVCL-co-AAEM (AAEM : acétoacétoxyéthyle méthacrylate) et contenant des NPs d'oxyde de fer (Fe₃O₄) ou encore d'oxyde de zinc (ZnO) ont été préparés par A. Pich *et al.* D'après les auteurs, la réduction de sels métalliques a lieu à l'intérieur de la matrice polymère par interactions électrostatiques entre les sels et les groupements β-dicétones des monomères AAEM et les groupements amides du PVCL. Lorsque le ratio massique en NPs au sein de la matrice polymère augmente, les auteurs ont constaté une perte de la stabilité colloïdale des nanogels hybrides^{81,82}.

Par ailleurs, Kawaguchi *et al.* ont préparé des nanogels de PNIPAM possédant des groupements glycidyl méthacrylate (GMA). L'incorporation de groupements GMA est très intéressante, car ces groupements peuvent être modifiés après polymérisation pour introduire de fonctions actives, telles que de fonctions amines, carboxyliques (–COOH/–COO[–]) et sulfonates (R–SO₂OH/R–SO₂O[–]), par post-modification avec des composés thiolés^{83–85}. Cette méthode de synthèse des NPs *in situ* dans les nanogels permet de les incorporer facilement et de mieux contrôler leur localisation. Nonobstant, les réactifs nécessaires pour la mise en place de ce protocole, tels que les sels métalliques et l'agent réducteur, sont toxiques.

C. Synthèse par transfert de phase de nanoparticules

Ce protocole de synthèse permettant d'élaborer des nanogels hybrides à partir de NPs hydrophobes consiste à mélanger une dispersion de NPs inorganiques avec une dispersion de

nanogels dans un solvant organique pour lequel les deux types de nano-objets sont stables. Après une période d'agitation pour permettre aux NPs de diffuser à travers la matrice polymère, l'assemblage (nanogels + NPs) est transféré dans une solution aqueuse. L'incorporation des NPs dans les nanogels est obtenue grâce à des interactions hydrophobes entre les NPs et les chaînes de polymère. En suivant ce protocole, Shen L. *et al.*, ont préparé des nanogels de PNIPAM contenant des NPs de CdSe dans du THF, puis les nanogels hybrides ont été transférés dans l'eau⁸⁶. Même si ce procédé permet d'encapsuler des NPs inorganiques hydrophobes, le taux d'incorporation est limité par la diffusion des NPs au sein de la matrice en gel, et reste faible.

D. Synthèse par ajout post-synthèse des nanoparticules dans les nanogels

Par ailleurs, la synthèse des nanogels hybrides peut être effectuée par un assemblage post-synthèse des nanogels thermosensibles et des NPs inorganiques. Les constituants (nanogels et NPs) sont synthétisés séparément avant d'être assemblés. Puis, les dispersions des nanogels et des NPs sont mélangées. L'assemblage a lieu par interactions électrostatiques, par formation de complexes ou par liaisons covalentes entre les nanogels et les NPs. Ainsi, des nanogels hybrides magnétiques de PNIPAM contenant des NPs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ont été élaborés par Pichot *et al.*^{87,88}. Pour pouvoir effectuer l'assemblage, les auteurs ont préparé d'une part des NPs chargées négativement, par un enrobage de citrate de sodium ; et d'autre part des nanogels chargés positivement par des groupements amines. L'assemblage de ces objets a lieu à pH 7,0. Par contre, lorsque le pH est modifié, les auteurs ont observé la désorption des NPs. Par ailleurs, des nanogels hybrides contenant des quantum dots de tellurure de cadmium (CdTe) ont été synthétisés par Gong *et al.*⁸⁹ L'assemblage post-synthèse est effectué par des liaisons hydrogènes entre les groupements amides des nanogels de PNIPAM et les groupements glycérol présents à la surface des quantum dots. Les propriétés de fluorescence de ces nanogels sont modifiables en fonction de la température. L'ajout post-synthèse est une méthode très intéressante, puisqu'elle permet de contrôler les propriétés physico-chimiques à la fois des NPs inorganiques et de la matrice polymère et d'obtenir une bonne répartition des NPs au sein de la matrice. De plus, le protocole est simple (mélange de deux dispersions colloïdales). Jusqu'à présent, ce protocole de synthèse a été très peu étudié dans la littérature car les taux d'encapsulation des NPs inorganiques sont faibles.

Récemment, une stratégie permettant d'incorporer une grande quantité de NPs à l'intérieur des nanogels à base de monomères d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs) a été mise en place par M. Boularas et al.⁹⁰. Cette méthode sera détaillée au Chapitre III.

2.3. Les nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules magnétiques (NPMs) à base d'oxydes de fer, telles que les particules de magnétite (Fe_3O_4) et les particules de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), sont de plus en plus utilisées pour des applications biomédicales grâce à leurs propriétés magnétiques et à leur biocompatibilité. En effet, ces particules ne possèdent pas d'élément intrinsèquement toxique. En outre, plusieurs études ont montré qu'elles se dégradent à l'intérieur du corps humain⁹¹. La magnétite est constituée d'un mélange de Fe^{III} et de Fe^{II} qui peut s'oxyder avec le temps tandis que les nanoparticules de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) présentent l'avantage d'être plus stables chimiquement, car c'est la forme oxydée de la magnétite. Ces deux composés présentent une structure cristalline de type spinelle inverse et leurs propriétés magnétiques sont similaires. En fonction du type de champ magnétique employé, les NPMs peuvent être utilisées dans plusieurs domaines de la médecine, comme illustré Figure 12. Ainsi, elles sont utilisées en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) en présence d'un champ magnétique permanent d'intensité élevée (0,1 à 7 Teslas)^{11,12}, pour la vectorisation de médicaments lorsqu'un gradient de champ magnétique est appliqué (0,5 à 2 T) et pour la thérapie (destruction des cellules tumorales et/ou délivrance de médicaments) par hyperthermie magnétique en présence d'un champ magnétique alternatif d'intensité plus faible (10 – 15 mT).

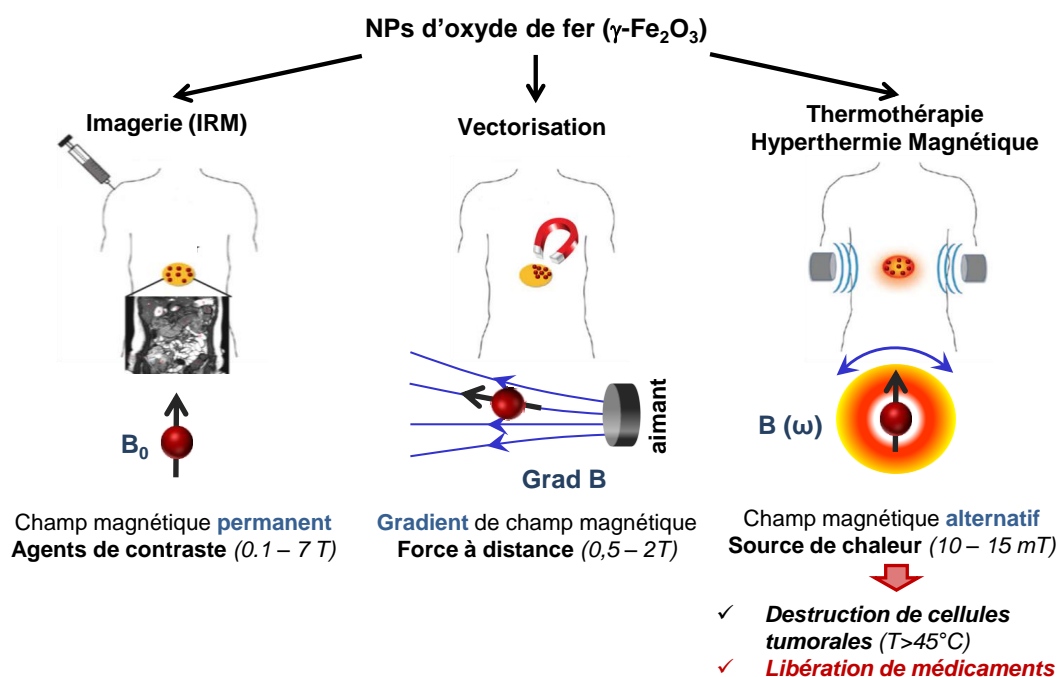


Figure 12. Applications biomédicales des nanoparticules magnétiques d’oxyde de fer, de type maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Lorsque les NPMs sont dispersées dans un solvant organique ou aqueux, elles forment un liquide magnétique appelé *ferrofluide*. Ces liquides magnétiques présentent des comportements originaux en présence d'un champ magnétique permanent ou alternatif.

2.3.1. Voies de synthèse des nanoparticules d’oxyde de fer

Les premiers ferrofluides datent de 1966 et ont été préparés par broyage d’un matériau magnétique pendant plusieurs semaines, suivi d’un ajout de tensioactif pour bien disperser et stabiliser les NPs obtenues. Actuellement, les NPs d’oxyde de fer sont synthétisées par deux méthodes chimiques décrites ci-dessous :

A. Synthèse par co-précipitation de sels métalliques

La synthèse par co-précipitation a été mise au point par R. Massart en 1980 (France) et consiste à faire précipiter de sels métalliques FeCl_2 et FeCl_3 dans une solution aqueuse d’ammoniac NH_3 à température ambiante⁹⁴. Ce procédé permet d’obtenir une grande quantité de NPMs stables dans l’eau ; cependant les NPs obtenues sont polydisperses. Cette méthode par co-précipitation a été utilisée pour la synthèse des NPs de maghémite utilisées dans cette thèse et sera détaillée dans le Chapitre III. En parallèle, R. S. Molday et D. Mackenzie ont mis au point un procédé permettant de synthétiser des nanoparticules magnétiques par

précipitation de FeCl_2 et FeCl_3 , en présence de dextran et dans un milieu alcalin (1982, USA)⁹⁵.

B. Synthèse à haute température

Parmi les synthèses à haute température, nous pouvons citer les réactions hydrothermales⁹⁶ et les réactions dans un solvant polyol⁹⁶ dans une solution aqueuse, ainsi que la réaction par décomposition des métaux carbonyles dans un solvant organique⁹⁷. Pour ces réactions, le contrôle de la température, de la pression, de la nature et de la quantité de solvant est essentiel pour pouvoir obtenir la taille souhaitée de NPs. À partir de ces protocoles, on obtient des dispersions de NPs très monodisperses, de taille comprise entre 4 et 60 nm. Le Tableau 2 regroupe les principaux avantages et inconvénients de ces techniques de synthèse, ainsi que les propriétés des NPMs obtenues (nature chimique, taille, morphologie).

Tableau 2. Comparaison des principales voies de synthèse chimiques pour l'élaboration de NPMs à base d'oxyde de fer. Adapté de⁹⁸.

	Procédé hydrolytique		Procédé d'hydrolyse forcée
	Co-précipitation	Hydrothermale	Solvant polyol
Avantages	Réactifs pas chers Conditions de réaction douces Synthèse dans l'eau Production à grande échelle	Monodisperse Contrôle de la taille Synthèse dans l'eau Propriétés magnétiques modifiables	Monodisperse Contrôle de la taille, cristallinité Production à grande échelle Propriétés magnétiques modifiables
Inconvénients	Polydisperse Oxydation non contrôlée	Hautes températures Toxicité des réactifs	Hautes températures Solvant organiques toxiques Transfert de phase
Nature chimique	Fe_3O_4 , Fe_2O_3 ; MFe_2O_4	Fe_3O_4 , Fe_2O_3	Fe_3O_4 , Fe_2O_3 ; MFe_2O_4 ; Cr_2O_3 ; MnO ; Co_3O_4 ; NiO
Diamètre	10-50 nm ; 50-100 nm	1-0,25 μm ; 15-31 nm	3-500 nm
Forme	Sphère	Disque, sphère, aiguille	Cube, sphère, triangle, tétrapode, bâtonnet
Référence	94,95,99,100	101	97,102–105

Les nanoparticules d'oxyde de fer de type maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) présentent des propriétés magnétiques qui peuvent varier en fonction de la taille et la morphologie des NPs et de leur stabilité colloïdale. Les synthèses actuelles permettent d'élaborer des NPMs avec des morphologies très différentes : des nanosphères, des nanocubes, des nanofleurs contenant uniquement de l'oxyde de fer. Des systèmes plus complexes tels que des dimères oxydes de fer/or ou des liposomes ultramagnétiques peuvent également être très intéressants pour des applications en nanomédecine (Figure 13)¹⁰⁶.

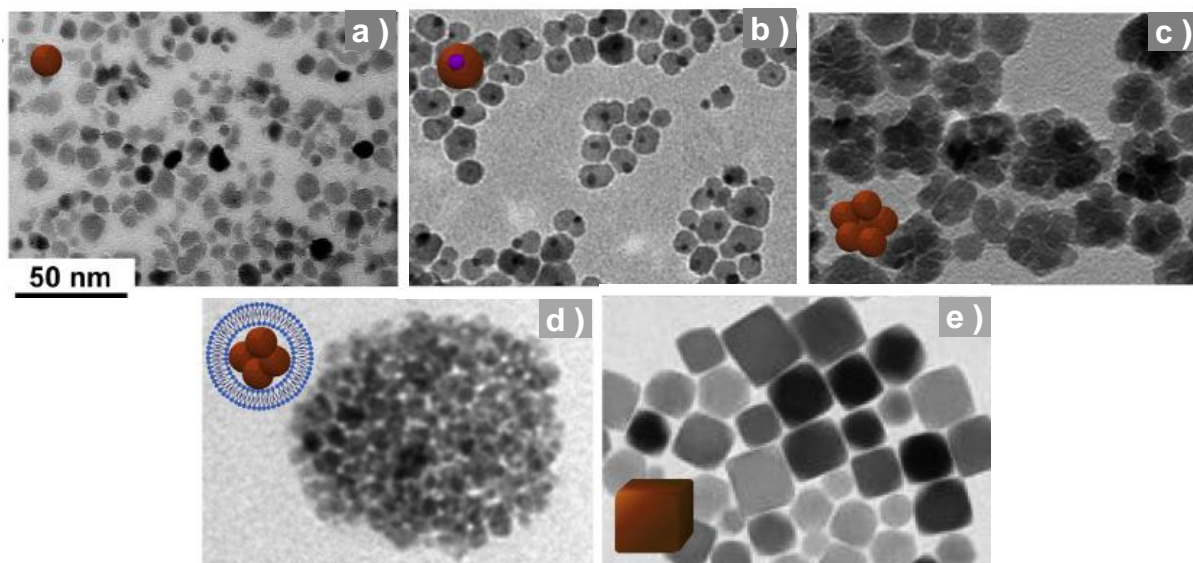


Figure 13. Nanoparticules d’oxyde de fer de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) pouvant être utilisées pour des applications biomédicales : (a) nanoparticules sphériques ; (b) dimères oxyde de fer/or (c) nanofleurs (d) liposomes ultramagnétiques et (e) nanocubes. Adapté de Di Corato *et al.*, *Biomaterials* (2014)¹⁰⁶.

2.3.2. Propriétés magnétiques des nanoparticules d’oxyde de fer

Les NPMs de maghémite ayant un diamètre inférieur à 20 nm sont des monocristaux formés par un seul domaine magnétique, ce qui leur confère des propriétés superparamagnétiques¹⁰⁷. Chaque nanoparticule possède un moment magnétique μ_i non nul, orienté selon l’axe principal d’aimantation de la nanoparticule. À T_{amb} , en absence de champ magnétique, les moments μ_i des NPMs en dispersion sont orientés de manière aléatoire à cause de l’agitation thermique. Dans ce cas l’aimantation globale ou somme des μ_i de la dispersion est donc nulle. Lorsqu’un champ magnétique est appliqué, les moments μ_i vont s’aligner suivant la direction du champ et l’aimantation globale sera supérieure à celle d’un matériau paramagnétique, d’où le terme superparamagnétique. Ce comportement est illustré Figure 14.

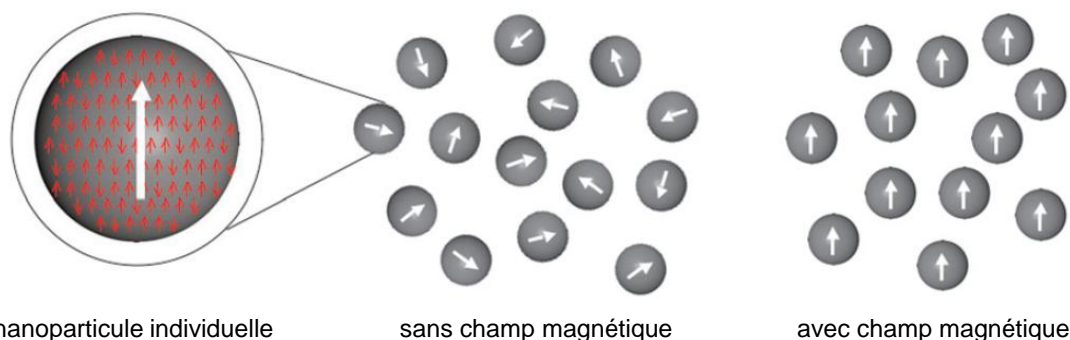


Figure 14. Schéma d’une nanoparticule superparamagnétique. Les moments μ_i dans chaque NPM sont ordonnés (flèches rouges). À température ambiante et en l’absence de champ magnétique, le moment magnétique global du système sera nul. Par contre, sous un champ magnétique, les moments μ_i vont

s'aligner suivant la direction du champ et l'aimantation globale sera positive. Adapté de Colombo *et al.*, Chemical Society Reviews (2012)⁹⁸.

Les NPMs sont capables de transformer une énergie électromagnétique en énergie thermique lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique alternatif (AMF), et donc de générer de la chaleur¹⁰⁸. Cette propriété est dite d'hyperthermie magnétique. Ainsi, les NPMs peuvent être utilisées en tant que sources de chaleur ou *hot spot* pour déclencher la libération des molécules, par exemple lors d'un traitement chimiothérapeutique ; ou bien pour la destruction de cellules tumorales via une thérapie si la température atteinte est supérieure à 45 °C. La dissipation de chaleur est gouvernée par deux modes de relaxation, la relaxation de Néel (basculement du moment magnétique des NPs) et la relaxation de Brown (rotation des NPs sur elles-mêmes). La relaxation de Néel est prépondérante pour les NPMs de maghémite de taille inférieure à 20 nm¹⁰⁸. Toutes ces propriétés sont détaillées au Chapitre III.

2.3.3. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer

Il a été démontré dans la littérature que les NPs d'oxyde de fer de type maghémite sont efficacement internalisées par les cellules souches sans affecter leurs fonctions ou leur capacité de différenciation¹⁰⁹. Par ailleurs, des études récentes ont démontré une biodégradation massive des NPs d'oxyde de fer dans des endosomes au sein des cellules en moins d'un mois, montrant que les tissus peuvent se purger eux-mêmes des NPs et que ces NPs ne sont pas toxiques. La dégradation des NPs est suivie de la libération intracellulaire d'ions fer sans affecter l'homéostasie cellulaire du fer.¹¹⁰⁻¹¹²

2.4. Les nanoparticules d'or

L'or est le métal noble par excellence. De par sa nature chimique, il est très inerte, ce qui le protège de l'oxydation et de la dégradation. Les nanoparticules d'or sont utilisées dans les applications biomédicales depuis leurs premières synthèses colloïdales il y a plus de trois siècles. Cependant, au cours des deux dernières décennies, de nombreuses équipes de recherche ont travaillé sur les différents modes de synthèse permettant de faire varier leur taille et leur morphologie, afin de moduler leurs propriétés optiques. Actuellement, ces NPs sont utilisées dans l'optoélectronique, le photovoltaïque et la nanomédecine (diagnostic et thérapie)^{113,114}.

2.4.1. Voies de synthèse des nanoparticules d'or

Le premier rapport scientifique décrivant un protocole de synthèse de nanoparticules d'or colloïdales est établi par Michael Faraday en 1857. Cette synthèse est basée sur la réduction aqueuse du chlorure d'or par le phosphore, en présence de disulfure de carbone (stabilisant)¹¹⁵. Aujourd'hui, la plupart de protocoles de synthèse de NPs d'or suivent une stratégie similaire à ce protocole : le sel d'or est réduit en présence de ligands s'accrochant à la surface des NPs en croissance pour empêcher leur agrégation. La taille des particules est ajustée en faisant varier la nature chimique et la quantité de d'agent réducteur, ainsi que la quantité d'ions Au³⁺.

A. Synthèse *in situ* de nanoparticules d'or

La synthèse *in situ* de NPs d'or est basée sur trois étapes principales : (1) la réduction de sels d'or avec des agents réducteurs, tels que les borohydrures, les aminoboranes, l'hydrazine, le formaldéhyde, l'hydroxylamine, les alcools saturés et insaturés, l'acide citrique et oxalique, les polyols et le peroxyde d'hydrogène (liste non exhaustive). Puis, (2) la stabilisation des NPs avec du citrate trisodique dihydraté, des ligands possédant des groupements thiols ou phosphores, des polymères et des tensioactifs. (3) Les NPs formées *in situ* sont ensuite utilisées pour la croissance de germes.

- **Méthode Turkevich (1951) :** Ici le citrate joue le rôle à la fois d'agent réducteur et de stabilisateur. Tout d'abord, l'acide tétrachloraurique (HAuCl₄) est chauffé jusqu'à ébullition, puis du citrate de sodium est ajouté rapidement sous agitation. Après quelques minutes, une dispersion colloïdale rouge est obtenue, contenant des NPs d'or d'environ 20 nm¹¹⁶.
- **Méthode Brust-Schiffrin (1994):** Procédé en deux étapes permettant de synthétiser des NPs d'or stabilisées par des ligands thiolés¹¹⁷. En effet, la liaison Au–S formée entre la surface des NPs d'or et les ligands –SH est relativement forte. Les NPs obtenues sont très monodisperses et de petite taille, entre 2 et 5 nm.
- **Méthode utilisant le citrate comme seul stabilisant (1996) :** Le groupe de Natan J. a mis au point un protocole de synthèse pour lequel le citrate de sodium est utilisé uniquement en tant que stabilisant et le tétrahydroborate de sodium (NaBH₄) est utilisé en tant qu'agent réducteur¹¹⁸. Pour cela, un mélange NaBH₄/citrate est ajouté dans une solution de HAuCl₄ à température ambiante. Cette méthode permet d'obtenir

des NPs d'or plus petites (de l'ordre de 6 nm) que celles obtenues par la méthode Turkevich.

Les méthodes *in situ* de Turkevich-Frens et de Brust-Schiffrin, avec des citrates et de ligands thiolates, restent les voies de synthèse les plus utilisées dans la littérature pour l'élaboration de NPs d'or. Elles fournissent des NPs d'or sphériques ou quasi-sphériques. De plus, il est bien connu que les fonctions thiols présentent une forte affinité par les surfaces d'or¹¹⁹. D'autres groupements, telles que les amines ($-\text{NH}_2$)¹²⁰, les sulfates ($-\text{SO}_2\text{O}^-$) ou sulfures ($-\text{S-R}$)¹²¹ et les acides carboxyliques ($-\text{COOH}$)¹²² auraient également pu être utilisés, en raison de leur affinité pour interagir avec les surfaces métalliques d'or. Pour cela, il suffit de faire réagir les groupements époxydes avec d'autres molécules bi-fonctionnelles possédant à la fois un groupement thiol et le groupement souhaité, telles que du sel 3-mercapto-1-propanesulfonate de sodium (MPSA) possédant des fonctions $-\text{SO}_2\text{O}^-$, du 2-aminoéthanthiol (AET) ayant des fonctions $-\text{NH}_2$ ou de l'acide mercaptoacétique (acide thioglycolique) ayant des fonctions $-\text{COOH}$)⁸⁴. Les thiols possèdent la plus forte affinité pour les surfaces d'or¹²³. Néanmoins, ces synthèses ne permettent pas de contrôler la taille, ni la forme des NPs lorsque l'on souhaite obtenir de grosses particules. De ce fait, des nouvelles stratégies de synthèse, telle que la croissance ensemencée, ont été développées. Cette méthode est très efficace pour obtenir des NPs d'or monodisperses de grandes tailles (jusqu'à 300 nm) et des formes bien définies.¹²⁴

B. Synthèse par germination-croissance

Cette méthode permet notamment de préparer des NPs d'or sous forme de bâtonnets (AuNRs) avec un rapport d'aspect (AR, tel que $AR = \text{longueur}_{\text{AuNR}}/\text{largeur}_{\text{AuNR}}$) entre 1,5 et 10, avec un maximum d'absorption du plasmon de surface entre 600 et 1300 nm¹²⁵. Comparée avec les méthodes *in situ*, elle permet de contrôler la taille et la forme des NPs d'or étape par étape, en modifiant les concentrations des réactifs (AgNO_3 , tensioactif, acide ascorbique), en faisant varier le pH, la température et le nombre de cycles d'ensemencement^{126,127}. Les nanobâtonnets d'or (AuNRs) utilisés dans cette thèse ont été préparés par cette méthode de synthèse qui sera détaillée au Chapitre IV.

2.4.2. Propriétés optiques des nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or présentent des propriétés optiques modulables selon leur taille et leur morphologie. Contrairement à l'or massif, de couleur jaune, les NPs d'or présentent un

grand éventail de couleurs vives, allant du bleu au rouge, en fonction de leur taille et leur forme, comme illustré Figure 15. La couleur intense de ces NPs provient de l'excitation collective des électrons de conduction appelée résonance plasmon de surface localisée (LSPR), ce qui entraîne l'absorption de photons à une longueur d'onde qui varie avec le rapport d'aspect, l'épaisseur de la coquille et/ou le ratio massique d'or (Au%/m) présent dans la solution.

Au-delà des belles couleurs intenses, les NPs d'or présentent des propriétés très intéressantes pour la nanomédecine. En raison de leur taille, ces particules s'accumulent préférentiellement dans les sites de croissance et d'inflammation des tumeurs cancéreuses et sont capables de rentrer facilement dans les cellules. Elles peuvent être utilisées pour des tests diagnostiques grâce à leurs propriétés optiques. De même, les NPs d'or sont utilisées en imagerie photonique afin de localiser une tumeur par vectorisation passive, grâce à leur LSPR¹²⁸. Leur capacité à absorber de grandes quantités de rayonnement X peut être utilisée pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie. Enfin, la conversion efficace de la lumière en chaleur par l'or sous une irradiation proche infrarouge peut permettre l'ablation thermique hautement spécifique de tissus ou de cellules tumorales.¹²⁴ Les NPs d'or les plus couramment utilisées pour des applications biomédicales sont les nanobâtonnets d'or (AuNRs) ; les NPs cœur@coquille et les nanocages d'or (Figure 15).

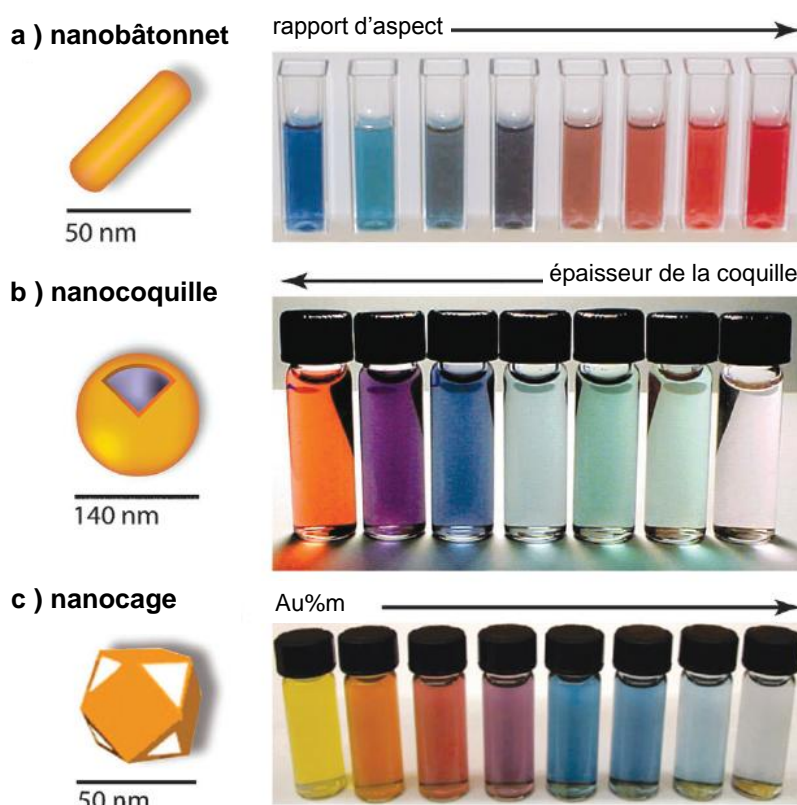


Figure 15. Nanoparticules d'or couramment utilisées pour des applications biomédicales. (a) nanobâtonnets d'or ; (b) nanoparticules cœur@coquille silice@or, et (c) nanocages d'or. Adapté de Dreaden *et al.*, Chemical Society Reviews (2012)¹²⁴.

2.4.3. Propriétés plasmoniques et de photothermie

Les propriétés optiques des NPs d'or sont gouvernées par la résonance plasmonique de surface localisée lorsque les NPs sont soumises à une radiation électromagnétique¹²⁹. La LSPR dépend de la taille, de la forme des NPs et de la constante diélectrique du milieu^{130,131}. La couleur des dispersions de NPs d'or est due au couplage de la lumière dans la région visible du spectre électromagnétique (400–800 nm) avec la LSPR. En ce qui concerne les nanobâtonnets d'or (AuNRs), ils sont capables de transformer l'énergie de photons en chaleur lorsqu'ils sont soumis à une irradiation proche infrarouge. Ainsi, de la même manière que les NPs d'oxyde de fer, ils peuvent être utilisés en tant que source de chaleur pour détruire des cellules cancéreuses lors d'une thérapie plasmonique-photothermique (PPTT)¹³². À différence des nanoparticules d'or sphériques, les nanobâtonnets d'or possèdent une bande de résonance plasmonique de surface localisée longitudinale (LSPR-longitudinale) et une bande transversale (LSPR-transversale). La LSPR-longitudinale est particulièrement sensible au rapport d'aspect AR des AuNRs et peut être modulée du visible au proche infrarouge (Figure 16).

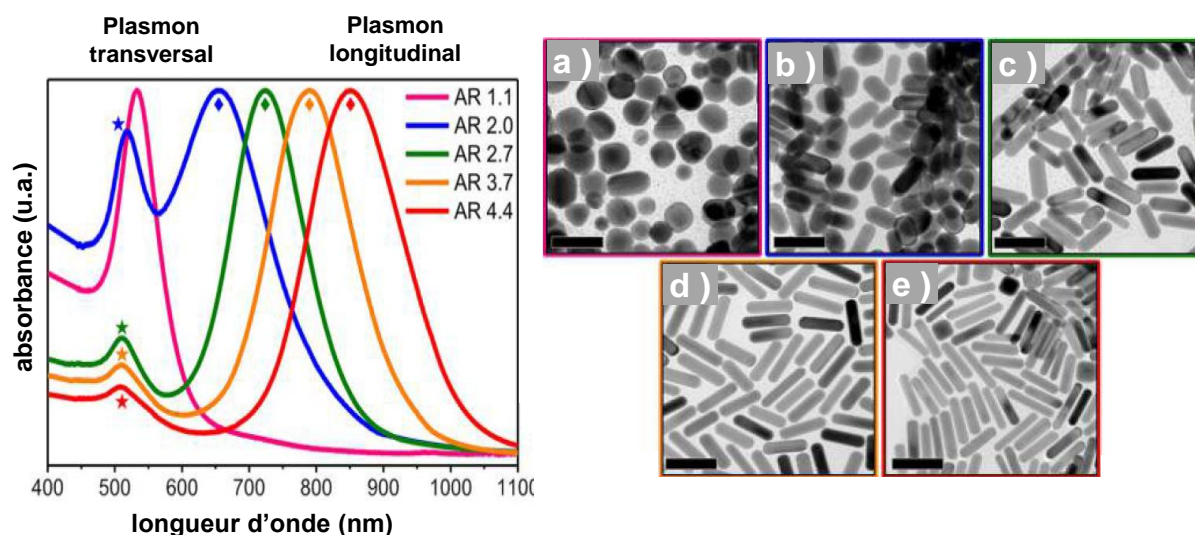


Figure 16. Spectres d'absorption visible-infrarouge des nanobâtonnets d'or avec des rapports d'aspect différents et montrant les pics d'absorption transversal et longitudinal. Images TEM des nanobâtonnets d'or avec AR = 1,1 ; 2,0 ; 2,7 ; 3,7 et 4,4, respectivement pour (a), (b), (c), (d) et (e). L'échelle correspond à 50 nm. Adapté de Burrows, Langmuir (2016)¹²⁹.

2.4.4. Toxicité des NPs d'or

Des études évaluant la toxicité des NPs d'or ont montré que l'injection *in vivo* d'or métallique pouvait entraîner des réactions inflammatoires, l'accumulation d'or dans les cellules réticulaires des tissus lymphoïdes, ainsi que l'activation de l'immunité cellulaire^{133,134}. Par ailleurs, les molécules de CTAB enrobant les NPs d'or sont très toxiques pour les cellules, même à de faibles concentrations. Ainsi, il est indispensable de modifier la surface des AuNRs pour enlever le maximum de CTAB et pouvoir envisager des applications biomédicales. La technique la plus utilisée pour les rendre biocompatibles est la PEGylation, consistant à effectuer un échange des ligands CTAB par des ligands PEG-SH¹²⁹. En fonction des ligands déposés à la surface des NPs d'or, les NPs seront plus ou moins toxiques. Par exemple, Goodman *et al.* ont étudié la toxicité de NPs d'or cationiques et anioniques, d'environ 2 nm de diamètre, sur des cellules de reins. Les NPs cationiques fonctionnalisées avec des amines quaternaires sont sept fois plus toxiques que les NPs anioniques, avec une concentration létale LC50 égale à 1 mM.¹³⁵

3. Nouvelles thérapies à base de nanoparticules hybrides

3.1. Des nanosystèmes hybrides pour la libération de molécules contrôlée à distance

La précision et l'efficacité des *systèmes de libération de molécules* (DDS, *Drug Delivery Systems*) peuvent être augmentées si l'on peut déclencher à distance et à volonté la

libération des molécules par application d'un stimulus. Dans ce cas, on parle de *systèmes de libération de molécules contrôlée à distance* (RC-DDS, *Remotely–Controlled Drug Delivery Systems*)¹³⁶. Les stimuli peuvent être internes à l'organisme, tels que la température, le pH, les réactions d'oxydo-réduction, et externes, tels que la lumière proche infrarouge (NIR-L, de *Near InfraRed Light*), les ultrasons (US) et le champ magnétique alternatif (AMF)^{137–140}. Le Tableau 3 regroupe les différents types de stimuli.

Tableau 3. Différents stimuli utilisés pour la libération contrôlée de molécules et pour la thérapie. Adapté de Torchilin *et al.*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic* (2009)¹⁴¹







	Stimuli	Origine	Réf.
Stimuli internes	pH	Diminution du pH dans les tumeurs par hypoxie et mort cellulaire Faible pH des lysosomes cellulaires (pH≈4,5) par rapport au pH physiologique extracellulaire (pH≈7,5)	142,143
	Potentiel redox	Augmentation de la concentration en glutathion dans les cellules tumorales	144,145
	Température	Augmentation naturelle de la température du corps (fièvre) Application locale d'US, AMF ou NIR-L pour fournir de la chaleur	146,147
Stimuli externes	Ultrasons (US)	Sonication locale facilitant la pénétration dans les cellules et libérant le principe actif	148,149
	Champ magnétique alternatif (AMF)	Application d'un AMF pour chauffer et/ou libérer des molécules	150,151
	Lumière infrarouge (NIR-L)	Application d'une NIR-L pour chauffer et/ou libérer des molécules	152,153

Les RC-DDS peuvent être constitués d'une partie organique, tel qu'un polymère sensible aux stimuli et/ou biodégradable, et d'une partie inorganique tel que de l'or, de l'oxyde de fer et de la silice¹³⁶. Ces nanosystèmes hybrides peuvent être utilisés à la fois pour l'encapsulation, le transport et la libération d'agents thérapeutiques, grâce aux polymères et à la fois en tant qu'agents de contraste (imagerie) ou source de chaleur, grâce aux NPs d'or et aux NPs d'oxyde de fer¹⁵⁴. Les nanosystèmes multi-stimulables, combinant deux stimuli ou plus sont très intéressants pour le traitement du cancer, notamment ceux qui combinent la sensibilité au pH et à un autre stimulus. En effet, pour un nanosystème sensible aux milieux acides, la variation de pH entre les cellules normales, l'environnement physiologique (pH 7,5) et les cellules cancéreuses (pH 4,5 – 6,5) permettrait de libérer les molécules uniquement au sein des cellules tumorales^{154–156}. Quel que soit le type de polymère utilisé, le mécanisme de libération des molécules encapsulées dans la matrice en gel peut être très complexe. Les principaux facteurs sont la diffusion des molécules à travers la matrice, le gonflement de la

matrice et la réactivité chimique entre les molécules et la matrice (liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques)^{138,157,158}.

Dans la littérature, il existe un grand nombre d'exemples de nanosystèmes hybrides permettant de libérer de manière contrôlée des molécules, sous l'influence de divers stimuli. Lors de cette thèse, nous avons synthétisé des nanogels hybrides, biocompatibles et magnétiques (MagNanoGels) constitués d'un réseau polymère thermosensible à base de (macro)-monomères dérivés d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs) et des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)¹⁵¹. Ainsi, dans cette partie, nous nous limiterons à présenter des nanosystèmes hybrides à base de polymères et de NPMs, permettant de déclencher la libération de molécules lors de l'application d'un AMF. Le Tableau 4 regroupe des exemples de ces systèmes étudiés dans la littérature : des nanocubes enrobés de polymère¹⁵⁹, des NPs de silice mésoporeuse enrobées de polymères¹⁶⁰, des polymères à empreinte moléculaire magnétiques (MIP-magnétiques)¹⁶¹, des polymersomes¹⁶² et des nanogels magnétiques¹⁶²⁷¹. Le principal point commun de ces nanosystèmes est qu'ils peuvent encapsuler et libérer des molécules sous l'influence d'un AMF. Pour certains de ces systèmes, un chauffage macroscopique du milieu est nécessaire pour la libération des molécules. C'est le cas des nanocubes, des polymersomes et des nanogels à base de PNIPAM. Pour les autres systèmes, la libération des molécules a lieu dans des conditions athermiques, c'est-à-dire sans augmentation de la température globale du milieu. C'est le cas pour les MIP-magnétiques et les nanogels à base de monomères-OEGMAs. Tous les nanosystèmes présentés dans ce tableau ont une taille nanométrique, allant de 57 nm à 450 nm. Le polymère utilisé dans la plupart des systèmes est le PNIPAM. Les nanogels étudiés dans cette thèse sont présentés dans la dernière colonne du tableau.

Tableau 4. Nanosystèmes hybrides magnétiques à base de polymères et de nanoparticules magnétiques, pour la libération contrôlée de molécules par hyperthermie magnétique

Systeme	Nanocubes enrobés de polymère	Nanoparticules de silice mésoporeuse enrobées de polymère	Polymères à empreinte moléculaire magnétiques	Polymersomes	Nanogels / Microgels	Nanogels / Microgels
						
taille	200 nm	100 nm	57 nm	100 – 400 nm	200 nm	250 – 450 nm
polymère	PNIPAM	PNIPAM	Acrylamide-Ac.Acrylique	PTMC-B-PGA ⁽¹⁾	PNIPAM	PEG-MAA
molécule libérée	DOX ⁽²⁾	FLUO ⁽²⁾	DOX; FLUO; RHO ⁽²⁾	DOX ⁽²⁾	DOX; FLUO ⁽²⁾	DOX
conditions	220kHz; 20k.A.m ⁻¹	838kHz; 20k.A.m ⁻¹ ; 37°C	335kHz; 9mT; 37°C	500kHz; 2,1k.A.m ⁻¹ ; 23°C	RF ⁽³⁾ , 37°C	332kHz; 7,6A; 30min. 23°C (X8)
propriété	Sensibilité à T°	Sensibilité à T°	Rupture liaisons H	Perméabilité membrane	Sensibilité à T°	Sensibilité à T°
efficacité encapsulation	23%	----	6,5µg/mL	48-74%	DOX:25% FLUO:30%	51% (67µg/ml)
efficacité relargage (4H)	3,0.10 ⁻¹ mg/mL 22% (si 80°C)	4,0.10 ⁻⁴ mg/mL X2	3,26.10 ⁻³ mg/mL X4	25% X2 (après 7H)	8,4.10 ⁻³ mg/mL X2 (RF) ⁽³⁾	2,2.10 ⁻² mg/mL 68% X2
toxicité du polymère	généotoxique	généotoxique	reprotoxique	non	généotoxique	biocompatible
référence	Kakwere H. et al., ACS Applied Mat. & Interf. (2015) ¹⁵⁹	Guisasola E. et al., Langmuir (2015) ¹⁶⁰	Griffete N. et al., Nanoscale (2015) ¹⁶¹	Sanson C. et al., ACS Nano (2011) ¹⁶²	Jaiswal M. K. et al., ACS Applied Mat. & Interf. (2014) ¹⁶²⁷¹	Thèse Cazares-Cortes E. et al., ACS Applied Mat. & Interf. (2017) ¹⁵¹

(1)PTMC-b-PGA: poly(triméthylène carbonate)-b-poly(L- acide glutamique) / (2)DOX: doxorubicine; FLUO: fluorescéine et RHO: rhodamine / (3)RF: radio-fréquence

3.2. Des nanosystèmes pour la thérapie

Certaines nanoparticules, telles que les NPs d'oxyde de fer et les NPs d'or, sont capables de générer de la chaleur en présence d'un stimulus (champ magnétique alternatif AMF, irradiation proche infrarouge NIR-L). L'efficacité du pouvoir chauffant des NPs est quantifiée par le *taux d'absorption spécifique* (SAR, *Specific Absorption Rate*). La SAR (W.g⁻¹) correspond à la dissipation de la puissance par unité de masse de fer ou d'or¹⁶⁴. La thérapie est une alternative aux traitements chirurgicaux des tumeurs. Lorsque la température atteint 41 à 46 °C, les cellules sont endommagées et le processus de mort cellulaire (apoptose) est déclenchée, on parle d'hyperthermie. Lorsque la température atteinte est supérieure à 51 °C, la destruction totale des cellules a lieu, on parle de *thermoablation*.

Pour avoir une efficacité thérapeutique, l'échauffement induit par les NPs doit être compris entre 5 et 8°C au-dessus de la température physiologique. Il a été démontré dans la littérature que les cellules cancéreuses sont plus sensibles que les cellules saines à la température, augmentant ainsi l'efficacité de la thérapie¹⁶⁵. L'efficacité du traitement dépend du temps d'exposition, de la concentration en NPs et la localisation des NPs au sein de la cellule (intracellulaire ou sur la membrane). Il existe plusieurs stimuli pouvant déclencher la production de chaleur des NPs dans une région spécifique pour détruire les cellules cancéreuses : les irradiations proche infrarouge, la lumière visible, les ondes micro-ondes, les ultrasons, le champ magnétique alternatif. Les NPs sont administrées dans les tumeurs et les stimuli sont appliquées de l'extérieur¹⁶⁶.

Dans cette thèse, on s'intéressera particulièrement à la chaleur générée par les NPs d'oxyde de fer en présence d'un AMF, dite *hyperthermie magnétique* et à la chaleur générée par les nanobâtonnets d'or en présence d'une NIR-L, dite *photothermie*.

Références

- (1) Xu, X.; Ho, W.; Zhang, X.; Bertrand, N.; Farokhzad, O. Cancer Nanomedicine: From Targeted Delivery to Combination Therapy. *Trends Mol. Med.* **2015**, *21* (4), 223–232.
- (2) Hassan, S.; Prakash, G.; Bal Ozturk, A.; Saghazadeh, S.; Farhan Sohail, M.; Seo, J.; Remzi Dokmeci, M.; Zhang, Y. S.; Khademhosseini, A. Evolution and Clinical Translation of Drug Delivery Nanomaterials. *Nano Today* **2017**, *15* (Supplement C), 91–106.
- (3) Ulbrich, K.; Holá, K.; Šubr, V.; Bakandritsos, A.; Tuček, J.; Zbořil, R. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (9), 5338–5431.
- (4) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (9), nbt.3330.
- (5) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (5), 631–651.
- (6) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46* (12 Part 1), 6387–6392.
- (7) Maeda, H. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41* (1), 189–207.
- (8) Stuart, M. A. C.; Huck, W. T. S.; Genzer, J.; Müller, M.; Ober, C.; Stamm, M.; Sukhorukov, G. B.; Szleifer, I.; Tsukruk, V. V.; Urban, M.; Winnik, F.; Zauscher, S.; Luzinov, I.; Minko, S. Emerging Applications of Stimuli-Responsive Polymer Materials. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (2), 101–113.
- (9) Baker, W. O. Microgel, A New Macromolecule. *Ind. Eng. Chem.* **1949**, *41* (3), 511–520.
- (10) Nayak, S.; Lyon, L. A. Soft Nanotechnology with Soft Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (47), 7686–7708.
- (11) Hu, Z.; Cai, T.; Chi, C. Thermoresponsive Oligo(Ethylene Glycol)-Methacrylate- Based Polymers and Microgels. *Soft Matter* **2010**, *6* (10), 2115–2123.
- (12) Balaceanu, A.; Verkh, Y.; Kehren, D.; Tillmann, W.; Pich, A. Thermoresponsive Core-Shell Microgels. Synthesis and Characterisation. *Z. Für Phys. Chem.* **2014**, *228* (2–3).
- (13) Hertle, Y.; Hellweg, T. Thermoresponsive Copolymer Microgels. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (43), 5874.
- (14) Hocine, S.; Li, M.-H. Thermoresponsive Self-Assembled Polymer Colloids in Water. *Soft Matter* **2013**, *9* (25), 5839–5861.
- (15) Roy, D.; A. Brooks, W. L.; S. Sumerlin, B. New Directions in Thermoresponsive Polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (17), 7214–7243.
- (16) Schild, H. G. Poly(N-Isopropylacrylamide): Experiment, Theory and Application. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17* (2), 163–249.
- (17) Seuring, J.; Agarwal, S. First Example of a Universal and Cost-Effective Approach: Polymers with Tunable Upper Critical Solution Temperature in Water and Electrolyte Solution. *Macromolecules* **2012**, *45* (9), 3910–3918.
- (18) Liu, H. Y.; Zhu, X. X. Lower Critical Solution Temperatures of N-Substituted Acrylamide Copolymers in Aqueous Solutions. *Polymer* **1999**, *40* (25), 6985–6990.
- (19) Seuring, J.; Bayer, F. M.; Huber, K.; Agarwal, S. Upper Critical Solution Temperature of Poly(N-Acryloyl Glycinamide) in Water: A Concealed Property. *Macromolecules* **2012**, *45* (1), 374–384.

- (20) Maeda, Y.; Nakamura, T.; Ikeda, I. Changes in the Hydration States of Poly(N-Alkylacrylamide)s during Their Phase Transitions in Water Observed by FTIR Spectroscopy. *Macromolecules* **2001**, *34* (5), 1391–1399.
- (21) Fujishige, S.; Kubota, K.; Ando, I. Phase Transition of Aqueous Solutions of Poly(N-Isopropylacrylamide) and Poly(N-Isopropylmethacrylamide). *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (8), 3311–3313.
- (22) Ito, D.; Kubota, K. Solution Properties and Thermal Behavior of Poly(N-n-Propylacrylamide) in Water. *Macromolecules* **1997**, *30* (25), 7828–7834.
- (23) Chan, K.; Pelton, R.; Zhang, J. On the Formation of Colloidally Dispersed Phase-Separated Poly(N-Isopropylacrylamide). *Langmuir* **1999**, *15* (11), 4018–4020.
- (24) Bloksma, M. M.; Weber, C.; Perevyazko, I. Y.; Kuse, A.; Baumgärtel, A.; Vollrath, A.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Poly(2-Cyclopropyl-2-Oxazoline): From Rate Acceleration by Cyclopropyl to Thermoresponsive Properties. *Macromolecules* **2011**, *44* (11), 4057–4064.
- (25) Hoogenboom, R.; Thijs, H. M. L.; Jochems, M. J. H. C.; Lankvelt, B. M. van; Fijten, M. W. M.; Schubert, U. S. Tuning the LCST of Poly(2-Oxazoline)s by Varying Composition and Molecular Weight: Alternatives to Poly(N-Isopropylacrylamide)? *Chem. Commun.* **2008**, *0* (44), 5758–5760.
- (26) Diab, C.; Akiyama, Y.; Kataoka, K.; Winnik, F. M. Microcalorimetric Study of the Temperature-Induced Phase Separation in Aqueous Solutions of Poly(2-Isopropyl-2-Oxazolines). *Macromolecules* **2004**, *37* (7), 2556–2562.
- (27) Maeda, Y.; Kubota, T.; Yamauchi, H.; Nakaji, T.; Kitano, H. Hydration Changes of Poly(2-(2-Methoxyethoxy)Ethyl Methacrylate) during Thermosensitive Phase Separation in Water. *Langmuir* **2007**, *23* (22), 11259–11265.
- (28) Vancoillie, G.; Frank, D.; Hoogenboom, R. Thermoresponsive Poly(Oligo Ethylene Glycol Acrylates). *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39* (6), 1074–1095.
- (29) Ishizone, T.; Seki, A.; Hagiwara, M.; Han, S.; Yokoyama, H.; Oyane, A.; Deffieux, A.; Carlotti, S. Anionic Polymerizations of Oligo(Ethylene Glycol) Alkyl Ether Methacrylates: Effect of Side Chain Length and ω -Alkyl Group of Side Chain on Cloud Point in Water. *Macromolecules* **2008**, *41* (8), 2963–2967.
- (30) Lutz, J.-F.; Akdemir, Ö.; Hoth, A. Point by Point Comparison of Two Thermosensitive Polymers Exhibiting a Similar LCST: Is the Age of Poly(NIPAM) Over? *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (40), 13046–13047.
- (31) Schild, H. G.; Tirrell, D. A. Microcalorimetric Detection of Lower Critical Solution Temperatures in Aqueous Polymer Solutions. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (10), 4352–4356.
- (32) Rice, C. V. Phase-Transition Thermodynamics of N-Isopropylacrylamide Hydrogels. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (10), 2923–2925.
- (33) Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers Poly(N-Isopropylacrylamide), Poly(N-Vinylcaprolactam) and Amphiphilically Modified Poly(N-Vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, *26* (16), 3055–3064.
- (34) Wadajkar, A. S.; Koppolu, B.; Rahimi, M.; Nguyen, K. T. Cytotoxic Evaluation of N-Isopropylacrylamide Monomers and Temperature-Sensitive Poly(N-Isopropylacrylamide) Nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11* (6), 1375–1382.
- (35) Bianco-Peled, H.; Gryc, S. Binding of Amino Acids to “Smart” Sorbents: Where Does Hydrophobicity Come into Play? *Langmuir* **2004**, *20* (1), 169–174.
- (36) Boyko, V.; Richter, S.; Pich, A.; Arndt, K.-F. Poly(N-Vinylcaprolactam) Microgels. Polymeric Stabilization with Poly(Vinyl Alcohol). *Colloid Polym. Sci.* **2003**, *282* (2), 127–132.
- (37) Imaz, A.; Forcada, J. N-Vinylcaprolactam-Based Microgels: Synthesis and Characterization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (7), 2510–2524.

- (38) Imaz, A.; Forcada, J. *N*-Vinylcaprolactam-Based Microgels for Biomedical Applications. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48* (5), 1173–1181.
- (39) Cai, T.; Marquez, M.; Hu, Z. Monodisperse Thermoresponsive Microgels of Poly(Ethylene Glycol) Analogue-Based Biopolymers. *Langmuir* **2007**, *23* (17), 8663–8666.
- (40) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470.
- (41) Lutz, J.-F. Thermo-Switchable Materials Prepared Using the OEGMA-Platform. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (19), 2237–2243.
- (42) Tager, A. A.; Safronov, A. P.; Sharina, S. V.; Galaev, I. Y. Thermodynamic Study of Poly(*N*-Vinyl Caprolactam) Hydration at Temperatures Close to Lower Critical Solution Temperature. *Colloid Polym. Sci.* **1993**, *271* (9), 868–872.
- (43) Meeussen, F.; Nies, E.; Berghmans, H.; Verbrugghe, S.; Goethals, E.; Du Prez, F. Phase Behaviour of Poly(*N*-Vinyl Caprolactam) in Water. *Polymer* **2000**, *41* (24), 8597–8602.
- (44) Lutz, J.-F.; Hoth, A. Preparation of Ideal PEG Analogues with a Tunable Thermosensitivity by Controlled Radical Copolymerization of 2-(2-Methoxyethoxy)Ethyl Methacrylate and Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylate. *Macromolecules* **2006**, *39* (2), 893–896.
- (45) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470.
- (46) Dai, S.; Ravi, P.; Tam, K. C. PH-Responsive Polymers: Synthesis, Properties and Applications. *Soft Matter* **2008**, *4* (3), 435–449.
- (47) Yager, K. G.; Barrett, C. J. Novel Photo-Switching Using Azobenzene Functional Materials. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2006**, *3* (182), 250–261.
- (48) Cayre, O. J.; Chagneux, N.; Biggs, S. Stimulus Responsive Core-Shell Nanoparticles: Synthesis and Applications of Polymer Based Aqueous Systems. *Soft Matter* **2011**, *7* (6), 2211–2234.
- (49) El-Hag Ali, A.; Abd El-Rehim, H. A.; Hegazy, E.-S. A.; Ghobashy, M. M. Synthesis and Electrical Response of Acrylic Acid/Vinyl Sulfonic Acid Hydrogels Prepared by γ -Irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* **2006**, *75* (9), 1041–1046.
- (50) Wu, X.; Pelton, R. H.; Hamielec, A. E.; Woods, D. R.; McPhee, W. The Kinetics of Poly(*N*-Isopropylacrylamide) Microgel Latex Formation. *Colloid Polym. Sci.* **1994**, *272* (4), 467–477.
- (51) Pich, A.; Richtering, W. Microgels by Precipitation Polymerization: Synthesis, Characterization, and Functionalization. In *Chemical Design of Responsive Microgels*; Pich, A., Richtering, W., Eds.; Advances in Polymer Science; Springer Berlin Heidelberg, 2010; pp 1–37.
- (52) Sanson, N.; Rieger, J. Synthesis of Nanogels/Microgels by Conventional and Controlled Radical Crosslinking Copolymerization. *Polym. Chem.* **2010**, *1* (7), 965.
- (53) Pelton, R. H.; Chibante, P. Preparation of Aqueous Latices with *N*-Isopropylacrylamide. *Colloids Surf.* **1986**, *20* (3), 247–256.
- (54) Gao, J.; Frisken, B. J. Cross-Linker-Free *N*-Isopropylacrylamide Gel Nanospheres. *Langmuir* **2003**, *19* (13), 5212–5216.
- (55) Meunier, F.; Elaïssari, A.; Pichot, C. Preparation and Characterization of Cationic Poly(*n*-Isopropylacrylamide) Copolymer Latexes. *Polym. Adv. Technol.* **1995**, *6* (7), 489–496.
- (56) Laukkanen, A.; Wiedmer, S. K.; Varjo, S.; Riekkola, M.-L.; Tenhu, H. Stability and Thermosensitive Properties of Various Poly (*N*-Vinylcaprolactam) Microgels. *Colloid Polym. Sci.* **2002**, *280* (1), 65–70.

- (57) Wang, Y.; Nie, J.; Chang, B.; Sun, Y.; Yang, W. Poly(Vinylcaprolactam)-Based Biodegradable Multiresponsive Microgels for Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (9), 3034–3046.
- (58) McPhee, W.; Tam, K. C.; Pelton, R. Poly(N-Isopropylacrylamide) Latices Prepared with Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *156* (1), 24–30.
- (59) Quesada-Pérez, M.; Alberto Maroto-Centeno, J.; Forcada, J.; Hidalgo-Alvarez, R. Gel Swelling Theories: The Classical Formalism and Recent Approaches. *Soft Matter* **2011**, *7* (22), 10536–10547.
- (60) Gallagher, S.; Florea, L.; Fraser, K.; Diamond, D. Swelling and Shrinking Properties of Thermo-Responsive Polymeric Ionic Liquid Hydrogels with Embedded Linear PNIPAAm. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (4), 5337–5349.
- (61) Pikabea, A.; Aguirre, G.; Miranda, J. I.; Ramos, J.; Forcada, J. Understanding of Nanogels Swelling Behavior through a Deep Insight into Their Morphology. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2015**, *53* (17), 2017–2025.
- (62) Flory, P. J. Thermodynamics of High Polymer Solutions. *J. Chem. Phys.* **1941**, *9* (8), 660–660.
- (63) Huggins, M. L. Theory of Solutions of High Polymers I. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64* (7), 1712–1719.
- (64) Flory, P. J.; Rehner, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks I. Rubberlike Elasticity. *J. Chem. Phys.* **1943**, *11* (11), 512–520.
- (65) Flory, P. J.; Rehner, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *J. Chem. Phys.* **1943**, *11* (11), 521–526.
- (66) Hoare, T.; McLean, D. Multi-Component Kinetic Modeling for Controlling Local Compositions in Thermosensitive Polymers. *Macromol. Theory Simul.* **2006**, *15* (8), 619–632.
- (67) Hoare, T.; Pelton, R. Characterizing Charge and Crosslinker Distributions in Polyelectrolyte Microgels. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2008**, *13* (6), 413–428.
- (68) Hoare, T.; McLean, D. Kinetic Prediction of Functional Group Distributions in Thermosensitive Microgels. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (41), 20327–20336.
- (69) Schneider, F.; Balaceanu, A.; Feoktystov, A.; Pipich, V.; Wu, Y.; Allgaier, J.; Pyckhout-Hintzen, W.; Pich, A.; Schneider, G. J. Monitoring the Internal Structure of Poly(*N*-Vinylcaprolactam) Microgels with Variable Cross-Link Concentration. *Langmuir* **2014**, *30* (50), 15317–15326.
- (70) Sheikholeslami, P.; Ewaschuk, C. M.; Ahmed, S. U.; Greenlay, B. A.; Hoare, T. Semi-Batch Control over Functional Group Distributions in Thermoresponsive Microgels. *Colloid Polym. Sci.* **2012**, *290* (12), 1181–1192.
- (71) Messing, R.; Schmidt, A. M. Perspectives for the Mechanical Manipulation of Hybrid Hydrogels. *Polym. Chem.* **2010**, *2* (1), 18–32.
- (72) Karg, M.; Hellweg, T. Smart Inorganic/Organic Hybrid Microgels: Synthesis and Characterisation. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (46), 8714–8727.
- (73) Kondo, A.; Kamura, H.; Higashitani, K. Development and Application of Thermo-Sensitive Magnetic Immunomicrospheres for Antibody Purification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *41* (1), 99–105.
- (74) Oh, J. K.; Park, J. M. Iron Oxide-Based Superparamagnetic Polymeric Nanomaterials: Design, Preparation, and Biomedical Application. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (1), 168–189.
- (75) Kondo, A.; Fukuda, H. Preparation of Thermo-Sensitive Magnetic Hydrogel Microspheres and Application to Enzyme Immobilization. *J. Ferment. Bioeng.* **1997**, *84* (4), 337–341.

- (76) Jaiswal, M. K.; Mehta, S.; Banerjee, R.; Bahadur, D. A Comparative Study on Thermoresponsive Magnetic Nanohydrogels: Role of Surface-Engineered Magnetic Nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* **2012**, *290* (7), 607–617.
- (77) Xu, S.; Zhang, J.; Paquet, C.; Lin, Y.; Kumacheva, E. From Hybrid Microgels to Photonic Crystals. *Adv. Funct. Mater.* **2003**, *13* (6), 468–472.
- (78) Zhang, J.; Xu, S.; Kumacheva, E. Photogeneration of Fluorescent Silver Nanoclusters in Polymer Microgels. *Adv. Mater.* **2005**, *17* (19), 2336–2340.
- (79) Zhang, J.; Xu, S.; Kumacheva, E. Polymer Microgels: Reactors for Semiconductor, Metal, and Magnetic Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (25), 7908–7914.
- (80) Wu, W.; Zhou, T.; Zhou, S. Tunable Photoluminescence of Ag Nanocrystals in Multiple-Sensitive Hybrid Microgels. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (13), 2851–2861.
- (81) Pich, A.; Hain, J.; Lu, Y.; Boyko, V.; Prots, Y.; Adler, H.-J. Hybrid Microgels with ZnS Inclusions. *Macromolecules* **2005**, *38* (15), 6610–6619.
- (82) Bhattacharya, S.; Eckert, F.; Boyko, V.; Pich, A. Temperature-, PH-, and Magnetic-Field-Sensitive Hybrid Microgels. *Small* **2007**, *3* (4), 650–657.
- (83) Suzuki, D.; Kawaguchi, H. Modification of Gold Nanoparticle Composite Nanostructures Using Thermosensitive Core–Shell Particles as a Template. *Langmuir* **2005**, *21* (18), 8175–8179.
- (84) Suzuki, D.; Kawaguchi, H. Stimuli-Sensitive Core/Shell Template Particles for Immobilizing Inorganic Nanoparticles in the Core. *Colloid Polym. Sci.* **2006**, *284* (12), 1443–1451.
- (85) Suzuki, D.; Kawaguchi, H. Hybrid Microgels with Reversibly Changeable Multiple Brilliant Color. *Langmuir* **2006**, *22* (8), 3818–3822.
- (86) Shen, L.; Pich, A.; Fava, D.; Wang, M.; Kumar, S.; Wu, C.; Scholes, G. D.; Winnik, M. A. Loading Quantum Dots into Thermo-Responsive Microgels by Reversible Transfer from Organic Solvents to Water. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18* (7), 763.
- (87) Sauzedde, F.; Elaïssari, A.; Pichot, C. Hydrophilic Magnetic Polymer Latexes. 1. Adsorption of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles onto Various Cationic Latexes. *Colloid Polym. Sci.* **1999**, *277* (9), 846–855.
- (88) Sauzedde, F.; Elaïssari, A.; Pichot, C. Hydrophilic Magnetic Polymer Latexes. 2. Encapsulation of Adsorbed Iron Oxide Nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* **1999**, *277* (11), 1041–1050.
- (89) Gong, Y.; Gao, M.; Wang, D.; Möhwald, H. Incorporating Fluorescent CdTe Nanocrystals into a Hydrogel via Hydrogen Bonding: Toward Fluorescent Microspheres with Temperature-Responsive Properties. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (10), 2648–2653.
- (90) Boullaras, M.; Gombart, E.; Tranchant, J.-F.; Billon, L.; Save, M. Design of Smart Oligo(Ethylene Glycol)-Based Biocompatible Hybrid Microgels Loaded with Magnetic Nanoparticles. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36* (1), 79–83.
- (91) Medeiros, S. F.; Santos, A. M.; Fessi, H.; Elaïssari, A. Stimuli-Responsive Magnetic Particles for Biomedical Applications. *Int. J. Pharm.* **2011**, *403* (1–2), 139–161.
- (92) Olsson, M. B. E.; Persson, B. R. B.; Salford, L. G.; Schröder, U. Ferromagnetic Particles as Contrast Agent in T2 NMR Imaging. *Magn. Reson. Imaging* **1986**, *4* (5), 437–440.
- (93) Jung, C. W.; Jacobs, P. Physical and Chemical Properties of Superparamagnetic Iron Oxide MR Contrast Agents: Ferumoxides, Ferumoxtran, Ferumoxsil. *Magn. Reson. Imaging* **1995**, *13* (5), 661–674.
- (94) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17* (2), 1247–1248.
- (95) Molday, R. S.; MacKenzie, D. Immunospecific Ferromagnetic Iron-Dextran Reagents for the Labeling and Magnetic Separation of Cells. *J. Immunol. Methods* **1982**, *52* (3), 353–367.

- (96) Bhaumik, A.; Samanta, S.; Mal, N. K. Iron Oxide Nanoparticles Stabilized inside Highly Ordered Mesoporous Silica. *Pramana* **2005**, *65* (5), 855–862.
- (97) Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (1), 273–279.
- (98) Colombo, M.; Carregal-Romero, S.; Casula, M. F.; Gutiérrez, L.; Morales, M. P.; Böhm, I. B.; Heverhagen, J. T.; Prospero, D.; Parak, W. J. Biological Applications of Magnetic Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (11), 4306–4334.
- (99) Bergemann, C.; Müller-Schulte, D.; Oster, J.; Brassard, L.; Lübke, A. S. Magnetic Ion-Exchange Nano- and Microparticles for Medical, Biochemical and Molecular Biological Applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *194* (1), 45–52.
- (100) Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, *26* (18), 3995–4021.
- (101) Ge, S.; Shi, X.; Sun, K.; Li, C.; Uher, C.; Baker, J. R.; Banaszak Holl, M. M.; Orr, B. G. Facile Hydrothermal Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (31), 13593–13599.
- (102) Taboada, E.; Rodríguez, E.; Roig, A.; Oró, J.; Roch, A.; Muller, R. N. Relaxometric and Magnetic Characterization of Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles with High Magnetization. Evaluation as Potential T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents for Molecular Imaging. *Langmuir* **2007**, *23* (8), 4583–4588.
- (103) Corrias, A.; Mountjoy, G.; Loche, D.; Puentes, V.; Falqui, A.; Zanella, M.; Parak, W. J.; Casula, M. F. Identifying Spinel Phases in Nearly Monodisperse Iron Oxide Colloidal Nanocrystal. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (43), 18667–18675.
- (104) Cai, W.; Wan, J. Facile Synthesis of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles in Liquid Polyols. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *305* (2), 366–370.
- (105) Gonçalves, R. H.; Cardoso, C. A.; Leite, E. R. Synthesis of Colloidal Magnetite Nanocrystals Using High Molecular Weight Solvent. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (6), 1167–1172.
- (106) Di Corato, R.; Espinosa, A.; Lartigue, L.; Tharaud, M.; Chat, S.; Pellegrino, T.; Ménager, C.; Gazeau, F.; Wilhelm, C. Magnetic Hyperthermia Efficiency in the Cellular Environment for Different Nanoparticle Designs. *Biomaterials* **2014**, *35* (24), 6400–6411.
- (107) Bacri, J.-C.; Perzynski, R.; Salin, D.; Cabuil, V.; Massart, R. Magnetic Colloidal Properties of Ionic Ferrofluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **1986**, *62* (1), 36–46.
- (108) Fortin, J.-P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Ménager, C.; Bacri, J.-C.; Gazeau, F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (9), 2628–2635.
- (109) Fayol, D.; Luciani, N.; Lartigue, L.; Gazeau, F.; Wilhelm, C. Managing Magnetic Nanoparticle Aggregation and Cellular Uptake: A Precondition for Efficient Stem-Cell Differentiation and MRI Tracking. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2* (2), 313–325.
- (110) Kolosnjaj-Tabi, J.; Lartigue, L.; Javed, Y.; Luciani, N.; Pellegrino, T.; Wilhelm, C.; Alloyeau, D.; Gazeau, F. Biotransformations of Magnetic Nanoparticles in the Body. *Nano Today* **2016**, *11* (3), 280–284.
- (111) Mazuel, F.; Espinosa, A.; Radtke, G.; Bugnet, M.; Neveu, S.; Lalatonne, Y.; Botton, G. A.; Abou-Hassan, A.; Wilhelm, C. Magneto-Thermal Metrics Can Mirror the Long-Term Intracellular Fate of Magneto-Plasmonic Nanohybrids and Reveal the Remarkable Shielding Effect of Gold. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (9), n/a-n/a.
- (112) Mazuel, F.; Espinosa, A.; Luciani, N.; Reffay, M.; Le Borgne, R.; Motte, L.; Desboeufs, K.; Michel, A.; Pellegrino, T.; Lalatonne, Y.; Wilhelm, C. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano* **2016**, *10* (8), 7627–7638.

- (113) Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T. Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (29), 13857–13870.
- (114) Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (48), 4880–4910.
- (115) Faraday, M. X. The Bakerian Lecture. —Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **1857**, *147*, 145–181.
- (116) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11* (0), 55–75.
- (117) Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C. Synthesis and Reactions of Functionalised Gold Nanoparticles. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, *0* (16), 1655–1656.
- (118) Brown, K. R.; Fox, A. P.; Natan, M. J. Morphology-Dependent Electrochemistry of Cytochrome c at Au Colloid-Modified SnO₂ Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (5), 1154–1157.
- (119) Suzuki, D.; Kawaguchi, H. Modification of Gold Nanoparticle Composite Nanostructures Using Thermosensitive Core–Shell Particles as a Template. *Langmuir* **2005**, *21* (18), 8175–8179.
- (120) Suzuki, D.; Kawaguchi, H. Gold Nanoparticle Localization at the Core Surface by Using Thermosensitive Core–Shell Particles as a Template. *Langmuir* **2005**, *21* (25), 12016–12024.
- (121) Pensa, E.; Cortés, E.; Corthey, G.; Carro, P.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A. A.; Salvarezza, R. C. The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (8), 1183–1192.
- (122) Das, M.; Sanson, N.; Fava, D.; Kumacheva, E. Microgels Loaded with Gold Nanorods: Photothermally Triggered Volume Transitions under Physiological Conditions. *Langmuir* **2007**, *23* (1), 196–201.
- (123) Ueno, R.; Kim, B. Reliable Transfer Technique of Gold Micro Heater through Different Affinities of Thiol (SH) and Amine (NH₂) Groups. *Microelectron. Eng.* **2017**, *171*, 6–10.
- (124) C. Dreaden, E.; M. Alkilany, A.; Huang, X.; J. Murphy, C.; A. El-Sayed, M. The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2740–2779.
- (125) Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (10), 1957–1962.
- (126) Perezjuste, J.; Pastorizasantos, I.; Lizmarzan, L.; Mulvaney, P. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (17–18), 1870–1901.
- (127) Li, H.; Zheng, G.; Xu, L.; Su, W. Influence of Amount of CTAB and Ascorbic Acid Concentration on Localized Surface Plasmon Resonance Property of Gold Nanorod. *Opt. - Int. J. Light Electron Opt.* **2014**, *125* (9), 2044–2047.
- (128) Loo, C.; Lowery, A.; Halas, N.; West, J.; Drezek, R. Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy. *Nano Lett.* **2005**, *5* (4), 709–711.
- (129) Burrows, N. D.; Lin, W.; Hinman, J. G.; Dennison, J. M.; Vartanian, A. M.; Abadeer, N. S.; Grzincic, E. M.; Jacob, L. M.; Li, J.; Murphy, C. J. Surface Chemistry of Gold Nanorods. *Langmuir* **2016**, *32* (39), 9905–9921.

- (130) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2740–2779.
- (131) S. Link; M. B. Mohamed, and; El-Sayed*, M. A. Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant <http://pubs.acs.org.accesdistant.upmc.fr/doi/abs/10.1021/jp990183f> (accessed Oct 1, 2017).
- (132) Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) Using Gold Nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* **2008**, *23* (3), 217.
- (133) Khlebtsov, N. G.; Dykman, L. A. Biodistribution and Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanotechnologies Russ.* **2011**, *6* (1–2), 17–42.
- (134) Merchant, B. Gold, the Noble Metal and the Paradoxes of Its Toxicology. *Biologicals* **1998**, *26* (1), 49–59.
- (135) Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (4), 897–900.
- (136) Li, Z.; Ye, E.; David; Lakshminarayanan, R.; Loh, X. J. Recent Advances of Using Hybrid Nanocarriers in Remotely Controlled Therapeutic Delivery. *Small* **2016**, *12* (35), 4782–4806.
- (137) Brazel, C. S. Magnetothermally-Responsive Nanomaterials: Combining Magnetic Nanostructures and Thermally-Sensitive Polymers for Triggered Drug Release. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (3), 644–656.
- (138) Luk, B. T.; Zhang, L. Current Advances in Polymer-Based Nanotheranostics for Cancer Treatment and Diagnosis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (24), 21859–21873.
- (139) Kaur, S.; Prasad, C.; Balakrishnan, B.; Banerjee, R. Trigger Responsive Polymeric Nanocarriers for Cancer Therapy. *Biomater Sci* **2015**, *3* (7), 955–987.
- (140) Bergueiro, J.; Calderón, M. Thermoresponsive Nanodevices in Biomedical Applications: Thermoresponsive Nanodevices in Biomedical Applications *Macromol. Biosci.* **2015**, *15* (2), 183–199.
- (141) Torchilin, V. Multifunctional and Stimuli-Sensitive Pharmaceutical Nanocarriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71* (3), 431–444.
- (142) Ishida, T.; Kirchmeier, M. J.; Moase, E. H.; Zalipsky, S.; Allen, T. M. Targeted Delivery and Triggered Release of Liposomal Doxorubicin Enhances Cytotoxicity against Human B Lymphoma Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2001**, *1515* (2), 144–158.
- (143) Dufresne, M.-H.; Garrec, D. L.; Sant, V.; Leroux, J.-C.; Ranger, M. Preparation and Characterization of Water-Soluble PH-Sensitive Nanocarriers for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2004**, *277* (1), 81–90.
- (144) Gabizon, A. A.; Tzemach, D.; Horowitz, A. T.; Shmeeda, H.; Yeh, J.; Zalipsky, S. Reduced Toxicity and Superior Therapeutic Activity of a Mitomycin C Lipid-Based Prodrug Incorporated in Pegylated Liposomes. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12* (6), 1913–1920.
- (145) Kirpotin, D.; Hong, K.; Mullah, N.; Papahadjopoulos, D.; Zalipsky, S. Liposomes with Detachable Polymer Coating: Destabilization and Fusion of Dioleoylphosphatidylethanolamine Vesicles Triggered by Cleavage of Surface-Grafted Poly(Ethylene Glycol). *FEBS Lett.* **1996**, *388* (2–3), 115–118.
- (146) Maruyama, K.; Unezaki, S.; Takahashi, N.; Iwatsuru, M. Enhanced Delivery of Doxorubicin to Tumor by Long-Circulating Thermosensitive Liposomes and Local Hyperthermia. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1993**, *1149* (2), 209–216.

- (147) Mills, J. K.; Needham, D. Lysolipid Incorporation in Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer Membranes Enhances the Ion Permeability and Drug Release Rates at the Membrane Phase Transition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2005**, *1716* (2), 77–96.
- (148) Kost, J.; Leong, K.; Langer, R. Ultrasound-Enhanced Polymer Degradation and Release of Incorporated Substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86* (20), 7663–7666.
- (149) Rapoport, N.; Nam, K.-H.; Gupta, R.; Gao, Z.; Mohan, P.; Payne, A.; Todd, N.; Liu, X.; Kim, T.; Shea, J.; Scaife, C.; Parker, D. L.; Jeong, E.-K.; Kennedy, A. M. Ultrasound-Mediated Tumor Imaging and Nanotherapy Using Drug Loaded, Block Copolymer Stabilized Perfluorocarbon Nanoemulsions. *J. Controlled Release* **2011**, *153* (1), 4–15.
- (150) Regmi, R.; Bhattarai, S. R.; Sudakar, C.; Wani, A. S.; Cunningham, R.; Vaishnav, P. P.; Naik, R.; Oupicky, D.; Lawes, G. Hyperthermia Controlled Rapid Drug Release from Thermosensitive Magnetic Microgels. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (29), 6158.
- (151) Cazares-Cortes, E.; Espinosa, A.; Guigner, J.-M.; Michel, A.; Griffete, N.; Wilhelm, C.; Menager, C. Doxorubicin Intracellular Remote Release from Biocompatible OEGMA-Based Magnetic Nanogels Triggered by Magnetic Hyperthermia. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**.
- (152) Thompson, D. H.; Gerasimov, O. V.; Wheeler, J. J.; Rui, Y.; Anderson, V. C. Triggerable Plasmalogen Liposomes: Improvement of System Efficiency. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1996**, *1279* (1), 25–34.
- (153) Mueller, A.; Bondurant, B.; O'Brien, D. F. Visible-Light-Stimulated Destabilization of PEG-Liposomes. *Macromolecules* **2000**, *33* (13), 4799–4804.
- (154) Molina, M.; Asadian-Birjand, M.; Balach, J.; Bergueiro, J.; Miceli, E.; Calderón, M. Stimuli-Responsive Nanogel Composites and Their Application in Nanomedicine. *Chem Soc Rev* **2015**.
- (155) Yang, H.; Wang, Q.; Huang, S.; Xiao, A.; Li, F.; Gan, L.; Yang, X. Smart PH/Redox Dual-Responsive Nanogels for On-Demand Intracellular Anticancer Drug Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (12), 7729–7738.
- (156) Álvarez-Bautista, A.; Duarte, C. M. M.; Mendizábal, E.; Katime, I. Controlled Delivery of Drugs through Smart PH-Sensitive Nanohydrogels for Anti-Cancer Therapies: Synthesis, Drug Release and Cellular Studies. *Des. Monomers Polym.* **2016**, *19* (4), 319–329.
- (157) Oh, J. K.; Drumright, R.; Siegwart, D. J.; Matyjaszewski, K. The Development of Microgels/Nanogels for Drug Delivery Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33* (4), 448–477.
- (158) Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P. Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (15), 1638–1649.
- (159) Kakwere, H.; Leal, M. P.; Materia, M. E.; Curcio, A.; Guardia, P.; Niculaes, D.; Marotta, R.; Falqui, A.; Pellegrino, T. Functionalization of Strongly Interacting Magnetic Nanocubes with (Thermo)Responsive Coating and Their Application in Hyperthermia and Heat-Triggered Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (19), 10132–10145.
- (160) Guisasola, E.; Baeza, A.; Talelli, M.; Arcos, D.; Moros, M.; de la Fuente, J. M.; Vallet-Regí, M. Magnetic-Responsive Release Controlled by Hot Spot Effect. *Langmuir* **2015**, *31* (46), 12777–12782.
- (161) Griffete, N.; Fresnais, J.; Espinosa, A.; Wilhelm, C.; Bée, A.; Ménager, C. Design of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Controlled Release of Doxorubicin under an Alternative Magnetic Field in Athermal Conditions. *Nanoscale* **2015**, *7* (45), 18891–18896.

- (162) Sanson, C.; Diou, O.; Thévenot, J.; Ibarboure, E.; Soum, A.; Brûlet, A.; Miraux, S.; Thiaudière, E.; Tan, S.; Brisson, A.; Dupuis, V.; Sandre, O.; Lecommandoux, S. Doxorubicin Loaded Magnetic Polymersomes: Theranostic Nanocarriers for MR Imaging and Magneto-Chemotherapy. *ACS Nano* **2011**, 5 (2), 1122–1140.
- (163) Jaiswal, M. K.; De, M.; Chou, S. S.; Vasavada, S.; Bleher, R.; Prasad, P. V.; Bahadur, D.; Dravid, V. P. Thermoresponsive Magnetic Hydrogels as Theranostic Nanoconstructs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6 (9), 6237–6247.
- (164) Espinosa, A.; Silva, A. K. A.; Sánchez-Iglesias, A.; Grzelczak, M.; Péchoux, C.; Desboeufs, K.; Liz-Marzán, L. M.; Wilhelm, C. Cancer Cell Internalization of Gold Nanostars Impacts Their Photothermal Efficiency In Vitro and In Vivo: Toward a Plasmonic Thermal Fingerprint in Tumoral Environment. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, 5 (9), 1040–1048.
- (165) Connor, W. G.; Gerner, E. W.; Miller, R. C.; Boone, M. L. M. Prospects for Hyperthermia in Human Cancer Therapy. *Radiology* **1977**, 123 (2), 497–503.
- (166) Huang, X.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Photo-Thermal Therapy (PPTT). *Alex. J. Med.* **2011**, 47 (1), 1–9.

CHAPITRE II

Les nanogels pH- et thermosensibles à base d'oligo (éthylène glycol) méthyle éther méthacrylate

1. Synthèse et caractérisation de nanogels pH- et thermosensibles	68
1.1. Matériel.....	68
1.2. Synthèse des nanogels	68
1.3. Synthèse des nanogels fluorescents	72
1.4. Synthèse des nanogels cœur@coquille.....	73
1.5. Purification des nanogels.....	76
2. Structure et propriétés des nanogels	77
2.1. Les dispersions colloïdales de nanogels	78
2.1.1. Estimation de la concentration massique des dispersions de nanogels.....	78
2.1.2. Estimation de la concentration en nombre des nanogels.....	79
2.1.3. Propriétés optiques des dispersions de nanogels.....	80
2.2. Propriétés physico-chimiques des nanogels	80
2.2.1. Morphologie, taille et charge	80
2.2.2. Teneur en eau libre et en eau liée	83
2.2.3. Estimation de la densité des nanogels	84
2.2.4. Étude de la décomposition thermique de la matrice polymère	85
2.2.5. Étude des transitions thermiques et des températures T_g , T_c et T_f	86
2.2.6. Fonctionnalisation des nanogels.....	87
3. Paramètres expérimentaux influençant les propriétés physico-chimiques des nanogels.....	91
4. Étude de la température et du pH sur les nanogels	93
4.1. Effet de la température	93
4.1.1. Taux de gonflement.....	94
4.2. Effet du pH	96
Conclusion.....	98
Références	100

CHAPITRE II :

Les nanogels pH-sensibles et thermosensibles à base d'oligo (éthylène glycol) méthyle éther méthacrylate

Les microgels / nanogels, également appelés particules d'hydrogel, sont des particules colloïdales constituées d'un réseau tridimensionnel de polymère réticulé gonflé dans un solvant et possédant un diamètre compris entre 0,1 et 1 μm^{1-4} . Dans la littérature la distinction entre les termes *microgel* et *nanogel* reste floue et ils sont utilisés indifféremment sans prendre toujours en compte la taille des particules, pouvant être comprise dans la gamme du nanomètre ($10 \text{ nm} < d < 1 \mu\text{m}$) ou du micromètre ($d > 1 \mu\text{m}$). Dans ce manuscrit de thèse, nous parlerons de nanogels car la taille des particules de gel synthétisées est inférieure à 500 nm.

Ce deuxième chapitre décrit la synthèse de nanogels pH-sensibles et thermosensibles à partir de monomères biocompatibles en oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs). Ces nanogels sont capables de répondre à des stimuli, tels que la température et le pH, en modifiant leurs propriétés physico-chimiques. Tout d'abord, les synthèses de nanogels à base de monomères-OEGMAs, fluorescents ou non et ayant une structure simple ou en cœur@coquille seront détaillées. Ensuite, la structure multi-échelle et les propriétés physico-chimiques des nanogels seront présentées, et notamment leurs propriétés de gonflement-dégonflement en réponse aux variations de pH et de température, dans la perspective d'une utilisation future des nanogels pour l'encapsulation et la libération de principes actifs. Enfin, les principaux paramètres influençant les propriétés physico-chimiques des nanogels lors de la synthèse, tels que les compositions initiales en monomères, en réticulant et en tensioactif seront étudiés.

1. Synthèse et caractérisation de nanogels pH- et thermosensibles

1.1. Matériel

Du poly(éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMA, $M_n = 500,0 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich), du poly (éthylène glycol) diacrylate (OEGDA, $M_n = 250,0 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich), du di (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (MEO_2MA , $M_n = 188,2 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich), de l'acide méthacrylique (MAA – Sigma-Aldrich), du persulfate de potassium (KPS – Sigma-Aldrich), de l'hydroxyde de potassium (KOH, en pastilles – Sigma-Aldrich) et de l'acide nitrique (HNO_3 , 52,5% – Sigma-Aldrich) ont été utilisés pour la synthèse de nanogels sensibles au pH et à la température. De la rhodamine B acryloxyéthyle thiocarbamoylé (RHO – Polysciences, Inc.) a été utilisée pour préparer de nanogels fluorescents. Du méthacrylate de glycidyle (GMA, $M_n = 142,2 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich), du 1,4-dithiothréitol (DTT, $M_n = 154,2 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich), de l'hydroxyde de sodium en pastilles (NaOH, $M_n = 40,0 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich) ont été utilisés pour préparer les nanogels cœur@coquille. Tous les produits ont été utilisés tels que reçus sans purification ultérieure.

1.2. Synthèse des nanogels

Les nanogels pH- et thermosensibles à base de monomères-OEGMA_S et fonctionnalisés avec de l'acide méthacrylique (MAA) ont été synthétisés par copolymérisation radicalaire par précipitation en milieu aqueux et en l'absence de tensioactifs. Comme illustré sur la Figure 17 la copolymérisation radicalaire par précipitation repose sur le changement de la balance hydrophile / hydrophobe des chaînes polymères, dites thermosensibles, lorsque la température du milieu devient supérieure à leur température de transition de phase (VPTT, *Volume Phase Temperature Transition*).

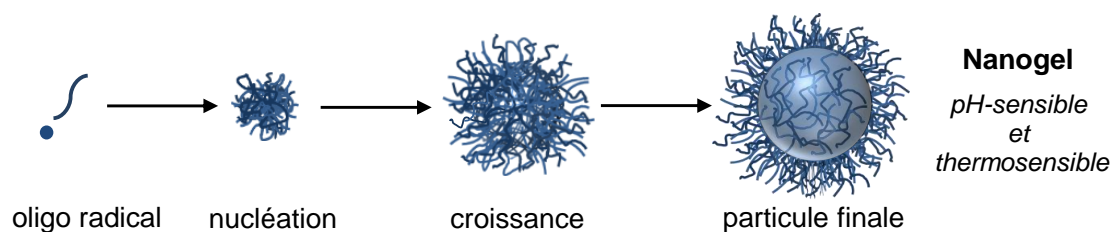


Figure 17. Schéma illustrant les étapes de la polymérisation radicalaire par précipitation à $T > VPTT$.

Protocole : Pour la préparation de nanogels-OEGMAs, 50 mL d'eau distillée sont mis à barboter sous azote $N_2(g)$ au moins 30 min à température ambiante, afin d'enlever tout le dioxygène $O_2(g)$ de la solution. En effet, l' $O_2(g)$ détruit les radicaux produits par l'amorceur et limite la polymérisation. Cette eau dégazée est utilisée comme solvant pour la réaction. Ensuite, les monomères MEO₂MA (0,62 g ; 3,3 mmol), OEGMA₅₀₀ (0,18 g ; 0,36 mmol), MAA (0,019 g ; 0,22 mmol) et le réticulant OEGDA₅₀₀ (0,035 g ; 0,14 mmol) sont dissous dans 40 mL d'eau distillée dégazée et placés dans un ballon tricol de 250 mL équipé d'un réfrigérant. À température ambiante, tous les monomères (MEO₂MA, OEGMA₅₀₀, MAA) et le réticulant (OEGDA₂₅₀) sont solubles dans l'eau. Puis, le milieu réactionnel est chauffé à 70 °C, agité à 400 tr.min⁻¹ et mis à barboter sous azote pendant 1 heure. Une solution de l'amorceur KPS (0,005 g ; 0,0185 mmol dissous dans 10 mL d'eau distillée dégazée) est ajoutée au milieu réactionnel pour déclencher la polymérisation. L'augmentation de la température permet de déclencher la décomposition de l'amorceur, l'amorçage de la polymérisation, ainsi que la précipitation des chaînes de polymère en croissance lorsqu'elles atteignent une longueur critique. La solution devient trouble en quelques minutes à cause de la précipitation des chaînes polymères et à la formation de nucléi à $T > VPTT$. La polymérisation se poursuit sous agitation et bullage d'azote pendant 5 heures. À la fin de la réaction, le ballon est plongé rapidement dans un bain de glace pour arrêter la réaction, puis l'échantillon est purifié par dialyse. Une photo du montage utilisé pour la synthèse des nanogels est donnée en Annexe 2.

Les nanogels obtenus sont très stables et très monodisperses. Le schéma réactionnel est décrit Figure 18.

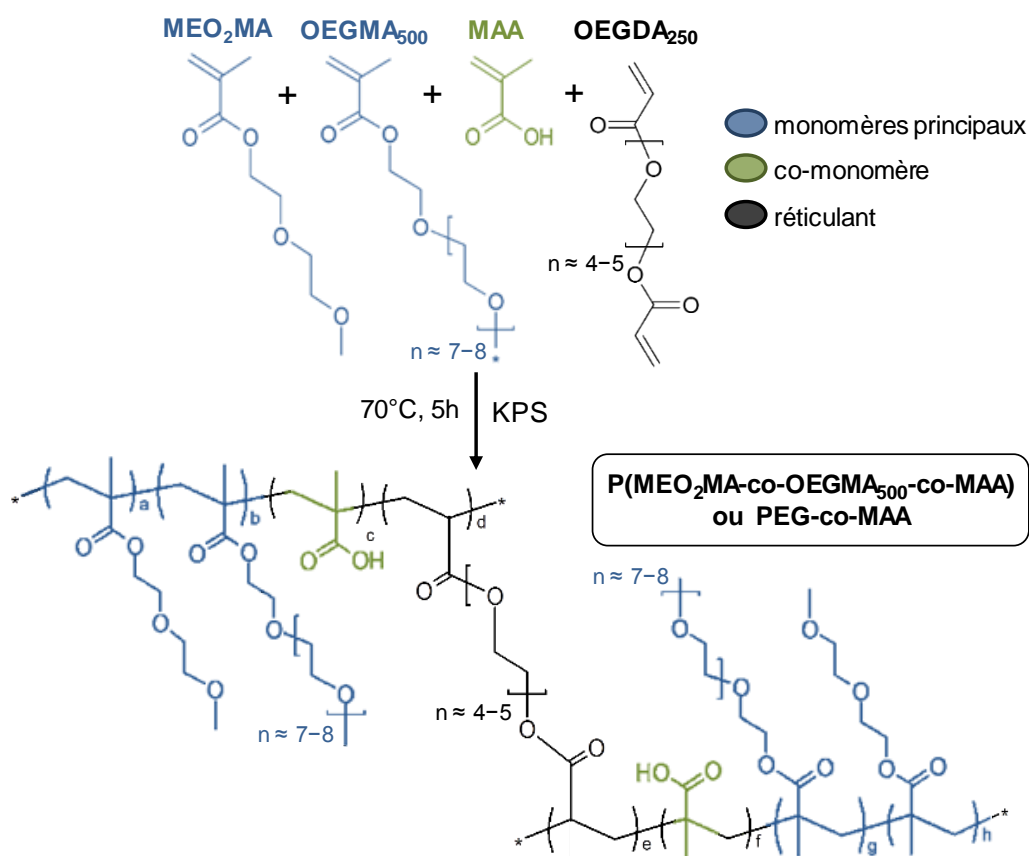


Figure 18. Réaction de copolymérisation radicalaire par précipitation, dans l'eau (70 °C, 5 h) des nanogels PEG-co-MAA.

Afin de simplifier l'écriture, les nanogels P(MEO₂MA-co-OEGMA-co-MAA) fonctionnalisés avec de l'acide méthacrylique (MAA), avec un ratio molaire MEO₂MA : OEGMA₅₀₀ égal à 90 : 10 et un taux de réticulant de 3,8% mol en OEGDA₂₅₀ par rapport à la quantité initiale des monomères MEO₂MA + OEGMA₅₀₀, seront notés PEG-co-MAA. Le Tableau 5 résume la nature chimique des réactifs et les quantités utilisées lors de la synthèse.

Tableau 5. Tableau récapitulatif de la synthèse des nanogels PEG-co-MAA, avec un ratio molaire MEO₂MA : OEGMA₅₀₀ égal à 90 : 10 et fonctionnalisés avec de l'acide méthacrylique (MAA)*.

CAS	Nom	Caractéristiques	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	moles	% molaire / (MEO ₂ MA+OEGMA)
45103-58-0	MEO ₂ MA	monomère	188,2	3,3.10 ⁻³	-
26915-72-0	OEGMA ₅₀₀	co-monomère	500	3,6.10 ⁻⁴	-
79-41-4	MAA	co-monomère	86,1	2,2.10 ⁻⁴	6
26570-48-9	OEGDA ₂₅₀	réticulant	250	1,4.10 ⁻⁴	3,8
7727-21-1	KPS	amorceur	270,3	1,9.10 ⁻⁵	0,5

*Conditions : dans 50 mL eau (solvant) ; sous N_{2(g)}, sous agitation à 400 tr.min⁻¹, à 70 °C, pendant 5 h

Les (macro)-monomères MEO₂MA et OEGMA₅₀₀ ont été choisis pour leurs caractères biocompatibles et thermosensibles. En effet, plusieurs études dans la littérature ont déjà montré que des polymères non linéaires (polymères ramifiés ou branchés, réticulés) à base de (macro)-monomères-OEGMAs présentent une excellente biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*, proche de celle des polymères linéaires en poly(éthylène glycol) (PEG)⁵. Les PEG linéaires sont des polymères non chargés, solubles dans l'eau, non toxiques et non immunogènes, et ont déjà été validés par la FDA (Food and Drug Administration) pour des applications cosmétiques (épaississant, gélifiant de crèmes, shampoing), alimentaires (additif) et médicales (laxatif ou enrobage de particules). En médecine, nous pouvons citer des exemples de produits commerciaux tels que le FORLAXLIB, un laxatif osmotique ; et le CAELIX, de la doxorubicine liposomale pegylée pour le traitement du cancer. Par ailleurs, concernant leur caractère thermosensible, il a été démontré que la température de transition de phase (LCST pour des polymères linéaires ou VPTT pour des polymères réticulés sur un réseau tridimensionnel, tels que les nanogels) des analogues de PEG non linéaires peut être ajustée de manière précise en faisant varier le ratio massique de deux ou plus macro-monomères PEG de longueur de chaîne différente lors de la copolymérisation, c'est-à-dire des polymères ayant une hydrophilie différente⁶. Par exemple, des copolymères random, c'est-à-dire de

copolymères ayant une composition aléatoire à base de MEO₂MA et OEGMA₄₇₅, synthétisés par J.-F. Lutz et A. Hoth, possèdent une valeur de LCST entre 26 et 90 °C, qui peut être ajustée avec précision en faisant varier la composition du copolymère final. Ces auteurs ont ainsi synthétisé des lots de copolymères linéaires P(MEO₂MA-co-OEGMA₄₇₅), dont la LCST est proche de la température du corps humain (37 °C) pour 8% d'unités OEGMA₄₇₅ par chaîne (Figure 19).^{6,7} Grâce à ces propriétés thermosensibles ajustables et de biocompatibilité, plusieurs nanosystèmes à base de monomères-OEGMAs ont été récemment développés⁵⁻¹¹.

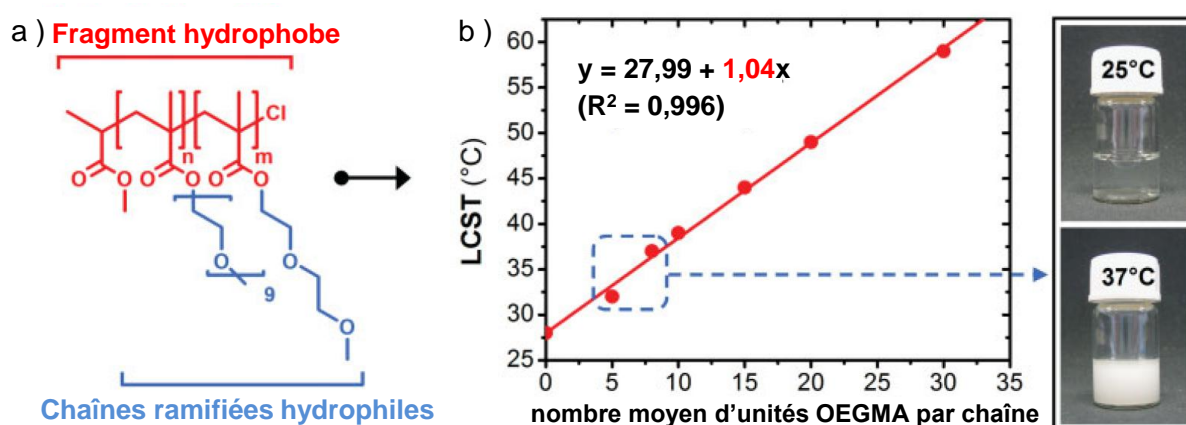


Figure 19. (a) Structure chimique des copolymères random P(MEO₂MA-co-OEGMA₄₇₅) possédant des fragments hydrophobes (en rouge) et hydrophiles (en bleu). (b) Valeurs expérimentales de LCST (points) en fonction du nombre moyen théorique d'unités OEGMA₄₇₅ par chaîne des copolymères, ayant un ratio massique MEO₂MA / OEGMA₄₇₅ différent. Photos des dispersions de nanogels à 25 et 37 °C, montrant la transition de phase des chaînes polymères. Adapté de Lutz et al., *Macromolecules* (2006) ; J.F. Lutz, *Journal of Polymer Sciences Part A* (2008)^{6,7}.

Un autre avantage des monomères-OEGMAs est qu'ils sont commerciaux et facilement polymérisables par plusieurs voies de polymérisation radicalaire (anionique, contrôlée ou non, en présence de radicaux libres)^{6,8}. En outre, le réticulant (OEGDA₂₅₀) utilisé pour la synthèse des nanogels est également dérivé du poly(éthylène glycol), donc potentiellement biocompatible. Ainsi, les nanogels PEG-co-MAA que nous avons synthétisés devraient être biocompatibles. Le ratio molaire MEO₂MA : OEGMA₅₀₀ égal à 90 : 10 a été choisi pour que la VPTT des nanogels soit supérieure à 37 °C dans un milieu physiologique (pH 7,5 ; 0,1 M hepes de sodium).

1.3. Synthèse des nanogels fluorescents

Afin d’observer le mécanisme d’internalisation des nanogels encapsulant ou non de la doxorubicine (DOX), leur localisation dans les cellules et la libération intracellulaire de DOX par microscopie confocale, des nanogels fluorescents ont été synthétisés.

Protocole : Une solution aqueuse contenant un co-monomère fluorescent (rhodamine B acryloxyéthyle thiocarbamoylé) est préparée (0,1 wt% par rapport à la masse totale en monomères MEO₂MA + OEGMA + MAA). Pour éliminer toute impureté, la solution de RHO est filtrée à travers une membrane poreuse de 0,2 µm, puis introduite dans le ballon réactionnel contenant les monomères (MEO₂MA, OEGMA₅₀₀, MAA) et le réticulant (OEGDA₂₅₀). Puis, la réaction se poursuit en suivant le même protocole de copolymérisation radicalaire par précipitation décrit ci-dessus.

La solution du co-monomère fluorescent est de couleur rose translucide en lumière blanche (Figure 20b1) et fluorescente, de couleur jaune-orangée, sous une lampe UV ($\lambda_{\text{émission}} = 570 \text{ nm}$, Figure 20b2). Comme observé sur la Figure 20c, le monomère-rhodamine B en solution dans l’eau possède un maximum d’absorption de $\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$. Les nanogels obtenus contiennent donc de la rhodamine B liée de manière covalente à la matrice polymère. Ils forment une dispersion colloïdale rose opaque de particules de gel dans l’eau (Figure 20b3), et sont fluorescents sous une lampe UV (couleur jaune, Figure 20b4). Pour la suite, les nanogels fluorescents seront notés RHO-MagNanoGels ou RHO-NanoGels, contenant ou non des NPMs respectivement.

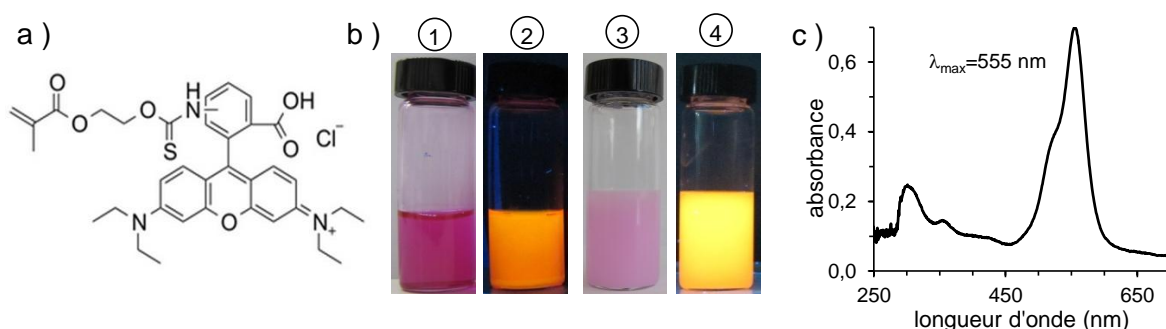


Figure 20. (a) Structure chimique du monomère fluorescent rhodamine B acryloxyéthyle thiocarbamoylé (RHO). (b) Photo d’une solution aqueuse de RHO à 8 µM (b1) en lumière blanche (gauche) et (b2) sous lampe UV (droite); ainsi qu’une solution de nanogels fluorescent RHO-NanoGels (b3) en lumière blanche et (b4) sous lampe UV. (c) Spectre d’absorption du monomère-RHO mesuré avec un spectromètre UV-visible ($\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$) dans l’eau.

1.4. Synthèse des nanogels cœur@coquille

Pour l'élaboration des nanogels hybrides magnéto-plasmoniques, c'est-à-dire des nanogels contenant à la fois de nanoparticules magnétiques (NPMs) et des nanobâtiments d'or (AuNRs), une synthèse permettant d'obtenir des nanogels avec une structure de type cœur@coquille a été mise en place. Le cœur et la coquille des nanogels sont tous les deux constitués de polymères à base d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (ratio molaire MEO₂MA : OEGMA₅₀₀ égale à 90 : 10) et fonctionnalisés, soit avec des groupements –COOH, favorisant la complexation des nanoparticules magnétiques, soit avec des groupements –SH, favorisant ainsi l'encapsulation des nanoparticules d'or.

Pour mettre en place ce protocole, nous nous sommes inspirés des travaux de D. Suzuki et H. Kawaguchi concernant la synthèse des nanogels thermosensibles poly(NIPAM-co-GMA)@poly(NIPAM), de structure cœur@coquille avec un cœur riche en groupements glycidyl méthacrylate (GMA) et une coquille riche en NIPAM.¹²⁻¹⁴ Après la polymérisation de la structure réticulée en gel, une étape de post-modification des nanogels est effectuée en faisant réagir, en milieu basique (pH 11,0), les groupements GMA avec des groupements thiols (–SH) provenant des molécules bi-fonctionnelles. Ces molécules possèdent à leurs extrémités une fonction thiol (réactionnelle) et une fonction –amine (–NH₂), –acide carboxylique (–COOH), –sulfonate (–SO₂O[–]) ou une double fonction thiol (–SH). Cette post-fonctionnalisation est connue en *click chemistry* sous le nom de *réaction click thiol-époxy* et favorise la formation rapide d'une liaison thio-éther et d'un groupe hydroxyle (–OH) secondaire en milieu basique.¹⁵ Les structures chimiques des molécules utilisées pour la fonctionnalisation du cœur (MAA) et de la coquille (GMA, puis SH) des nanogels élaborés dans cette thèse sont données Figure 21.

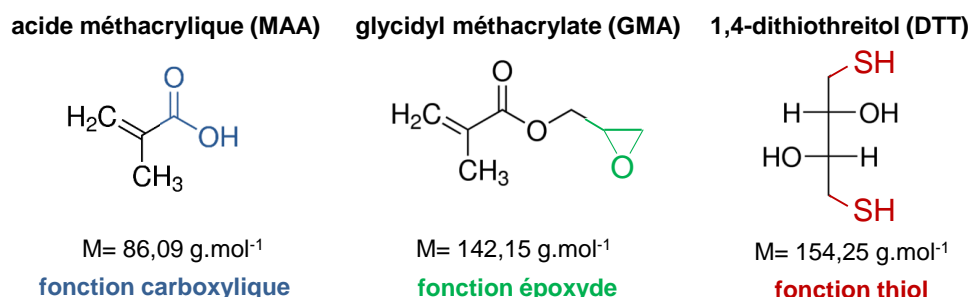


Figure 21. Structure chimique des molécules permettant la fonctionnalisation du cœur et de la coquille des nanogels PEG-co-MAA@PEG-co-SH ou PEG-co-SH@PEG-co-MAA.

Ainsi, une synthèse en trois étapes, illustrée Figure 22, a été effectuée pour préparer des nanogels de structure cœur@coquille à base de monomères en oligo (éthylène glycol)

méthyl éther méthacrylate, avec un cœur possédant des fonctions carboxyliques ($-\text{COOH} / -\text{COO}^-$), provenant de l'acide méthacrylique (MAA) et une coquille fonctionnalisée avec du thiol ($-\text{SH}$), provenant du 1,4-dithiothréitol (DTT).

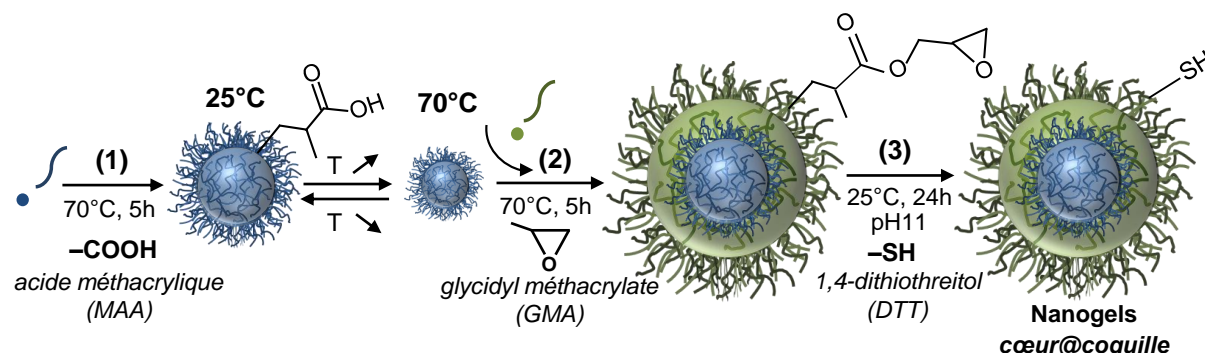


Figure 22. Illustration de la synthèse des nanogels cœur@coquille notés PEG-co-MAA@PEG-co-SH, en trois étapes. (1), (2) Copolymérisation radicalaire par précipitation des monomères MEO₂MA+OEGMA₅₀₀ en présence soit de l'acide méthacrylique MAA (cœur), soit du glycidyl méthacrylate GMA (coquille). (3) Post-fonctionnalisation des nanogels avec une réaction chimie click thiol-époxy.

Étape n°1 : Formation du cœur. Le cœur est synthétisé par copolymérisation radicalaire par précipitation de monomères MEO₂MA, OEGMA₅₀₀ et MAA (avec 90 % mol MEO₂MA et 10% mol OEGMA₅₀₀) en suivant le même protocole détaillé au § 1.2. Puis, les cœurs sont purifiés par dialyse pendant 5 à 7 jours. L'extrait sec de la dispersion colloïdale des cœurs, obtenu après séchage dans une étuve, est mesuré (protocole de purification et mesure d'extrait sec détaillé respectivement au § 1.5. et au § 2.1.1.).

Étape n°2 : Formation de la coquille. Pour la préparation de la coquille, une nouvelle copolymérisation radicalaire par précipitation est effectuée, dans les mêmes conditions que précédemment (70 °C, 5 h, sous N_{2(g)}), mais en diminuant le volume total de la réaction ($V_{\text{total}} \approx 12$ mL ou lieu de 50 mL) et en remplaçant le MAA par du GMA. Pour cela, 5 mL de la dispersion colloïdale contenant les cœurs, ainsi que 5 mL d'eau distillée sont placés dans un ballon tricol équipé d'un réfrigérant, d'un agitateur magnétique et d'une plaque chauffante. La dispersion est chauffée à 70 °C et dégazée sous N_{2(g)}, pendant 30 min. Puis, 2 mL d'une solution contenant du MEO₂MA, OEGMA₅₀₀, OEGDA₂₅₀ et du GMA (à la place du MAA) sont ajoutés au ballon réactionnel. Les masses des réactifs sont choisies de sorte à avoir un ratio massique $m_{\text{cœur}} / m_{\text{totale réactifs coquille}} = 1$ (avec $m_{\text{cœur}} = m_{\text{extrait sec}}$), en respectant les mêmes pourcentages molaires des réactifs utilisés pour l'élaboration des cœurs et en fixant le % molaire de GMA à 81%mol. Ainsi, par exemple, pour une dispersion de cœurs dont l'extrait sec est égal à $[\text{cœurs}] = 3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $m_{\text{cœur}} \text{ (dans 5 mL)} = m_{\text{totale réactifs coquille}} = 0,015 \text{ g}$, la solution de 2 mL ajoutée au ballon est composée de 7,44 mg (40 μmol) de MEO₂MA, 2,16 mg (4,3 μmol) de OEGMA₅₀₀, 5,16 mg (1,7 μmol) de OEGDA₂₅₀ et de 0,42 mg (36 μmol) de GMA. La masse de GMA étant très faible pour être pesée facilement, nous avons pesé 1 mg de GMA et ajouté 1 mL d'eau, puis 420 μL de cette solution sont ajoutés au mélange de monomères précédent (le volume total du milieu réactionnel est $V_{\text{total}} = 12 \text{ mL}$). Après 10 min, 150 μL d'une solution à 6%mol en KPS / (MEO₂MA+OEGMA) sont ajoutés au ballon pour démarrer la polymérisation, et la réaction se poursuit pendant 5 heures à 70 °C sous N_{2(g)}. Le pourcentage molaire de KPS est identique à celui

utilisé pour l'élaboration des cœurs. De ce fait, pour une dispersion à $[\text{cœurs}] = 3 \text{ mg.mL}^{-1}$, la masse de KPS est de 0,073 mg (0,27 μmol). Cette masse étant très faible pour être mesurée avec précision, une solution de 2 mL d'eau contenant 1 mg de KPS a été préalablement préparée, puis 150 μL de cette solution ont été ajoutés au ballon. À la fin de la polymérisation, les nanogels PEG-co-MAA@PEG-co-GMA obtenus sont purifiés par plusieurs cycles de centrifugation (10 000 tr.min^{-1} , 30 min). Les quantités des réactifs utilisées pour l'élaboration de la coquille sont résumées dans le Tableau 6.

Étape n°3 : Fonctionnalisation de la coquille post-polymérisation. La fonctionnalisation de la coquille avec des groupements thiols est effectuée en suivant la procédure indiquée par D. Suzuki et H. Kawaguchi¹². Tout d'abord, un mélange contenant 50 mg des nanogels PEG-co-MAA@PEG-co-GMA ; 0,079 g (0,51 mmol) de DTT et 10 mL d'eau est placé dans un ballon et mis sous agitation à 400 tr.min^{-1} , à température ambiante. Ainsi, par exemple, pour une dispersion colloïdale de nanogels cœur@coquille d'extrait sec égal à $[\text{cœur@coquille}] = 6,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, un volume de 8 mL de cette dispersion (correspondant à 50 mg de nanogels) est prélevé et introduit dans le ballon réactionnel. Puis 0,079 g (0,51 mmol) de DTT, ainsi que 2 mL d'eau distillée y sont également ajoutés. Le volume total du milieu réactionnel est de 10 mL. Le pH de la solution est ajusté à 11,0 par ajout de quelques gouttes d'une solution de NaOH à 6 M. La réaction est poursuivie pendant 24 heures à température ambiante. Enfin, les nanogels PEG-co-MAA@PEG-co-SH obtenus sont purifiés par plusieurs cycles de centrifugation (10 000 tr.min^{-1} ; 30 min) comme décrit § 1.5., jusqu'à ce que la conductivité des eaux de lavage soit proche de celle de l'eau distillée ($\sigma_{\text{eau}} \approx 2 \mu\text{S.cm}^{-1}$). Après purification, la dispersion de nanogels est laissée sous agitation une nuit pour bien redisperser les nanogels dans l'eau.

Lors de l'étape (2), les nanogels synthétisés à l'étape (1), appelés *cœurs*, servent de sites de nucléation pour démarrer la copolymérisation radicalaire par précipitation des nouveaux monomères ajoutés. Une coquille à base de monomères OEGMAs et avec des fonctionnalités époxydes (GMA) est ainsi formée autour des cœurs, d'où le nom en anglais de « seeded precipitation polymerization »^{16,17}. De plus, étant donné que la température de réaction est supérieure à la VPTT des nanogels de cœur ($T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$), ils sont collapsés, empêchant ainsi que les chaînes de polymère de la coquille forment un réseau interpénétré avec le cœur. L'étape 3 consiste à faire réagir les groupements époxydes de la coquille avec du 1,4-dithiothreitol (DTT) en milieu basique (pH 11,0). Ce protocole de synthèse en trois étapes permet d'obtenir des nanogels de structure cœur@coquille avec des fonctionnalités chimiques variables. Lorsque le cœur est fonctionnalisé avec le MAA et la coquille avec le DTT, les nanogels seront notés PEG-co-MAA@PEG-co-SH, tandis qu'ils seront notés PEG-co-SH@PEG-co-MAA, lorsque le cœur est fonctionnalisé avec le DTT, et la coquille avec le MAA.

Tableau 6. Tableau récapitulatif de la coquille des nanogels PEG-co-MAA@PEG-co-SH (étape (2)) pour une dispersion de cœurs dont l'extrait sec est égal à $[\text{cœurs}] = 3 \text{ mg.mL}^{-1}$.

CAS	Nom	Caractéristiques	Masse molaire (g.mol^{-1})	moles	% molaire / (MEO ₂ MA+OEGMA)
45103-58-0	MEO ₂ MA	monomère	188,2	$4,0.10^{-5}$	} 100
26915-72-0	OEGMA ₅₀₀	co-monomère	500	$4,3.10^{-6}$	
106-91-2	GMA	co-monomère	142,2	$3,6.10^{-5}$	81,3
26570-48-9	OEGDA ₂₅₀	réticulant	250	$1,7.10^{-6}$	3,9
<i>dissous dans 2 mL eau (solvant)</i>					
7727-21-1	KPS	amorceur	270,3	$2,7.10^{-7}$	0,6
<i>dissous dans 150 μL eau (solvant)</i>					

1.5. Purification des nanogels

Protocole : À la fin de chaque étape de polymérisation, les nanogels sont purifiés soit par dialyse, soit par centrifugation, pour éliminer les monomères n'ayant pas réagi, ainsi que les chaînes de polymère non réticulées. Les nanogels de type cœur sont purifiés par dialyse avec une membrane Spectra / Por de poids moléculaire 12 – 14 kDa (Spectrum Laboratories) et en plaçant le boudin de dialyse dans un bécher contenant 1 L d'eau distillée. L'eau de dialyse est changée deux fois par jour par de l'eau distillée fraîche. Après chaque lavage, les surnageants de dialyse sont récupérés et leur conductivité est mesurée. Les cycles de lavage sont répétés jusqu'à ce que la conductivité de l'eau de dialyse soit proche de celle de l'eau distillée.

Pour éliminer tous les résidus de synthèse, il faut dialyser l'échantillon pendant 3 à 7 jours (Figure 23a). À la fin de la purification, la diminution du diamètre hydrodynamique (d_h) des nanogels ($d_h = 372$ à 328 nm , respectivement avant et après purification – Figure 23b) est due probablement à la présence des monomères n'ayant pas réagi à l'intérieur des nanogels, faisant gonfler la matrice en gel par encombrement stérique. Les dispersions colloïdales dans l'eau de nanogels purifiés sont de couleur blanche-bleuâtre (Figure 23b).

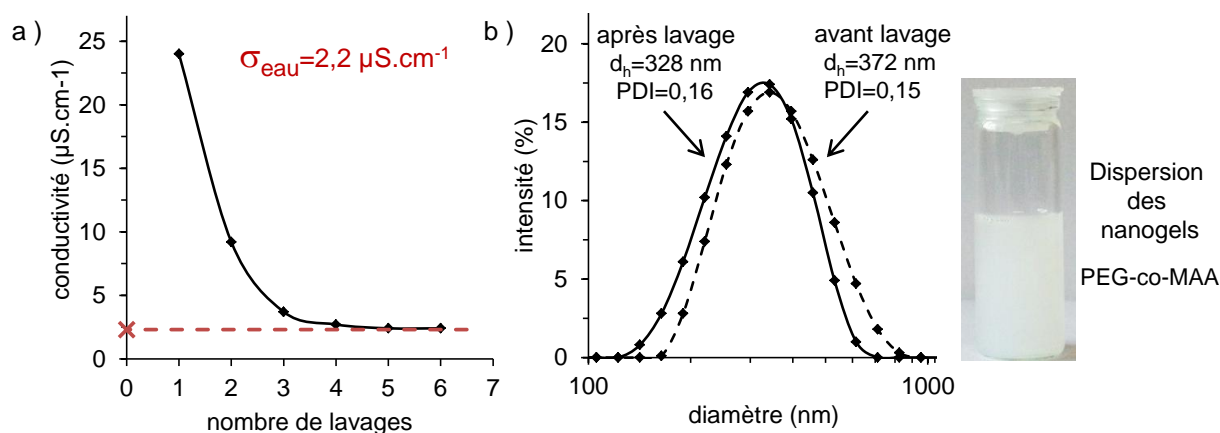


Figure 23. (a) Évolution de la conductivité des surnageants (en $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) en fonction du nombre de bains de dialyse pour l'échantillon PEG-co-MAA. Deux lavages correspondent à une journée de dialyse. (b) Distributions en taille des nanogels PEG-co-MAA avant (en pointillés) et après (ligne continue) les cycles de lavage, mesurées par DLS. Photo d'une dispersion de nanogels PEG-co-MAA après les cycles de lavage.

Par ailleurs, les nanogels de type cœur @ coquille ont été purifiés à chacune des trois étapes de leur synthèse. À la fin de l'étape (1), les nanogels sont lavés par dialyse comme décrit ci-dessus. À la fin de l'étape (2) et (3), les nanogels sont lavés par 2 à 4 cycles de centrifugation, car les volumes du milieu réactionnel sont plus faibles, avec $V = 50$ et 12 mL, respectivement pour la polymérisation du cœur et de la coquille. Chaque cycle de centrifugation est effectué à une vitesse de $10\,000$ $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ (RCF : $11,617$ xg) pendant 30 min, avec une centrifugeuse thermoréfrigérée Heraeus MultifugeTMX1R (Thermo Fisher Scientific) et un rotor à angle fixe, de 104 mm de rayon (modèle Fiberlite F15-8 x 50cy). De la même manière que pour la dialyse, la conductivité des surnageants est mesurée après chaque cycle, jusqu'à obtenir des surnageants ayant une conductivité proche de celle de l'eau distillée. La purification des dispersions de nanogels, par dialyse ou centrifugation, est indispensable avant la caractérisation des propriétés physico-chimiques des nanogels. En effet, des traces de monomères ou de tensioactifs dans le cas échéant peuvent modifier ces propriétés.

2. Structure et propriétés des nanogels

Dans cette partie, nous nous intéressons à la structure multi-échelles des nanogels à base des monomères-OEGMAs. La structure et les principales propriétés physico-chimiques des nanogels sont détaillées ici, à savoir la concentration massique et en nombre, la stabilité et les propriétés optiques des dispersions des nanogels, la morphologie, la taille, la teneur en eau, la densité, la fonctionnalisation et l'indice de réfraction des nanogels. Nous caractérisons

la structure et les propriétés physico-chimiques des nanogels à différentes échelles, en commençant par l'échelle macroscopique, correspondant à la dispersion des nanogels, puis l'échelle mésoscopique, correspondant à la taille des nanogels ; et enfin l'échelle nanoscopique, correspondant au réseau 3D de polymères réticulés (Figure 24). Les résultats présentés concernent le lot de nanogels PEG-co-MAA (avec 6%mol de MAA, 8%mol d'OEGDA₂₅₀ et un ratio molaire MEO₂MA / OEGMA₅₀₀ égal à 90 / 10), car c'est l'échantillon de base pour la synthèse des nanogels hybrides (Chapitres III et IV).

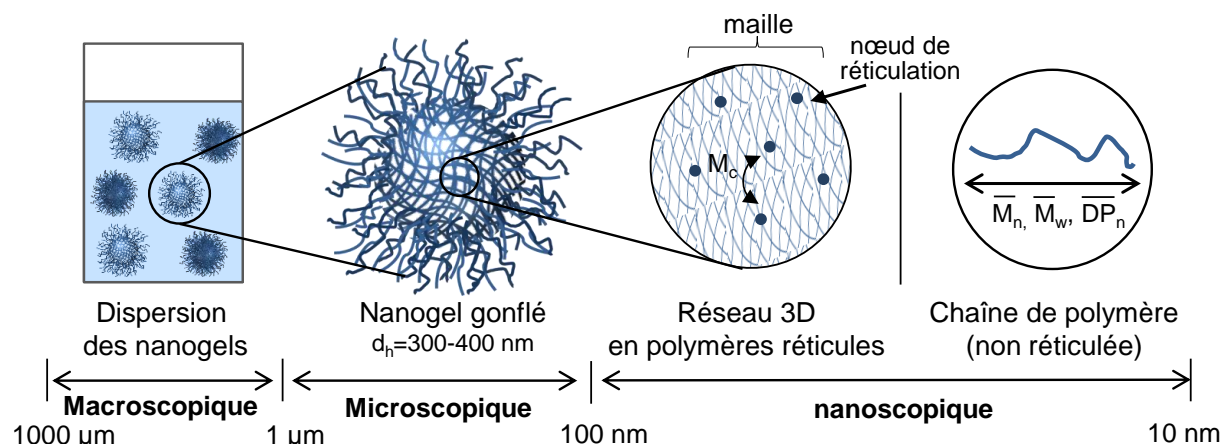


Figure 24. Structure multi-échelle des nanogels pH-sensibles et thermosensibles : de l'échelle nanoscopique (10-100 nm), mésoscopique (100-1000 nm) à l'échelle macroscopique (1-1000 µm).

2.1. Les dispersions colloïdales de nanogels

2.1.1. Estimation de la concentration massique des dispersions de nanogels

Après les différentes étapes de purification des nanogels, la quantité de polymère présente dans la dispersion (m_{pol}) est estimée par analyse gravimétrique en mesurant l'extrait sec. Pour ce faire, 1 mL de chaque dispersion de nanogels de PEG-co-MAA est placé dans une étuve à 70 °C pendant 24 h, afin d'éliminer l'eau par évaporation. L'échantillon est pesé avant et après avoir été mis à l'étuve. La masse de l'extrait sec est calculée pour 1 mL de dispersion (Équation 1) :

$$m_{\text{extrait sec}} = m_s - (\% \text{eau liée})m_s \quad \text{Eq. 4}$$

avec m_s la masse des nanogels secs et %eau liée la teneur en eau dite « liée » et définie au § 2.2.2. Ainsi, la concentration massique du lot PEG-co-MAA est estimée à 5,6 mg de nanogels par millilitre de solution ($[\text{nanogels}] = 5,6 \text{ mg}_{(\text{nanogels})} \cdot \text{mL}^{-1}$).

2.1.2. Estimation de la concentration en nombre des nanogels

À 25 °C, les nanogels PEG-co-MAA sont composés de 4% massique de polymère et 96% d'eau. Connaissant le volume hydrodynamique des nanogels à 25°C et la masse de polymère présente dans la solution ($m_{\text{extrait sec}}$), il est alors possible d'estimer le nombre de particules en dispersion avec la formule ci-dessous :

$$N_p = \frac{6 \cdot m_{\text{polymère}}}{\pi \cdot (d_{h(25^\circ\text{C})})^3} \times \left(\frac{1}{\rho_{\text{polymère}}} + \frac{0,96}{0,04 \cdot \rho_{\text{eau}}} \right) \quad \text{Eq. 5}$$

où $\rho_{\text{polymère}}$ et ρ_{eau} sont respectivement la densité du polymère et celle de l'eau. On suppose que la densité du polymère composant la maille des nanogels est proche de celle du poly(éthylène glycol) linéaire (PEG) à haut poids moléculaire ($M_n > 6000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), tel que $\rho_{\text{polymère}} = 1,2 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Pour 1 mL de dispersion des nanogels PEG-co-MAA, $m_{\text{polymère}} = 5,6 \cdot 10^{-3} \text{ g}$; $d_{h(25^\circ\text{C})} = 328 \text{ nm} = 3,28 \cdot 10^{-5} \text{ cm}$. En remplaçant ces valeurs dans l'équation 2, le nombre de nanogels par millilitre de solution est estimé à $7,06 \cdot 10^{12}$ nanogels. Le nombre de nanogels présents dans la dispersion peut également être mesuré par une analyse du suivi individuel de particules (NTA, *Nanoparticle Tracking Analysis*). Cette technique utilise les propriétés combinées de diffusion de la lumière et du mouvement brownien des particules. Elle permet de visualiser des nanoparticules en dispersion dans un liquide ; de calculer la distribution en taille et la concentration en nombre des particules. Chaque particule est analysée individuellement, par observation directe de la lumière diffusée par la particule avec un microscope (grossissement x20) équipé d'une caméra et par mesure de leur coefficient de diffusion. Pour l'analyse NTA des nanogels, nous avons utilisé un Nanosight LM10 (Malvern Instrument) avec un faisceau laser ($\lambda = 405 \text{ nm}$). Les résultats sont présentés par tranches, dites « déciles ». D10, D50 et D90, qui correspondent respectivement au d_h de 10, 50 et 90% des nanogels présents dans la dispersion.

Protocole : Tout d'abord, la dispersion de PEG-co-MAA ($[\text{nanogels}] = 5,6 \text{ g}_{(\text{nanogels})} \cdot \text{mL}^{-1}$) est diluée 10 000 fois avec de l'eau distillée (20 μL de la dispersion des nanogels dans 1,98 mL d'eau). Puis, 500 μL de cette dilution sont placés dans la chambre d'analyse. Cette chambre est ensuite éclairée par un faisceau laser (405 nm) ; les nanogels en suspension et présents sur la trajectoire du faisceau vont diffuser la lumière permettant de les visualiser avec un microscope (grossissement x20) et une caméra.

Le logiciel a effectué le calcul sur 749 images. La concentration de la dispersion nanogels PEG-co-MAA est estimée à $2,49 \cdot 10^{12} \pm 2,58 \cdot 10^{11} \text{ nanogels}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ce résultat est du

même ordre de grandeur (10^{12}) que la valeur calculée précédemment à l'aide de l'équation 2. De même, la NTA nous permet de calculer le d_h des nanogels en dispersion et leur coefficient de diffusion apparent (D_z). Ces données seront traitées au paragraphe 2.2.1.

2.1.3. Propriétés optiques des dispersions de nanogels

À 25 °C, la dispersion aqueuse de nanogels PEG-co-MAA ($[\text{nanogels}] = 5,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) est blanche et légèrement opaque comme observé sur la Figure 25. Des paramètres tels que la concentration en nanogels, la température du milieu, ainsi que l'organisation des nanogels en structures compactes et ordonnées peuvent faire varier l'aspect optique des dispersions colloïdales de nanogels. Pour une concentration donnée, la dispersion de nanogels devient plus opaque lorsque la température est au-dessus de la VPTT des nanogels (Figure 25). Ceci est dû probablement à une différence d'indice de réfraction entre les nanogels (n_{nanogels}) et le liquide dispersant (n_{eau}). En effet, à 25 °C, les nanogels sont gonflés et sont composés d'environ 96% d'eau ; par conséquent l'indice de réfraction des nanogels est proche de celui de l'eau, alors qu'à 50 °C les nanogels sont dégonflés, expulsant ainsi une partie de l'eau vers l'extérieur de la matrice.

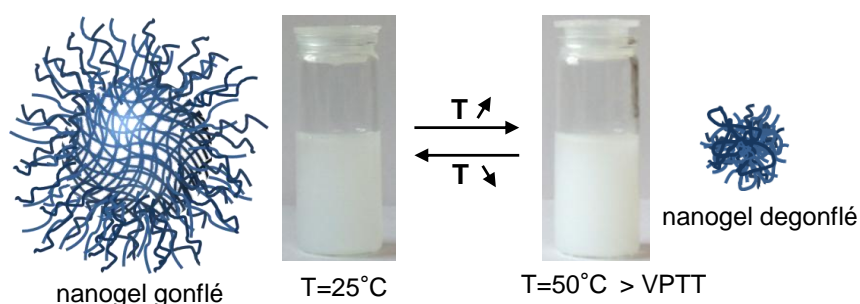


Figure 25. Transition de phase de type gonflement-dégonflement des nanogels thermosensibles PEG-co-MAA lorsque $T > VPTT$. La dispersion colloïdale est faiblement concentrée en nanogels ($[\text{nanogels}] = 5,3 \text{ mg.mL}^{-1}$)

2.2. Propriétés physico-chimiques des nanogels

2.2.1. Morphologie, taille et charge

Les nanogels de type PEG-co-MAA présentent une morphologie sphérique comme observée sur le cliché de microscopie électronique à transmission (TEM) de la Figure 26a. De même, leur surface n'est pas complètement lisse, mais on peut observer une structure chevelue.

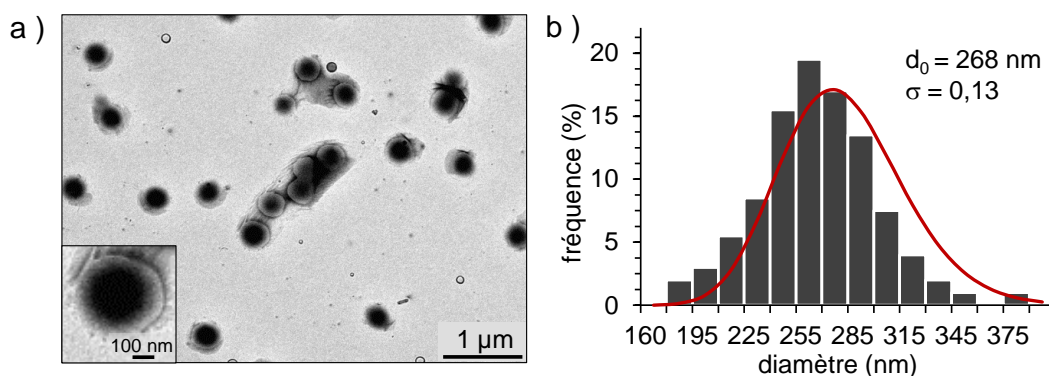


Figure 26. (a) Cliché de microscopie électronique à transmission (TEM) et zoom montrant des nanogels PEG-co-MAA monodisperses (colorés à l'acétate d'uranyle) et (b) distribution en taille des nanogels obtenue par analyse des plusieurs clichés TEM ($n = 200$ nanogels) et ajustée par une loi log-normale (courbe rouge).

La distribution en taille des nanogels est obtenue par analyse de plusieurs clichés TEM (en mesurant le diamètre de 200 particules) à l'aide du logiciel ImageJ (Figure 26b). Cette distribution est modélisée par une loi log-normal (courbe rouge). Le diamètre moyen des nanogels PEG-co-MAA est de 268 nm, avec un écart-type $\sigma = 0,13$. Ce diamètre correspond au diamètre des nanogels « secs ». En effet, pour l'analyse TEM, une goutte d'une dispersion diluée de nanogels a été déposée sur une grille de cuivre recouverte de carbone, et a été laissée sécher à température ambiante avant d'être observée au microscope. Pendant la période de séchage, les nanogels se déforment en s'écrasant sous l'effet de la gravité et de la tension superficielle de l'eau, en raison de leur caractère mou.¹⁸ Par ailleurs, le d_h et le potentiel zéta des nanogels ont été mesurés par DLS (Figure 27). Les nanogels PEG-co-MAA ont un diamètre hydrodynamique (d_h) égal à 328 nm à 25 °C, sont très monodisperses (indice de polydispersité PDI = 0,16) et sont chargés négativement dans l'eau distillée (pH 5,5) avec un potentiel zéta de -35,4 mV.

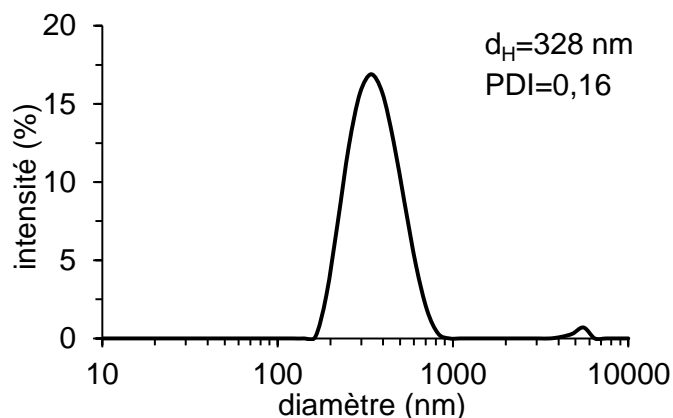


Figure 27. Distribution en taille des nanogels PEG-co-MAA mesurée par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

De même, la distribution en taille des nanogels a été mesurée par NTA comme décrit au paragraphe 2.1.2. Contrairement à la DLS qui donne une valeur moyenne du d_h sur un lot global de nanogels en favorisant les plus gros et en négligeant les plus petits, la NTA mesure le d_h nanogel par nanogel, permettant de prendre en compte le d_h de tous les nanogels indépendamment de leur taille. Pour les nanogels PEG-co-MAA dilués $\times 10\ 000$, D10, D50 et D90 sont respectivement 137, 280, 369 nm. Le d_h moyen mesuré par NTA est plus faible que celui mesuré par DLS ($d_h = 272$ et 328 nm, respectivement pour NTA et DLS). Ceci est dû probablement au fait que l'intensité des gros nanogels est plus forte que celle de petits en DLS, ce qui est susceptible de biaiser la mesure. En effet, les nanogels les plus gros ont un poids plus fort en DLS. La Figure 28b montre une capture d'image de la vidéo du mouvement brownien des nanogels et la courbe de distribution en taille obtenue par NTA. La courbe correspond à la concentration en nombre ($\text{nombre}_{\text{nanogels}} \cdot \text{mL}^{-1}$) en fonction du diamètre moyen FTLA (*Finite Track Length Adjustment*). Les valeurs moyennes, le mode et les déciles D10, D50, D90 des diamètres des nanogels PEG-co-MAA, mesurées par NTA, sont regroupées dans le Tableau 7.

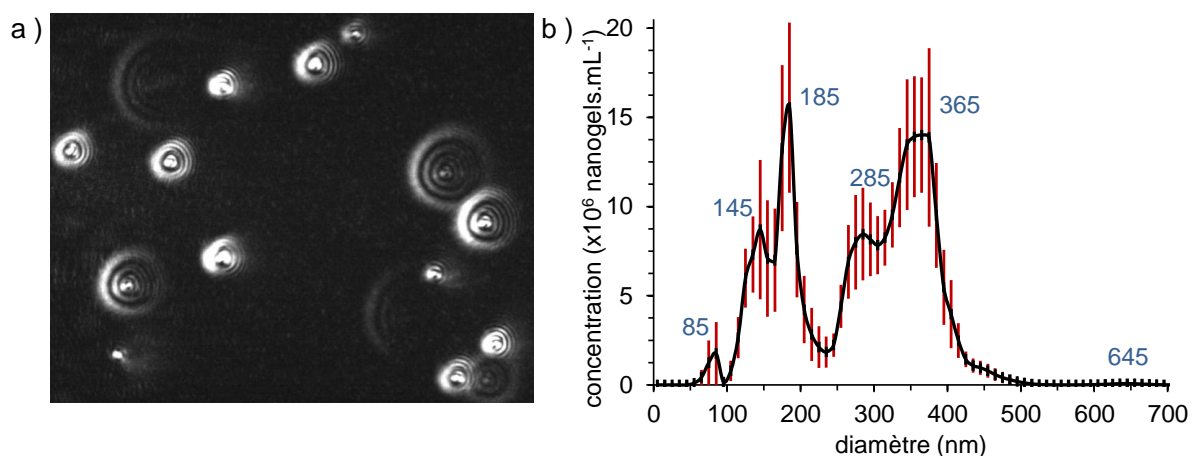


Figure 28. Analyse NTA d'une dispersion de nanogels PEG-co-MAA (dilution $\times 10\ 000$). (a) Image des nanogels en suspension diffusant la lumière d'un faisceau laser ($\lambda = 405$ nm). L'image est extraite de la vidéo montrant le mouvement brownien des nanogels. (b) Courbe de distribution en taille des nanogels donnant la concentration en nombre ($\times 10^6$ nanogels.mL⁻¹) en fonction du diamètre moyen FTLA (*Finite Track Length Adjustment*). Les barres rouges indiquent \pm l'écart-type des moyennes.

Tableau 7. Distribution en taille des nanogels PEG-co-MAA.*

Diamètre moyen \pm écart-type (nm)	
Moyenne	272,1 \pm 12,3
Mode	254 \pm 43,1
D10	137,2 \pm 6,7
D50	279,5 \pm 21,3
D90	368,7 \pm 10,2

2.2.2. Teneur en eau libre et en eau liée

À l'intérieur d'un réseau hydrophile de polymères réticulés, tel que les nanogels, l'eau existe dans deux états physiques distincts en fonction des interactions établies entre les molécules d'eau et les chaînes de polymères. Lorsque les nanogels sont gonflés ($T < VPTT$), la plupart de l'eau à l'intérieur du réseau de polymères réticulés est *libre* et peut être éliminée par évaporation (chauffage à l'étuve, 70 °C, 24 h) ou par sublimation (congélation avec de l'azote liquide, suivie d'une lyophilisation). Cependant, certaines molécules d'eau interagissent fortement avec les chaînes de polymère, soit par des liaisons hydrogènes (forces intermoléculaires impliquant l'atome d'hydrogène des molécules d'eau et l'oxygène des chaînes polymères en OEGMAs), soit par des interactions hydrophobes. Cette eau est appelée *liée*¹⁹. La quantité d'eau libre et d'eau liée dans les nanogels est reliée directement au transport et à la diffusion d'eau à travers la matrice polymère, et donc aux mécanismes d'encapsulation et de libération de molécules. L'étude de la quantité d'eau dans les nanogels est essentielle si l'on souhaite utiliser les nanogels en tant que systèmes de libération de molécules. La teneur en eau libre à l'équilibre à température ambiante (25 °C) des nanogels est calculée suivant la formule suivante²⁰ :

$$eau\ libre\ (\%) = \frac{m_g - m_s}{m_g} \times 100 \quad \text{Eq. 6}$$

avec m_g est la masse des nanogels gonflés à l'équilibre et m_s la masse des nanogels secs.

Protocole : Pour mesurer m_g , les nanogels sont laissés gonfler dans l'eau au moins 48 h après purification pour atteindre le gonflement à l'équilibre. Puis, 500 μ L de dispersion de nanogels sont centrifugés à 25 °C à une vitesse de 10 000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 10 min, avec une minicentrifugeuse MiniSpin® (Eppendorf), avec un rotor à angle fixe, de 60 mm de rayon (modèle F-45-12-11). Enfin, les nanogels gonflés sont pesés. Pour mesurer la masse des nanogels secs (m_s), 500 μ L de dispersion de nanogels sont mis à l'étuve à 70 °C pendant 24 h, puis la masse des nanogels séchés à l'étuve est mesurée. Les valeurs finales de m_g et m_s correspondent à une moyenne de quatre mesures. Par ailleurs, la quantité d'eau liée restant après séchage à l'étuve (70 °C, 24 h) est calculée par analyse thermogravimétrique (TGA) des nanogels comme détaillée § 2.2.4.

Ainsi, pour les nanogels PEG-co-MAA, la courbe TGA montre qu'il reste encore 14% d'eau liée. La teneur en eau totale à l'intérieur des nanogels à l'équilibre (EWC, *Equilibrium Water Content*) à 25 °C est calculée par l'équation 4 :

$$EWC = \%eau\ libre\ à\ T(^{\circ}C) + \%eau\ liée \quad \text{Eq. 7}$$

La teneur en polymère (PC, *polymer content*) est déduite de la teneur en eau :

$$PC (\%) = 100 - EWC \quad \text{Eq. 8}$$

Les valeurs de la teneur en eau et en polymère des nanogels PEG-co-MAA sont données dans le Tableau 8. Ces résultats montrent qu'à 25 °C, les nanogels PEG-co-MAA sont composés principalement d'eau (96% d'eau et 4% de polymère).

Tableau 8. Teneur (%) en eau et en polymère des nanogels PEG-co-MAA

	T=25 °C
teneur en eau « libre »	82%
teneur en eau « liée »	14%
teneur en eau totale (EWC)	96% (140 mg _{eau} .mL ⁻¹)
teneur en polymère (PC)	4% (4,8 mg _{gel} .mL ⁻¹)

2.2.3. Estimation de la densité des nanogels

La densité des nanogels est définie telle que :

$$\rho_{nanogels} = w_{polymère} \cdot \rho_{polymère} + w_{eau} \cdot \rho_{eau} \quad \text{Eq. 9}$$

où $\rho_{polymère}$ et ρ_{eau} sont respectivement les densités du polymère et de l'eau à 25 °C. $\rho_{eau} = 1,0 \text{ g.cm}^{-3}$ et $\rho_{polymère} = 1,2 \text{ g.cm}^{-3}$ (en faisant l'hypothèse que la densité $\rho_{polymère}$ est proche de celle des polymères linéaires poly(éthylène glycol) ou PEG à haut poids moléculaire. Par ailleurs, $w_{polymère}$ et w_{eau} sont les fractions massiques du polymère et de l'eau constituant les nanogels. Elles correspondent respectivement à la teneur en polymère (PC) et en eau total (EWC) calculées précédemment. À 25 °C, les nanogels PEG-co-MAA sont composés de $w_{polymère} = 4\%$ et $w_{eau} = 96\%$. Pour T = 50 °C, nous considérons que les nanogels en dispersion contiennent $w_{polymère} = 71\%$ et $w_{eau} = 29\%$ conformément aux travaux de Lele et al. cités ci-dessus¹⁹ ; soit 0,4 g d'eau pour 1g de polymère. Ainsi, en remplaçant ces valeurs dans l'équation 10, on en déduit la densité des nanogels PEG-co-MAA égale à $\rho_{nanogels} \approx 1,01$ et $1,14 \text{ g.mL}^{-1}$, respectivement à 25 et 50 °C. À 25 °C, la densité des nanogels est très proche de la densité de l'eau ($\rho_{eau} = 1,0 \text{ g.mL}^{-1}$). En effet, à cette température les nanogels sont constitués de 96% d'eau.

2.2.4. Étude de la décomposition thermique de la matrice polymère

La décomposition thermique du réseau 3D en polymères réticulés des nanogels a été évaluée par analyse thermogravimétrique (TGA, ThermoGravimetric Analysis), en mesurant l'évolution de la masse de l'échantillon en fonction de la température. L'analyse thermogravimétrique de nanogels permet également de quantifier l'eau absorbée dans les nanogels et non évaporée lors du passage à l'étuve.

Protocole : Un volume de dispersion de nanogels PEG-co-MAA est séché dans une étuve à 70 °C pendant 24 h, puis placé dans une capsule en aluminium. La poudre est ensuite analysée avec un appareil thermogravimétrique SDT Q600 (TA Instruments) sous flux d'azote $N_{2(g)}$ à $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, avec une vitesse de chauffage de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 25 à 800 °C.

Tout d'abord, la courbe TGA des nanogels PEG-co-MAA montre une perte de masse de 14% entre 25 et 225 °C (Figure 29). Cette masse correspond aux molécules d'eau encore présentes dans les nanogels, malgré l'étape préalable de séchage à l'étuve. Cette eau dite liée interagit fortement avec les chaînes de polymères, soit par des liaisons hydrogènes entre l'atome d'hydrogène des molécules d'eau et l'oxygène des chaînes de polymères-OEGMAs, soit par des interactions hydrophobes. Elle est par conséquent plus difficile à éliminer. Puis, la masse des nanogels diminue fortement de 225 à 430 °C due à la décomposition thermique de la matrice polymère, jusqu'à obtenir une perte quasi-totale de masse (environ 96%) autour de 450 °C.

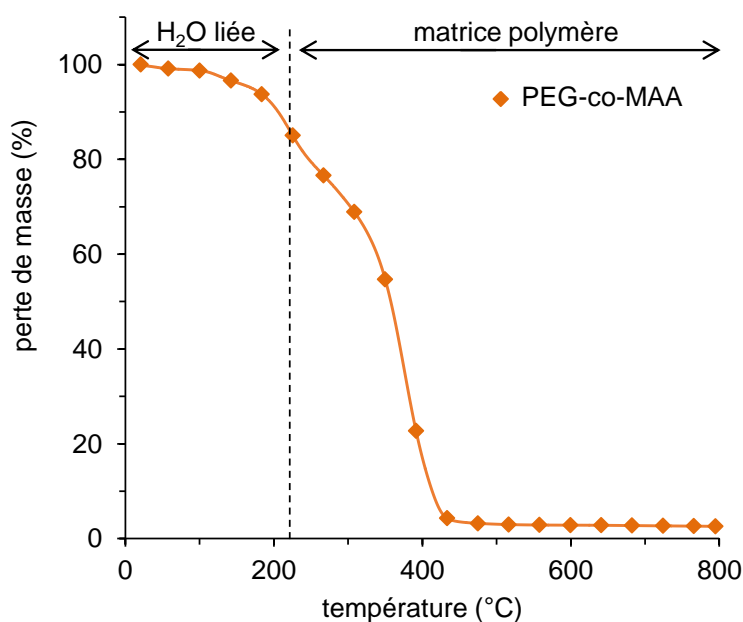


Figure 29. Analyse thermogravimétrique ($N_{2(g)}$; $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) des nanogels PEG-co-MAA.

2.2.5. Étude des transitions thermiques et des températures T_g , T_c et T_f

La caractérisation thermique de la matrice polymère des nanogels PEG-co-MAA secs et gonflés dans l'eau a été effectuée par calorimétrie différentielle à balayage (DSC, Differential Scanning Calorimetry). Les analyses ont été effectuées avec des appareils DSC Q20 et DSC Q2000 (TA Instruments), étalonnés préalablement avec de l'indium ($T_f = 156\text{ °C}$) et du zinc ($T_f = 420\text{ °C}$), pour l'analyse des nanogels secs et gonflés en dispersion.

Protocole : Pour l'analyse des nanogels *secs*, un volume de la dispersion de PEG-co-MAA est séché préalablement à l'étuve à 70 °C pendant 24 h. Puis, 2,2 mg du polymère sec sont placés dans une capsule en aluminium. Un cycle chauffage-refroidissement-chauffage est effectué, avec une rampe de température de 20 à 200 °C , à une vitesse de 20 °C.min^{-1} et sous atmosphère inerte ($N_{2(g)}$). Pour l'analyse des nanogels *gonflés dans l'eau*, 20 mg de la dispersion des nanogels contenant $6,5 \cdot 10^{-5}$ g de nanogels, sont placés dans une capsule en aluminium. Puis un chauffage de 20 à 60 °C à 3 °C.min^{-1} est effectué.

Le traitement des courbes de DSC est effectué avec le logiciel TA Universal Analysis. Comme observé Figure 30a, les nanogels PEG-co-MAA *secs* présentent trois transitions thermiques : une température de transition vitreuse $T_g = 64\text{ °C}$ correspondant au passage d'un état vitreux à un état liquide surfondu lors du chauffage de la phase amorphe des polymères; une température de cristallisation $T_c = 119,8\text{ °C}$ avec une enthalpie de cristallisation $\Delta_c H = 70,0\text{ J.g}^{-1}$ qui correspond à une cristallisation partielle après refroidissement rapide du polymère fondu ; et une température de fusion $T_f = 169,5\text{ °C}$ avec une enthalpie de fusion de $\Delta_f H = 7,7\text{ J.g}^{-1}$. Par ailleurs, lorsque les nanogels PEG-co-MAA sont en dispersion dans l'eau, ils présentent une quatrième transition thermique, correspondant à la VPTT. Classiquement, la mesure de la VPTT est effectuée par DLS (Cf. § 4.1) mais elle peut également être estimée par DSC. D'après l'analyse de la courbe DSC de la Figure 30b, ces nanogels ont une VPTT de 36 °C et l'énergie nécessaire pour atteindre cette transition est de $\Delta H = 10,3\text{ J.g}^{-1}$. Cette valeur est légèrement supérieure à celle mesurée par DLS (VPTT = 30 °C).

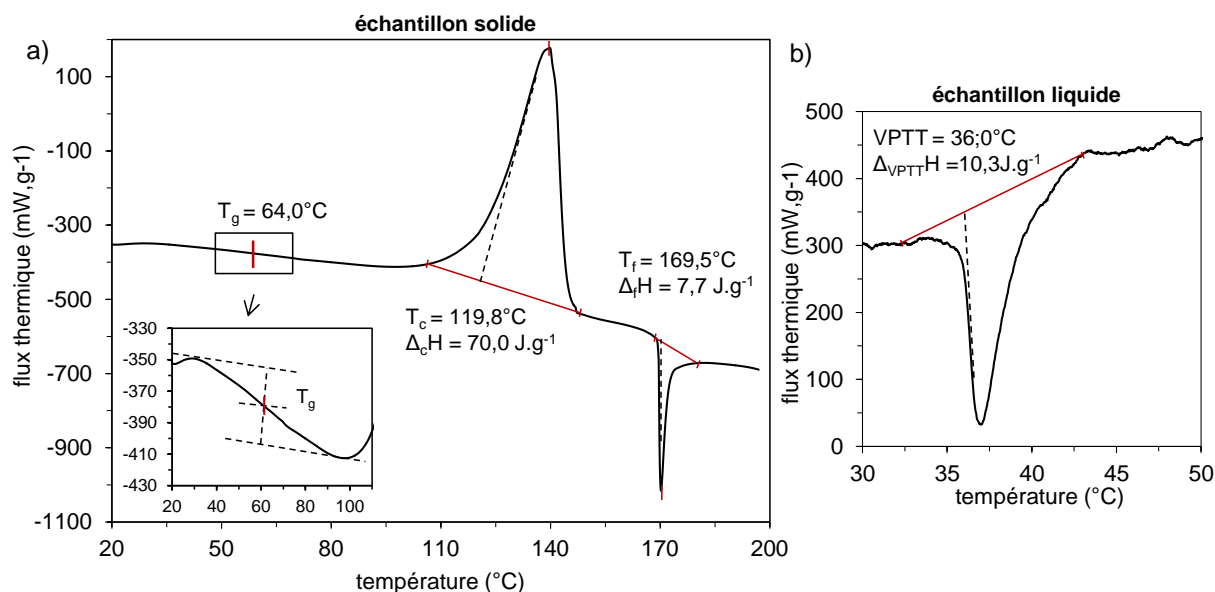


Figure 30. Analyse thermique des nanogels PEG-co-MAA (a) séchés à l'étuve à 70°C pendant 24 h (échantillon solide) et (b) gonflés en dispersion dans l'eau (échantillon liquide). Les courbes sont mesurées par DSC.

2.2.6. Fonctionnalisation des nanogels

- **Mise en évidence des fonctions par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier**

La composition chimique des nanogels et notamment leur fonctionnalisation avec des groupements carboxyliques ($-\text{COOH}/-\text{COO}^-$), époxydes ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) ou thiols ($-\text{SH}$) est vérifiée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) avec un spectromètre Bruker Tensor 27 entre 4000 et 400 cm^{-1} , avec une résolution de 4 cm^{-1} . Les échantillons sont analysés sous forme de pastilles de KBr et les spectres IR obtenus sont analysés avec le logiciel OPUS.

La Figure 31 montre les spectres FT-IR des (a) nanogels simples fonctionnalisés avec $-\text{MAA}$; $-\text{GMA}$ et $-\text{SH}$, ainsi que les (b) nanogels cœur@coquille. Sur la Figure 31a, les valeurs des bandes correspondantes aux trois spectres sont notées en noir, et celles appartenant spécifiquement à un spectre sont notées de la même couleur que le graphe : rouge pour les nanogels fonctionnalisés avec de l'acide méthacrylique ; bleu pour la fonctionnalisation avec du glycidyl méthacrylate et vert pour ceux fonctionnalisés avec du 1,4-dithiothreitol. On constate qu'il existe une bande de 1033 à 1217 cm^{-1} qui peut être attribuée à la vibration d'élongation des $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ provenant des chaînes des polymères-OEGMAs. Les deux bandes 388 et 754 cm^{-1} peuvent être attribuées aux vibrations des groupes $-\text{CH}_3$. Le pic à 1727 cm^{-1} montre les vibrations d'élongation des groupements $\text{C}=\text{O}$

provenant soit des monomères-OEGMAs pour tous les nanogels, soit de l'acide méthacrylique dans le cas des nanogels PEG-co-MAA. La bande à 1454 cm^{-1} est due aux vibrations de déformation des liaisons C–H des groupements $-\text{CH}_3$. Les deux bandes 2921 et 2853 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation de $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2$ respectivement. En outre, la bande de faible intensité à 1636 cm^{-1} et la bande large à 3433 cm^{-1} peuvent être attribuées respectivement à la vibration de déformation et d'élongation des groupes $-\text{OH}$ présents dans les chaînes de polymère, provenant de l'eau physisorbée ou de l'acide méthacrylique pour PEG-co-MAA²¹. Pour les nanogels PEG-co-SH, une très faible bande est observée à 2354 cm^{-1} , correspondant aux vibrations d'élongation des groupements $-\text{SH}$ ²². Pour les nanogels PEG-co-GMA, la bande de 1247 à 1267 cm^{-1} correspond à la liaison C–O–C des groupements époxydes provenant du glycidyl méthacrylate et le pic à 1156 cm^{-1} est dû aux vibrations d'élongation de l'éther cyclique.

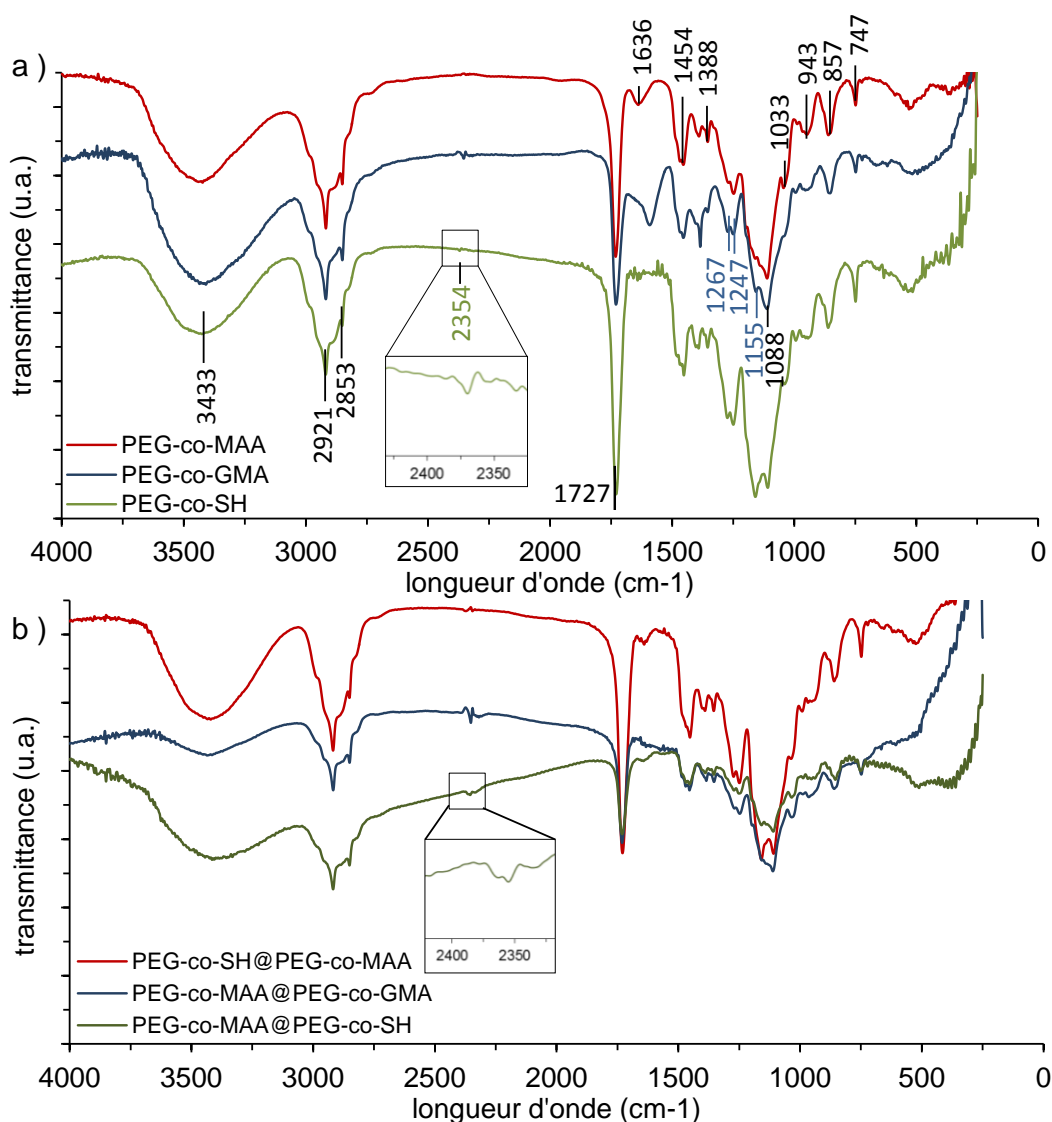


Figure 31. Spectres FT-IR des nanogels (a) à structure simple et (b) en coeur@coquille.

- **Estimation de la concentration en fonctions carboxyliques dans les nanogels**

La concentration molaire des fonctions carboxyliques (–COOH) par nanogel, le degré d’ionisation des fonctions –COOH (α), ainsi que la constante d’acidité (pKa) ont été mesurés par des dosages conductimétrique et potentiométrique (acido-basique) de l’acide méthacrylique présent dans la matrice polymère en suivant le protocole décrit par T. Hoare et R. Pelton²³. Pour cela, une solution fraîche d’hydroxyde de sodium ($[NaOH] = 6 \text{ mM}$) a été utilisée pour le dosage des groupements –COOH contenus dans 10 mL de la solution de PEG-co-MAA nanogels ($[nanogel] = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$). Préalablement aux dosages, les fonctions acides carboxyliques ont été complètement protonées par ajout de quelques gouttes d’une solution d’acide chlorhydrique à 0,1 M jusqu’à ce que le pH de la solution des nanogels soit inférieur à 2,5. La concentration molaire des fonctions –COOH par gramme de nanogels ($\text{mmol COOH.g}^{-1} \text{ nanogels}$), α et le pKa ont été calculés à l’aide des équations ci-dessous :

$$[COOH] = \frac{[NaOH]_{titrant} \times (V_{eq2} - V_{eq1})}{m_{nanogels}} \quad \text{Eq. 10}$$

$$\alpha_{(25^\circ C)} = \frac{[COO^-Na^+]}{[COO^-Na^+] + [COOH]} = \frac{V_{NaOH} - V_{eq1}}{V_{eq2} - V_{eq1}} \quad \text{Eq. 11}$$

$$pKa = pH - \log \left(\frac{\alpha_{(25^\circ C)}}{1 - \alpha_{(25^\circ C)}} \right) = pK_0 + \frac{1}{\ln(10)} \cdot \frac{dG_{el}}{RTd\alpha} \quad \text{Eq. 12}$$

où V_{eq1} et V_{eq2} correspondent respectivement aux volumes de NaOH ajouté pour neutraliser l’excès de HCl et réagir avec les groupements –COOH. V_{NaOH} est le volume de NaOH ajouté pour un pH donné, pK_0 est la constante de dissociation intrinsèque indépendante de α , R est la constante universelle des gaz parfaits, T est la température absolue et G_{el} est l’énergie de Gibbs électrostatique. pK_0 est estimé en extrapolant la courbe $\alpha = f(\text{pH})$ lorsque α est égale à zéro²⁴. Les courbes correspondant aux dosages conductimétrique et potentiométrique (pH-métrique) sont données Figure 32.

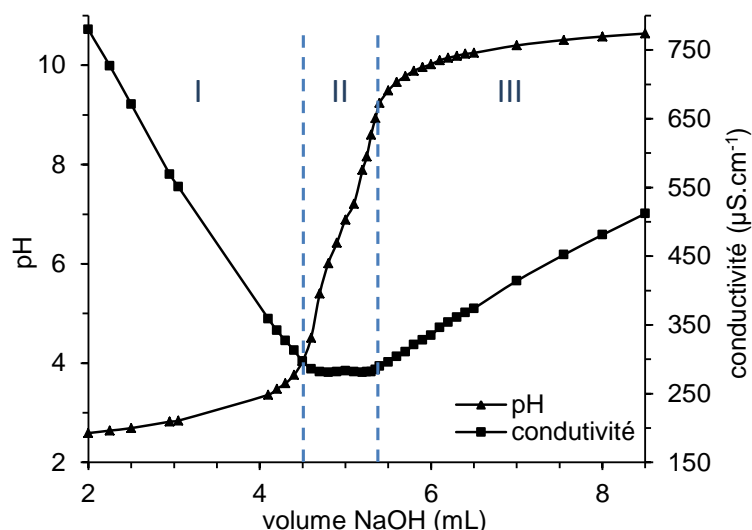


Figure 32. Courbes de dosage pH-métrique et conductimétrique des groupements carboxyliques ($-\text{COOH}$) contenus dans les nanogels PEG-co-MAA.

Sur la courbe de conductivité (Figure 32), on distingue trois zones : la zone I correspond à la neutralisation des ions H^+ en excès, provenant de la solution d'acide chlorhydrique HCl par des ions OH^- . La zone II correspond à la déprotonation des groupements carboxyliques par les ions OH^- . Enfin, la zone III met en évidence l'excès d'ions OH^- , d'où l'augmentation de la conductivité de la solution. D'après l'équation 8, la concentration en fonction de $-\text{COOH}$ est de $0,38 \text{ mmol.g}^{-1}$ nanogels. La quantité de groupements $-\text{COOH}$ initialement introduite dans le ballon réactionnel est de $0,438 \text{ mmol}$ par gramme de monomère, ainsi le pourcentage de MAA co-polymerisé, en comparaison avec la quantité initiale de COOH , est de 86,8%. Par ailleurs, le degré d'ionisation α et la constante de dissociation acide pK_a ont été calculés à l'aide des équations 12 et 13. Les courbes α versus pH et pK_a versus α sont tracées Figure 33.

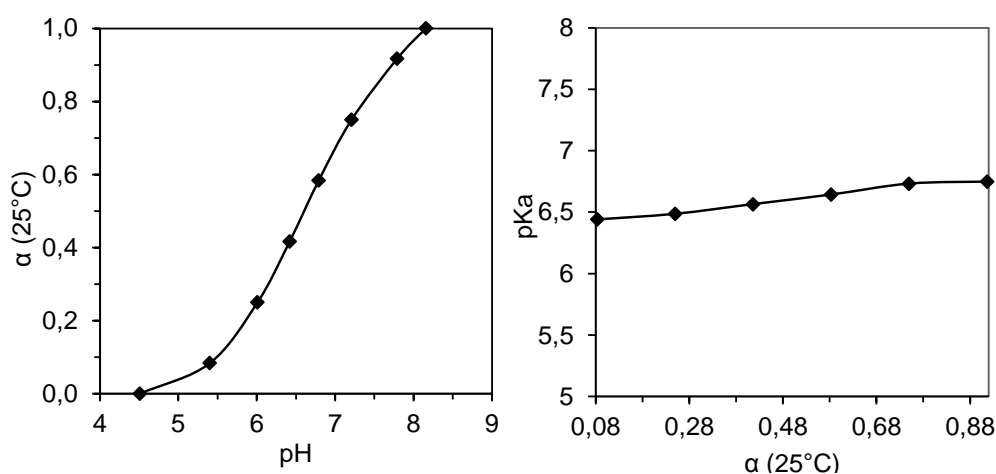


Figure 33. a) Degré d'ionisation α des groupements $-\text{COOH}$ dans les nanogels PEG-co-MAA en fonction du pH et b) pK_a des groupements $-\text{COOH}$ en fonction de α à 25°C .

La constante de dissociation intrinsèque des nanogels (pK_0) est estimée par extrapolation de la courbe α en fonction du pH lorsque α est égale à zéro (Figure 33a)^{24,25}. Cette valeur ($pK_0 = 4,5$) est proche de la valeur du pK_0 de l'acide poly(méthacrylique) linéaire ($pK_0 = 4,65$). Il est connu que l'évolution du pK_a en fonction de α est corrélée à la distribution de charges dans la matrice polymère (Figure 33b)²⁴. Pour les nanogels PEG-co-MAA, la valeur du pK_a en fonction de α reste presque constante, autour de 6,4 – 6,8. Ceci permet de dire que les groupements carboxyliques sont distribués de manière homogène à l'intérieur des nanogels et sont éloignés les uns des autres.

3. Paramètres expérimentaux influençant les propriétés physico-chimiques des nanogels

Plusieurs paramètres peuvent faire varier les propriétés physico-chimiques des nanogels finaux : la nature chimique et la quantité initiale du co-monomère, du réticulant, du tensioactif. Tout d'abord, pour pouvoir synthétiser des nanogels monodisperses par polymérisation radicalaire par précipitation, la masse totale initiale des réactifs ajoutés dans le ballon réactionnel doit être très faible (de l'ordre de 1 à 2% maximum)^{26,27}. En effet pour une masse totale de réactifs supérieure à 2%, les nanogels vont précipiter, s'agréger et former des nœuds de réticulation inter-particulaires²⁸. Par ailleurs, la nature du monomère et des co-monomères utilisés dans la synthèse est directement liée au caractère hydrophile/hydrophobe, à la charge des nanogels et à la VPTT. L'ajout de co-monomères hydrophiles déplace la VPTT vers de plus hautes températures⁶. L'ajout de co-monomères chargés (cationiques ou anioniques) va stabiliser fortement le nucléi et réduire le diamètre final des nanogels²⁹. En ce qui concerne le réticulant, il ne doit pas excéder une fraction molaire de 15% par rapport aux monomères afin de limiter les phénomènes de réticulation interparticulaires lors de la polymérisation. En outre, la capacité des nanogels à gonfler, et donc le taux de gonflement est directement relié à la quantité de réticulant utilisé lors de la synthèse. La Figure 34 montre l'évolution du diamètre hydrodynamique en fonction de la température de deux nanogels synthétisés avec deux taux de réticulant différent : 0,5 et 3,9%mol d'OEGDA₂₅₀. Il est constaté que les nanogels ayant le plus faible taux de réticulation vont gonfler plus, avec un taux de gonflement atteignant 1,70 et 8,15 respectivement pour les nanogels contenant 0,5 et 3,9%mol d'OEGDA₂₅₀. À faible taux de réticulant, les nanogels sont très déformables, et la variation du volume entre l'état gonflé et

dégonflé est importante. Les nanogels sont dits *mous*. À contrario, lorsque le taux de réticulation est élevé, les nanogels sont dit *durs*, car ils sont de moins en moins déformables et leur capacité à gonfler-dégonfler est réduite (Figure 34). Les propriétés physico-chimiques de ces nanogels sont proches de celles des nanoparticules inorganiques dures.

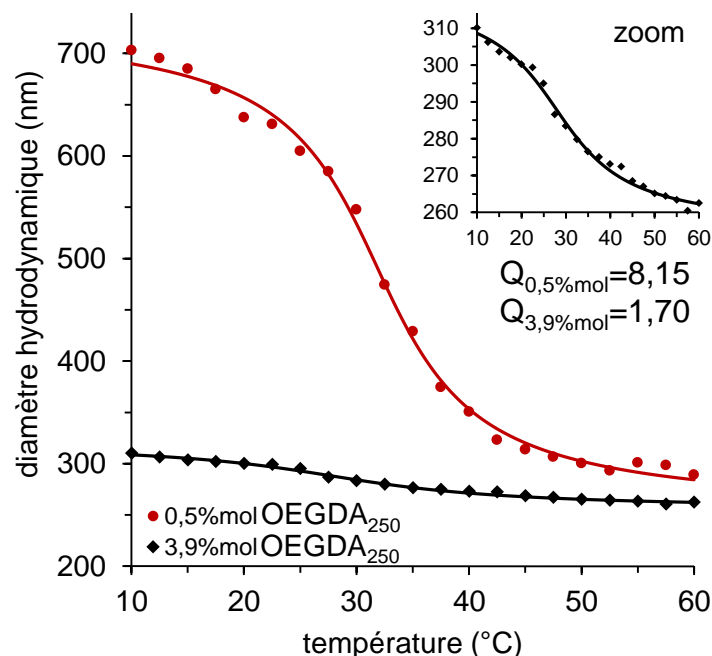


Figure 34. Diamètre hydrodynamique (d_h) en fonction de la température de deux nanogels synthétisés avec un taux de réticulant différent : 0,5 et 3,9%mol d'OEGDA₂₅₀. Les courbes ont été mesurées par DLS. Les données expérimentales (points) sont modélisées par la méthode des moindres carrés avec une fonction de type arc tangente (lignes), telle que $y = a*(1-\arctan[d.x-b])+c$.

Par ailleurs, l'ajout de tensioactif au début de la copolymérisation radicalaire par précipitation permet de diminuer la taille des nanogels^{30,31}. Ainsi, en faisant varier la masse initiale de dodécylsulfate de sodium (SDS) dans le milieu réactionnel (de 0 à 19,1 mg), on obtient des nanogels PEG-co-MAA, dont le diamètre hydrodynamique varie inversement à la concentration en tensioactif, de 417 nm à 202 nm à 25 °C dans l'eau, comme illustré Figure 35a. Pour les nanogels synthétisés sans tensioactif (PEG-co-MAA), le diamètre hydrodynamique est légèrement plus grand lorsqu'il est mesuré juste après la fin de la polymérisation (avant purification par dialyse) comparé au diamètre après purification (Figure 35b).

Par contre, lorsque les nanogels sont synthétisés en présence de tensioactif (SDS), l'effet contraire est observé. Plus la quantité de SDS ajoutée lors de la polymérisation augmente, plus la dispersion des nanogels finaux est translucide, et la couleur vire du blanc-opaque au blanc-bleuâtre.

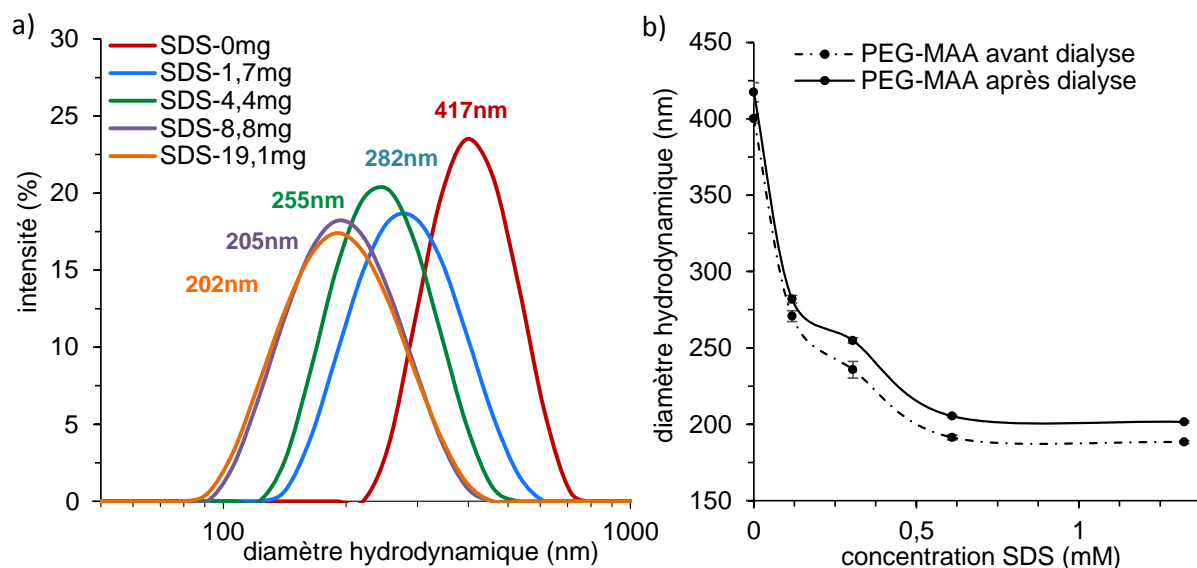


Figure 35. (a) Diamètre hydrodynamique (d_h) des nanogels PEG-co-MAA synthétisés avec différentes concentrations de tensioactif SDS (de 0 à 19,1 mg) à 25 °C dans l'eau et (b) d_h en fonction de la concentration de tensioactif SDS avant et après purification des nanogels par dialyse.

4. Effet de la température et du pH

4.1. Effet de la température

Les nanogels dérivés des monomères-OEGMAs sont thermosensibles. Étant donné que cette propriété peut varier en fonction de la concentration en nanogels de la dispersion, toutes les mesures en DLS ont été effectuées avec des échantillons très dilués (concentration massique des dispersions = 0,1% m dans l'eau).

L'évolution du diamètre hydrodynamique (d_h) en fonction de la température des nanogels PEG-Co-MAA a été analysée par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les données expérimentales (points) de la Figure 36 ont été modélisées avec une fonction de type arc tangente (lignes continues), telle que $y = a \cdot (1 - \arctan(d \cdot x - b)) + c$. Les valeurs a , b , c et d ont été déterminées pour chaque courbe par la méthode des moindres carrés avec une fonction de type arc tangente. Le point d'inflexion de cette courbe (point où le graphe de la fonction coupe la tangente en ce point, et où la dérivée seconde s'annule) correspond à la température de transition de phase des nanogels (VPTT). Comme le montre la Figure 36a, les nanogels PEG-co-MAA présentent un comportement de type gonflement-dégonflement lorsque la température du milieu augmente, ils sont donc thermosensibles. En effet, le d_h diminue de

354 nm (à 10 °C) à 272 nm (à 60 °C) à pH 5,5; et de 650 nm (à 10 °C) à 422 nm (à 60 °C) à pH 7,5.

Lorsque la température est en-dessous de la VPTT, la dispersion des nanogels est blanche et légèrement opaque, alors que pour $T > VPTT$, la dispersion devient trouble et beaucoup plus opaque. Ceci est dû à une augmentation de l'indice de réfraction des nanogels (n_{nanogels}) lorsque la température du milieu augmente, comme démontré précédemment. À $T = 25\text{ °C} < VPTT$, les nanogels sont composés de 96% d'eau et uniquement de 4% de polymères, les chaînes de polymère sont hydrophiles et forment des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau provoquant le gonflement des nanogels. De même les interactions attractives de Van der Waals entre les particules colloïdales sont négligeables. Cependant, lorsque la température augmente à $T > VPTT$, les liaisons hydrogènes sont détruites et les interactions hydrophobes des chaînes de polymères deviennent plus importantes, provoquant le dégonflement des nanogels et donc l'expulsion de l'eau contenue dans la matrice polymère. La VPTT des nanogels PEG – MAA est de 30 °C à pH 5,5 et de 54 °C à pH 7,5. De manière corrélée, on peut voir Figure 36b que le potentiel zéta est à 0,9 mV à pH \approx 2,0 et devient très négatif (-48,5 mV) à pH $>$ 8,0.

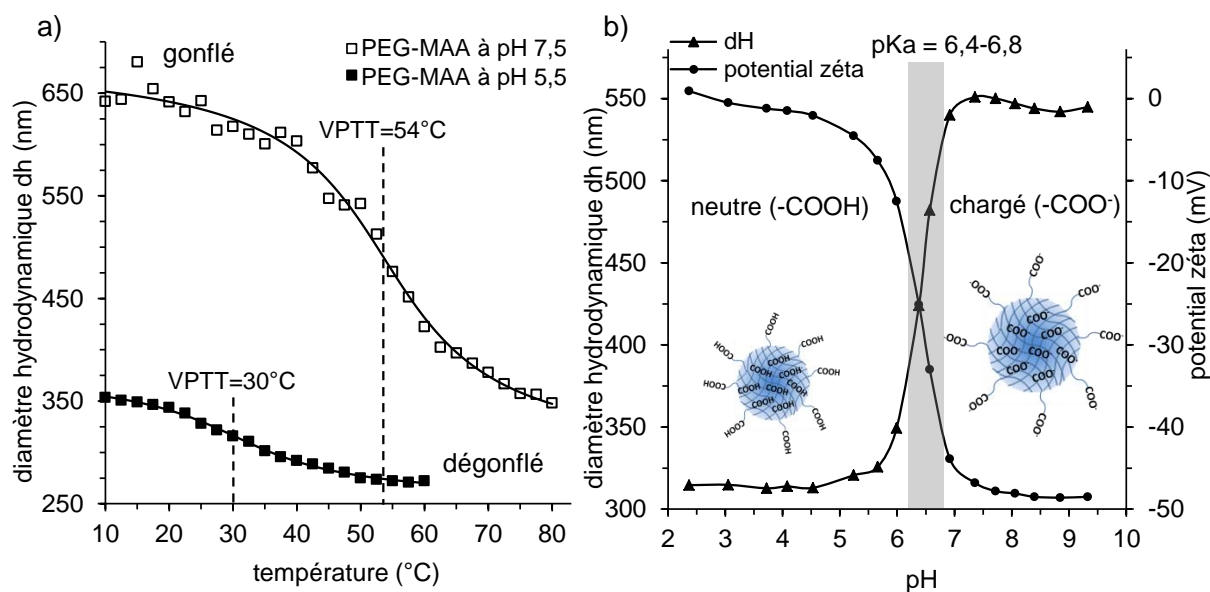


Figure 36. (a) Le diamètre hydrodynamique (d_h) en fonction de la température ; ainsi que (b) le d_h et le potentiel zéta (ζ) des nanogels en fonction du pH, mesurés par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

4.1.1. Taux de gonflement

Le taux de gonflements (Q) de chaque lot de nanogels a été calculé avec l'équation suivante :

$$Q = \frac{V_{\text{nanogels gonflés}}}{V_{\text{nanogels dégonflés}}} = \frac{V_{d_h(25\text{ }^\circ\text{C})}}{V_{d_h(50\text{ }^\circ\text{C})}} \quad \text{Eq. 13}$$

avec $V_{d_h(25\text{ }^\circ\text{C})}$, $V_{d_h(50\text{ }^\circ\text{C})}$ le volume des nanogels respectivement à 25 °C et 50 °C. En supposant que les nanogels sont des sphères de rayon hydrodynamique r_h , alors $V = \frac{4 \times \pi \times (r_h)^3}{3}$. Pour le calcul de Q, il est considéré que les nanogels sont sphériques. Comme expliqué précédemment, la valeur de Q dépend du degré de réticulation de la matrice polymère et est directement liée à la quantité d'eau contenue dans les nanogels à l'état gonflé. Ici, tous les nanogels possèdent le même taux de réticulation (3,9% mol par rapport à $(\text{MEO}_2\text{MA} + \text{OEGMA}_{500}) = 3,66 \text{ mmol}$ (100%). En faisant varier le pH du milieu de 5,5 à 7,5, le taux de réticulation des nanogels PEG-co-MAA reste constant ($Q = 1,7$). Le caractère thermosensible des nanogels est également observée par cryo-TEM (Figure 37). Le diamètre physique moyen diminue de 372 à 343 nm en chauffant de 25 à 50 °C ($\Delta d_{\text{moy}} = 29 \text{ nm}$). Cette variation est plus faible que celle observée par DLS ($\Delta d_{\text{moy}} = 82 \text{ nm}$). La DLS mesure la diminution du diamètre hydrodynamique d_h , de ce fait la diminution de la valeur prend en compte la diminution du volume de la matrice polymère, ainsi que la diminution de la double couche de solvation car les chaînes de polymère deviennent hydrophobes à $T > VPTT$. La différence de diamètre est plus faible que celle observée en DLS, ce qui peut s'expliquer par une transition de phase très rapide des nanogels, plus rapide que le temps d'expérience.

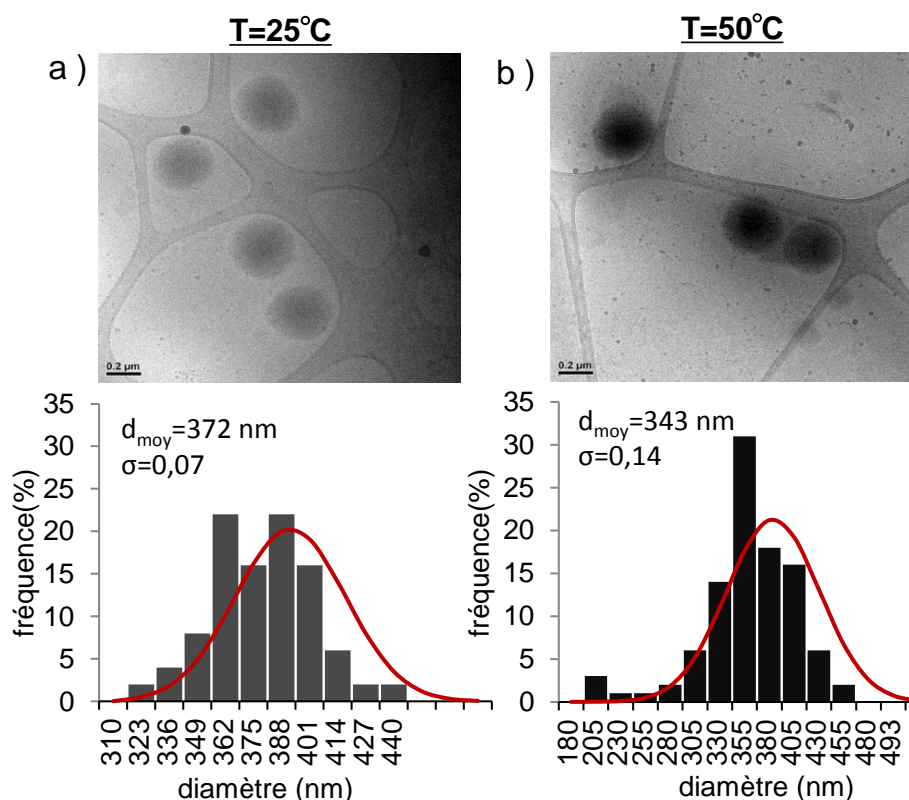


Figure 37. Diamètre moyen (d_{moy}) des nanogels PEG-co-MAA à 25 °C et 50 °C visualisé par cryo-TEM ($\Delta d \approx 30\text{ nm}$). Pour atteindre la température de 50 °C, l'échantillon a été placé dans une étuve (chauffage macroscopique). Erreur-type basé en $n = 80$ particules.

4.2. Effet du pH

La présence de groupements carboxyliques ($-\text{COOH}$), provenant du co-monomère acide méthacrylique, confère aux nanogels un caractère pH-sensible. La Figure 36b montre l'évolution du diamètre hydrodynamique (d_h) en fonction du pH. Le d_h augmente lorsque le pH augmente, de 315 nm à pH 2,0 jusqu'à 545 nm à pH 9,0. Lorsque $\text{pH} < 6,5$ (pK_a), la plupart des groupements carboxyliques sont non-dissociés ($-\text{COOH}$), et donc les nanogels sont très faiblement chargés négativement et se comportent comme des particules neutres. Dans ce cas, le d_h varie uniquement en fonction de la température. Par contre, lorsque $\text{pH} > 6,5$, les groupements carboxyliques sont dissociés ($-\text{COO}^-$), les nanogels sont chargés négativement et complètement gonflés grâce aux répulsions électrostatiques entre les chaînes polymères. Dans ce cas, le gonflement des nanogels est dominé par les contributions ioniques, et donc par le pH, principalement par la forte répulsion électrostatique entre les groupements ioniques qui sont proches entre eux. Les principales caractéristiques des nanogels PEG-co-MAA sont données Tableau 9.

Tableau 9. Principales caractéristiques des nanogels PEG-co-MAA.

	pH 5,5	pH 7,5
d_h à 25°C (nm) (PDI)	328 (0,021)	643 (0,087)
d_h à 50°C (nm) (PDI)	275 (0,037)	542 (0,078)
Q	1,70	1,66
ζ (mv)	-35,43	-12,67
VPTT (°C)	30,31	53,54

Conclusion

Les nanogels sont des particules colloïdales constituées d'un réseau tridimensionnel de polymères réticulés gonflés dans un solvant, possédant un diamètre compris entre 0,1 et 1 μm^{1-4} . Nous avons synthétisé des nanogels simples, fluorescents ou à structure cœur@coquille, à base de monomères en oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs) et de l'acide méthacrylique (MAA) par copolymérisation radicalaire par précipitation dans l'eau. Les monomères-OEGMAs ont été choisis pour leur caractère biocompatible et thermosensible. Plusieurs paramètres peuvent faire varier les propriétés physico-chimiques des nanogels finaux, notamment la nature chimique et la quantité initiale de monomères et co-monomères, de réticulant et de tensioactif.

Les nanogels élaborés par cette méthode sont sphériques et très monodisperses, avec un diamètre hydrodynamique (d_h) de 328 nm (PDI = 0,16). Ils sont chargés négativement dans l'eau distillée (pH 5,5 ; $\zeta = -35,4$ mV), et forment des dispersions stables. À 25 °C, les nanogels sont dans un état gonflé et sont composés principalement d'eau (96% d'eau et 4% de polymère). Les chaînes de polymère sont hydrophiles et forment des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau provoquant le gonflement des nanogels. Les nanogels sont thermosensibles, via les monomères-OEGMAs et sensibles au pH, via les groupements carboxyliques provenant du co-monomère MAA. Ainsi, lorsque la température augmente au-dessus de leur température de transition de phase (VPTT), les liaisons hydrogènes sont détruites, la matrice de polymère se contracte en expulsant l'eau contenue à l'intérieur et le diamètre des nanogels diminue. À pH 5,5, le d_h diminue de 328 à 275 nm lorsque la température augmente de 25 à 50 °C, avec une VPTT de 30 °C. Par ailleurs, le d_h augmente lorsque le pH augmente, de 315 nm à pH 2,0 jusqu'à 545 nm à pH 9,0. Lorsque pH < 6,5 (pKa), la plupart de groupements carboxyliques sont non-dissociés ($-\text{COOH}$), et donc les nanogels sont très faiblement chargés négativement. Par contre, lorsque pH > 6,5, les groupements carboxyliques sont dissociés ($-\text{COO}^-$), les nanogels sont chargés négativement et complètement gonflés grâce aux répulsions électrostatiques entre les chaînes polymères. À pH 7,5, le d_h diminue de 643 à 542 nm lorsque la température augmente de 25 à 50 °C ; et la VPTT est de 54 °C.

Grâce à leur capacité à encapsuler et à libérer des grandes quantités d'eau, ainsi qu'à leur caractère pH et thermosensible, les nanogels-OEGMAs offrent des avantages uniques

pour la nanomédecine, et notamment pour l'encapsulation et la libération contrôlée de molécules². Ces nanogels serviront de base pour la synthèse de nouveaux nanogels hybrides magnétiques, plasmoniques et magnéto-plasmoniques, afin de pouvoir déclencher à distance la libération des molécules lors de l'application d'un stimulus externe tel qu'un champ magnétique alternatif (AMF) et/ou une irradiation proche infrarouge (Chapitre III et IV).

Références

- (1) Baker, W. O. Microgel, A New Macromolecule. *Ind. Eng. Chem.* **1949**, *41* (3), 511–520.
- (2) Oh, J. K.; Drumright, R.; Siegwart, D. J.; Matyjaszewski, K. The Development of Microgels/Nanogels for Drug Delivery Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33* (4), 448–477.
- (3) Zha, L.; Banik, B.; Alexis, F. Stimulus Responsive Nanogels for Drug Delivery. *Soft Matter* **2011**, *7* (13), 5908–5916.
- (4) Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V. Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48* (30), 5418–5429.
- (5) Lutz, J.-F.; Andrieu, J.; Üzgün, S.; Rudolph, C.; Agarwal, S. Biocompatible, Thermoresponsive, and Biodegradable: Simple Preparation of “All-in-One” Biorelevant Polymers. *Macromolecules* **2007**, *40* (24), 8540–8543.
- (6) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470.
- (7) Lutz, J.-F.; Hoth, A. Preparation of Ideal PEG Analogues with a Tunable Thermosensitivity by Controlled Radical Copolymerization of 2-(2-Methoxyethoxy)Ethyl Methacrylate and Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylate. *Macromolecules* **2006**, *39* (2), 893–896.
- (8) Lutz, J.-F. Thermo-Switchable Materials Prepared Using the OEGMA-Platform. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (19), 2237–2243.
- (9) Cai, T.; Marquez, M.; Hu, Z. Monodisperse Thermoresponsive Microgels of Poly(Ethylene Glycol) Analogue-Based Biopolymers. *Langmuir* **2007**, *23* (17), 8663–8666.
- (10) Hu, Z.; Cai, T.; Chi, C. Thermoresponsive Oligo(Ethylene Glycol)-Methacrylate- Based Polymers and Microgels. *Soft Matter* **2010**, *6* (10), 2115–2123.
- (11) Yang, H.; Wang, Q.; Chen, W.; Zhao, Y.; Yong, T.; Gan, L.; Xu, H.; Yang, X. Hydrophilicity/Hydrophobicity Reversible and Redox-Sensitive Nanogels for Anticancer Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (5), 1636–1647.
- (12) Suzuki, D.; Kawaguchi, H. Modification of Gold Nanoparticle Composite Nanostructures Using Thermosensitive Core–Shell Particles as a Template. *Langmuir* **2005**, *21* (18), 8175–8179.
- (13) Suzuki, D.; Kawaguchi, H. Stimuli-Sensitive Core/Shell Template Particles for Immobilizing Inorganic Nanoparticles in the Core. *Colloid Polym. Sci.* **2006**, *284* (12), 1443–1451.
- (14) Suzuki, D.; Kawaguchi, H. Hybrid Microgels with Reversibly Changeable Multiple Brilliant Color. *Langmuir* **2006**, *22* (8), 3818–3822.
- (15) Stuparu, M. C.; Khan, A. Thiol-Epoxy “Click” Chemistry: Application in Preparation and Postpolymerization Modification of Polymers. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2016**, *54* (19), 3057–3070.
- (16) Battista, E.; Mazzarotta, A.; Causa, F.; Cusano, A. M.; Netti, P. A. Core–Shell Microgels with Controlled Structural Properties. *Polym. Int.* **2016**, *65* (7), 747–755.
- (17) Rauh, A.; Honold, T.; Karg, M. Seeded Precipitation Polymerization for the Synthesis of Gold-Hydrogel Core-Shell Particles: The Role of Surface Functionalization and Seed Concentration. *Colloid Polym. Sci.* **2016**, *294* (1), 37–47.

- (18) Wei, G.; Zhao, C.; Hollingsworth, J.; Zhou, Z.; Jin, F.; Zhang, Z.; Cheng, H.; Han, C. C. Mechanism of Two-Dimensional Crystal Formation from Soft Microgel Particles. *Soft Matter* **2013**, *9* (41), 9924–9930.
- (19) Lele, A. K.; Hirve, M. M.; Badiger, M. V.; Mashelkar, R. A. Predictions of Bound Water Content in Poly(N-Isopropylacrylamide) Gel. *Macromolecules* **1997**, *30* (1), 157–159.
- (20) Thompson, S.; Stukel, J.; AlNiemi, A.; Willits, R. K. Characteristics of Precipitation-Formed Polyethylene Glycol Microgels Are Controlled by Molecular Weight of Reactants. *J. Vis. Exp. JoVE* **2013**, No. 82.
- (21) Duan, G.; Zhang, C.; Li, A.; Yang, X.; Lu, L.; Wang, X. Preparation and Characterization of Mesoporous Zirconia Made by Using a Poly (Methyl Methacrylate) Template. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3* (3), 118.
- (22) Shi, S.; Wang, Q.; Wang, T.; Ren, S.; Gao, Y.; Wang, N. Thermo-, PH-, and Light-Responsive Poly(N-Isopropylacrylamide-Co-Methacrylic Acid)–Au Hybrid Microgels Prepared by the in Situ Reduction Method Based on Au-Thiol Chemistry. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (25), 7177–7186.
- (23) Hoare, T.; Pelton, R. Functional Group Distributions in Carboxylic Acid Containing Poly(N -Isopropylacrylamide) Microgels. *Langmuir* **2004**, *20* (6), 2123–2133.
- (24) Hoare, T.; Pelton, R. Titrametric Characterization of PH-Induced Phase Transitions in Functionalized Microgels. *Langmuir* **2006**, *22* (17), 7342–7350.
- (25) Borukhov, I.; Andelman, D.; Borrega, R.; Cloitre, M.; Leibler, L.; Orland, H. Polyelectrolyte Titration: Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (47), 11027–11034.
- (26) Imaz, A.; Forcada, J. N -Vinylcaprolactam-Based Microgels: Synthesis and Characterization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (7), 2510–2524.
- (27) Pelton, R. H.; Chibante, P. Preparation of Aqueous Latices with N-Isopropylacrylamide. *Colloids Surf.* **1986**, *20* (3), 247–256.
- (28) Gao, J.; Frisken, B. J. Cross-Linker-Free N-Isopropylacrylamide Gel Nanospheres. *Langmuir* **2003**, *19* (13), 5212–5216.
- (29) Meunier, F.; Elaïssari, A.; Pichot, C. Preparation and Characterization of Cationic Poly(n-Isopropylacrylamide) Copolymer Latexes. *Polym. Adv. Technol.* **1995**, *6* (7), 489–496.
- (30) Wu, X.; Pelton, R. H.; Hamielec, A. E.; Woods, D. R.; McPhee, W. The Kinetics of Poly(N-Isopropylacrylamide) Microgel Latex Formation. *Colloid Polym. Sci.* **1994**, *272* (4), 467–477.
- (31) McPhee, W.; Tam, K. C.; Pelton, R. Poly(N-Isopropylacrylamide) Latices Prepared with Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *156* (1), 24–30.

CHAPITRE III

Les nanogels hybrides magnétiques à base d'oligo (éthylène glycol) méthyle éther méthacrylate

1. Les nanoparticules magnétiques	106
1.1 Matériel.....	106
1.2 Synthèse des NPMs	106
1.3 Tri en taille.....	108
1.4 Stabilité colloïdale des NPMs.....	110
1.5 Morphologie, taille et charge des NPMs	112
1.6 Structure cristallographique des NPMs	113
1.7 Propriétés magnétiques des NPMs	117
1.7.1 Propriétés d'hyperthermie magnétique	118
2. Les Nanogels magnétiques.....	121
2.1 Matériel.....	121
2.2 Synthèse des MagNanoGels	121
2.3 Synthèse des MagNanoGels fluorescents.....	123
2.4 Purification	123
2.5 Composition chimique des MagNanoGels	124
2.5.1 Dosage du fer dans les MagNanoGels	124
2.5.2 Estimation de la concentration massique des dispersions de MagNanoGels...	126
2.6 Morphologie et taille des MagNanoGels.....	127
3. Effet de la température et du pH sur les MagNanoGels.....	129
3.1 Effet de la température	129
3.2 Effet du pH	131
3.3 Effet du champ magnétique	132
3.3.1 Propriétés magnétiques	132
3.3.2 Propriétés d'hyperthermie magnétique	133
3.3.3 Influence du champ magnétique alternatif sur la taille des MagNanoGels.....	134
4. Libération contrôlée de doxorubicine encapsulée dans les MagNanoGels sous stimuli	138
4.1 Matériel.....	139
4.2 Encapsulation de doxorubicine dans les MagNanoGels.....	140
4.3 Libération de DOX des MagNanoGels par chauffage en bain thermostaté	143

4.4	Libération de DOX par diminution du pH.....	144
4.5	Libération de DOX par application d'un champ magnétique alternatif	145
4.6	Estimation de la température locale induite sous AMF.....	148
5.	Libération de DOX intracellulaire déclenchée sous AMF	149
5.1	Matériel.....	149
5.1.1	Culture cellulaire	150
5.1.2	Incubation et marquage des cellules.....	150
5.1.3	Quantification de la capture cellulaire	150
5.1.4	Tests de cytotoxicité.....	151
5.1.5	Application du champ magnétique alternatif	152
5.2	Etudes intracellulaires des MagNanoGels	152
5.2.1	Capture cellulaire et cytotoxicité des MagNanoGels et DOX-MagNanoGels.	152
5.2.2	Libération de DOX intracellulaire déclenchée à distance sous AMF	156
	Conclusion et Perspectives.....	160
	Références	162

CHAPITRE III :

Les nanogels hybrides magnétiques à base d'oligo (éthylène glycol) méthyle éther méthacrylate

Ce chapitre présente une étude approfondie des nanogels hybrides, magnétiques, pH-et thermosensibles (MagNanoGels) constitués d'un réseau polymère biocompatible en oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs) et de nanoparticules magnétiques (NPMs) d'oxyde de fer, également biocompatibles. Dans un premier temps, la synthèse et les principales caractérisations des NPMs et des MagNanoGels seront décrites. Puis, la réponse des MagNanoGels à plusieurs stimuli, tels que la température, le pH et différentes modalités de champ magnétique sera évaluée. Enfin, des études d'encapsulation et de libération de doxorubicine en solution (DOX) seront présentées, mettant en lumière la possibilité de déclencher la libération de DOX par hyperthermie magnétique locale sans élévation globale de la température. Enfin, les résultats des études de libération intracellulaire de la DOX, déclenchée sous AMF dans des cellules humaines PC-3 seront présentés.

1. Les nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules magnétiques (NPMs) à base d'oxyde de fer, telles que la magnétite Fe_3O_4 et la maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, sont de plus en plus utilisées pour des applications biomédicales, grâce à leurs propriétés superparamagnétiques, à leur biocompatibilité et à leur biodégradabilité. La magnétite, composée d'oxyde de Fe (II) et de Fe (III), est chimiquement instable dans le temps. Ainsi, le Fe (II) va s'oxyder lentement et de manière naturelle en Fe (III) jusqu'à former la maghémite. Pour la suite, nous nous intéressons uniquement aux nanoparticules de maghémite, composé le plus stable chimiquement. Ces particules peuvent être utilisées: (1) en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), (2) en tant que vecteurs de médicaments par guidage magnétique et (3) en tant que source de chaleur pour la destruction des cellules tumorales ou la délivrance de médicaments par hyperthermie magnétique. C'est cette dernière application qui sera étudiée dans ce chapitre.

1.1 Matériel

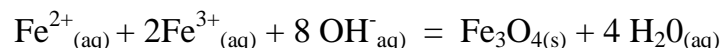
Du chlorure de fer (II) tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $M = 198,83 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ – VWR), du chlorure de fer (III) hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $M = 270,33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ – VWR), du nitrate de fer (III) nonahydrate ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; $M = 403,95 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ – VWR), une solution d'ammoniac (NH_3 , 20% – VWR), de l'acide nitrique (HNO_3 , 52,5% – VWR), de l'acide chlorhydrique (HCl , 37% – VWR), du diéthyle éther technique (VWR) et de l'acétone technique (VWR) ont été utilisés pour la synthèse de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

1.2 Synthèse des NPMs

Les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer, de type maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ont été synthétisées par co-précipitation de sels métalliques FeCl_2 et FeCl_3 dans l'eau selon le procédé Massart¹ schématisé sur la Figure 38. Cette synthèse est composée de plusieurs étapes détaillées ci-dessous :

Étape n°1 : Co-précipitation. Du FeCl_2 (180 g ; 0,91 mol) est dissous dans 500 mL d'eau distillée avec du HCl (37% ; 100 mL, 12 mol) dans un bécher de 5 L. Le mélange est agité jusqu'à dissolution complète de FeCl_2 . Puis, 715 mL de FeCl_3 (27% ; 0,71 mol) sont ajoutés au mélange précédent, correspondant à un ratio massique $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0,93$ et le volume est complété jusqu'à

3 L avec de l'eau distillée. Une solution aqueuse d'ammoniaque NH_3 (20% ; 1 L, 11,74 mol) est ajoutée rapidement au mélange sous agitation (800 tr.min^{-1}). Les nanoparticules de magnétite formées (Fe_3O_4) sont ensuite lavées par décantation magnétique sur des plaques de ferrite (au moins 10 min). Le précipité noir est dense en nanoparticules de magnétite.



Étape n°2 : Lavage du précipité avec de l'eau. Les nanoparticules de magnétite sont redispersées dans 1 L d'eau distillée et agitées pendant 10 min. Elles sont ensuite décantées magnétiquement (10 min) et le surnageant est aspiré.

Étape n°3 : Redispersion en milieu acide. Les nanoparticules sont ensuite redispersées dans une solution acide (dans 2 L contenant 360 mL d' HNO_3 (52,5%), plus de l'eau distillée) et agitées pendant 30 min. Puis, relavées par décantation magnétique (10 min) et le surnageant est aspiré.

Étape n°4 : Oxydation. Une étape d'oxydation rapide (par voie chimique) est réalisée en portant à ébullition du nitrate ferrique $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (323 g, 0,80 mol) dans 800 mL d'eau distillée. Cette solution bouillante est ajoutée à la dispersion acide de nanoparticules. L'ensemble est chauffé pendant 30 min à 80°C , puis le précipité est séparé du surnageant par décantation magnétique pendant 10 min. Un changement de couleur des particules, virant du noir au rouge-brun, est observé.

Étape n°5 : Redispersion en milieu acide. Les nanoparticules sont à nouveau redispersées dans un milieu acide comme détaillé dans l'étape n°3.

Étape n°6 : Lavage du précipité avec de l'acétone et de l'éther. Les nanoparticules sont lavées trois fois à l'acétone (3 x 1 L d'acétone + agitation 10 min + décantation magnétique + aspiration du surnageant) et deux fois à l'éther (2 x 500 mL d'éther + décantation magnétique + aspiration du surnageant) pour enlever les résidus de réaction.

Étape n°7 : Redispersion finale en milieu aqueux. Enfin, les nanoparticules sont redispersées dans 1 L d'eau distillée à pH inférieur à 3,0 (dispersion finale) et l'éther résiduel est éliminé par un léger chauffage.

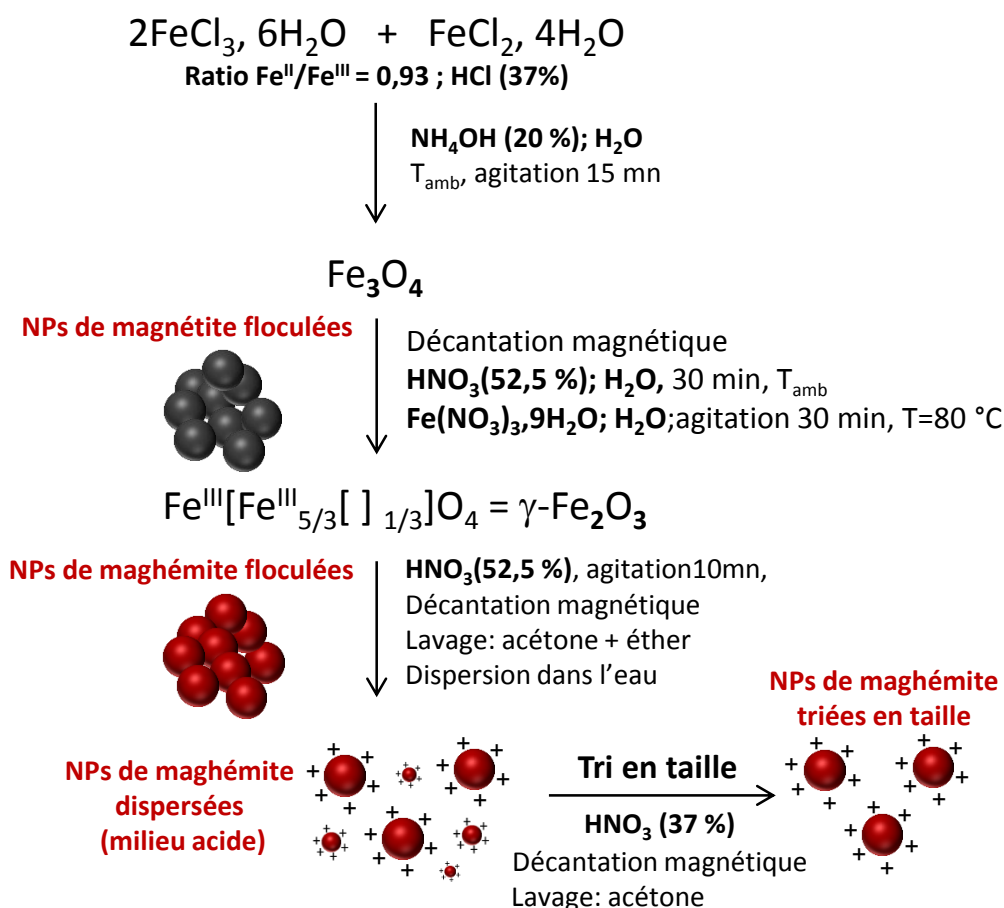


Figure 38. Illustration de la synthèse des nanoparticules de type maghémite par co-précipitation de sels métalliques.

Le ferrofluide (ou liquide magnétique) obtenu par cette voie de synthèse est très polydispense. Il contient des nanoparticules de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) chargées positivement à leur surface avec des anions nitrate NO_3^- en tant que contre-ions. Ce ferrofluide est dit « acide », car il est stable dans une solution aqueuse de $\text{pH} < 3$.

1.3 Tri en taille

Il a été démontré que le « pouvoir chauffant » ou SAR (de l'anglais, *Specific Absorption Rate*) des NPM_s peut être amélioré en augmentant le diamètre des nanoparticules et en réduisant leur polydispersité². Par conséquent, les NPM_s obtenues précédemment ont été triées en taille suivant la procédure établie par S. Lefebure et al.³ Ce protocole est basé sur la déstabilisation de la dispersion des nanoparticules magnétiques par variation de la force ionique du milieu. Une séparation de phases est ainsi provoquée, les particules les plus grosses étant les moins stables.

Protocole : Pour cela, une solution concentrée d'acide nitrique (HNO_3 , 52,2%) est ajoutée à la dispersion de NPMs. Lorsque la déstabilisation des NPMs est observée, la phase précipitée dense (contenant les plus grosses particules) et la phase surnageante diluée (contenant les plus petites particules) sont séparées par décantation magnétique et lavées avec de l'acétone et de l'éther. Ces étapes sont répétées plusieurs fois jusqu'à obtenir une fraction de ferrofluide contenant des nanoparticules avec la taille et la dispersité souhaitée. Puis, le diamètre magnétique médian, correspondant à la taille des domaines magnétiques (d_0 ou d_{mag}), et l'indice de polydispersité (σ) de différents lots ont été mesurés avec un magnétomètre vibrant VSM (Figure 39).

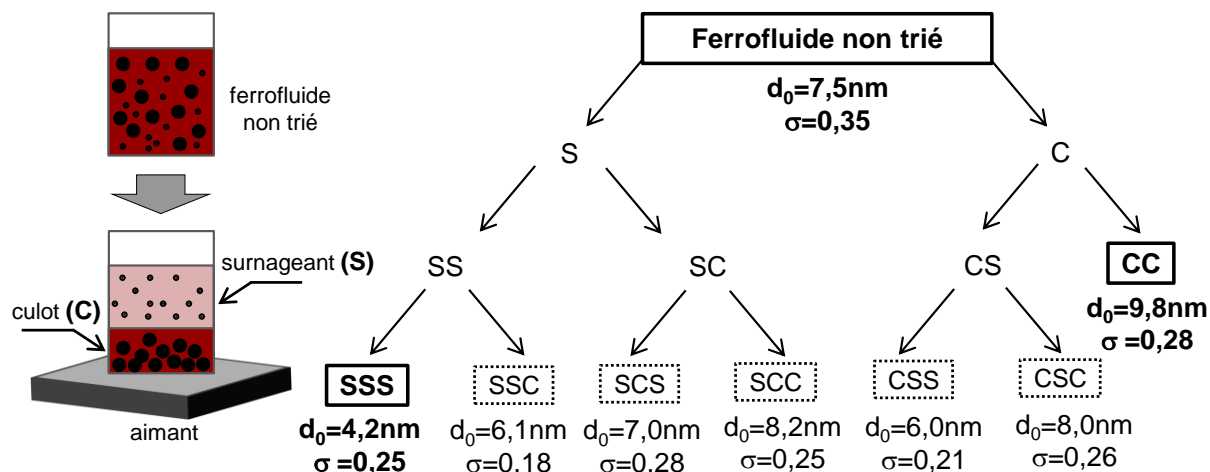


Figure 39. Schéma résumant le protocole de tri en taille des nanoparticules magnétiques. À chaque étape la dispersion est séparée en deux fractions : un surnageant (S) et un précipité ou culot (C). Les fractions CC et SSS contiennent les NPs les plus grosses et les plus petites respectivement ; d_0 et σ ont été mesurés avec un VMS.

Les courbes d'aimantation ($M/M_s=f(H)$), permettant le calcul de d_0 (ou d_{mag}) et σ , ainsi que leur modélisation par la fonction de Langevin sont données sur la Figure 40a. Les données expérimentales ont été normalisées par l'aimantation à saturation $M_s = m_s \cdot \Phi$ où m_s est l'aimantation volumique à saturation de la maghémite ($m_s = 3,1 \cdot 10^5 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1}$) et ϕ est la fraction volumique des NPMs, telle que :

$$\Phi = \frac{V_{\text{NPMs}}}{V_{\text{NPMs}} + V_{\text{eau}}} = 1,6 \cdot [Fe] \quad \text{Eq. 14}$$

avec 1,6 le volume molaire (en %) occupé par les nanoparticules de maghémite.

Plus la taille des NPMs est faible, moins la saturation est atteinte rapidement. Les distributions en taille des différents lots de NPMs, calculées avec une loi log-normale sont données Figure 40b. Ces courbes montrent que le protocole de séparation magnétique des NPMs en fonction de leur taille est efficace. La différence de diamètre magnétique médian

entre deux lots est d'environ $\Delta d_{\text{mag}} = 2$ nm, avec une taille croissante $d_{\text{mag}} \approx 4, 6, 7, 8$ et 10 nm respectivement pour les lots SSS ; SCS ; CSS ; CSC et CC.

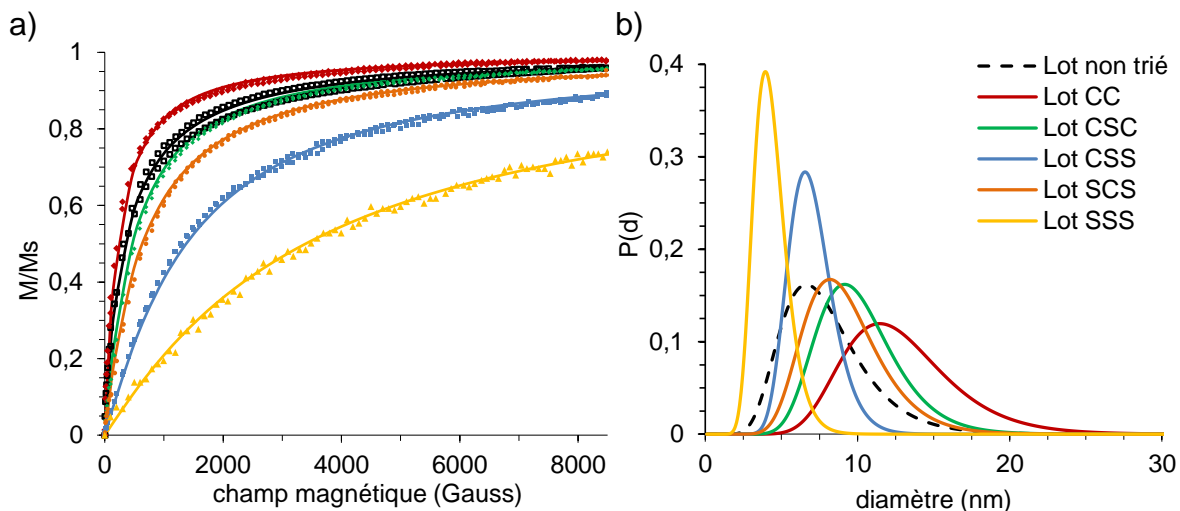


Figure 40. (a) Courbes d'aimantation des différents lots de NPMs à 298 K mesurées par VSM. (b) Distribution en taille modélisée à partir des données expérimentales de (a) avec une loi log-normale. Par souci de visualisation, seulement les courbes des lots le plus représentatifs ont été tracées.

Pour l'élaboration des nanogels magnétiques, seul le lot contenant les plus grosses nanoparticules sera utilisé : lot CC avec un diamètre magnétique médian $d_0 = 9,8$ nm, un indice de polydispersité $\sigma = 0,28$, une fraction volumique $\phi = 1,98\%$, obtenus par VSM. La concentration en fer dans le ferrofluide final est mesurée par spectrométrie d'absorption atomique flamme. Préalablement au dosage, un volume de la solution à doser est placé en présence d'acide chlorhydrique HCl concentré à 37% pendant une heure, afin de dégrader les NPMs. Puis la solution est diluée dans de l'eau distillée et dosée.. Le lot CC de NPMs a une concentration en fer de $[\text{Fe}] = 1,14 \text{ mol.L}^{-1} = 63,67 \text{ mg.mL}^{-1}$.

1.4 Stabilité colloïdale des NPMs

La stabilité des nanoparticules d'oxyde de fer en suspension dans un liquide dépend de plusieurs paramètres. D'une part, comme prévu par la théorie du mouvement brownien et de l'équation de diffusion, elle dépend de la taille de la particule de rayon r , de la température (T) et de la viscosité du milieu (η) d'après la loi de Stokes-Einstein $D = \frac{kT}{6\pi r\eta}$, où D est le coefficient de diffusion et $k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ la constante de Boltzmann. Si les NPMs ont un diamètre faible ($d < 20$ nm), le mouvement brownien assure leur maintien en suspension, dû aux chocs particule-particule et particule-molécules d'eau. Par contre, si leur diamètre est grand

($d > 20$ nm), les NPMs précipitent sous l'effet de la gravité. D'autre part, des interactions interparticulaires attractives de Van der Waals de type dipôle-dipôle, ainsi que des interactions magnétiques, attractives en moyenne, vont rapprocher de plus en plus les NPMs entre elles jusqu'à leur floculation (déstabilisation de la suspension). Plus les NPMs sont grosses, plus ces attractions sont élevées, et de ce fait, plus les NPMs sont instables.

Pour pouvoir envisager des applications biomédicales, mais aussi pour maîtriser la synthèse des objets hybrides tels que les nanogels magnétiques, il est indispensable de pouvoir préparer des ferrofluides stables. Ainsi, il faut donc pouvoir contrebalancer les attractions interparticulaires par des interactions répulsives. Ces répulsions peuvent être électrostatiques (charges à la surfaces des NPMs) ou stériques (enrobage des NPMs avec des polymères, tels que le dextran^{4,5} ou le poly (éthylène glycol)⁶⁻⁸, ou avec des tensioactifs^{8,9}. Les nanoparticules de maghémite préparées par co-précipitation dans l'eau sont stables en milieu acide. En effet à $\text{pH} < 4$, elles sont chargées positivement par protonation des groupes -OH à leur surface en $-\text{OH}_2^+$. Ces NPMs peuvent être aussi dispersées en milieu basique à $\text{pH} > 10$, par déprotonation de ces mêmes groupements ($-\text{O}^-$), à condition de choisir une base dont les contre-ions ne se condensent pas à la surface des NPMs, telle que l'hydroxyde de tétraméthylammonium¹. Les NPMs possèdent un point de charge nulle à $\text{pH} 7,4$ (Figure 41). En conséquence, leur stabilité est très sensible aux variations de pH et à la force ionique du milieu (écranage de charges).

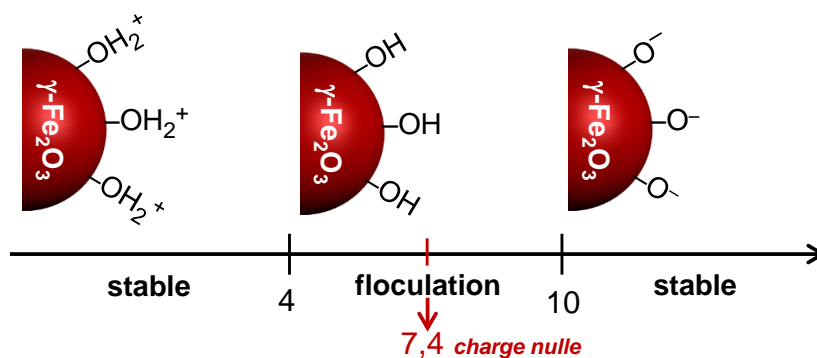


Figure 41. Stabilité des nanoparticules de maghémite dans l'eau, en fonction du pH .

Pour avoir un ferrofluide stable dans la gamme $4 < \text{pH} < 10$, et donc stable à pH physiologique ($\text{pH} 7$), il est possible de complexer les atomes de fer en surface des NPMs par des molécules possédant de groupes carboxylates¹⁰ ou phosphonates¹¹. En effet, ces deux types de groupements fonctionnels ont une grande affinité pour les atomes de fer. En outre, des molécules d'eau sont adsorbées à la surface des NPMs. La quantité totale d'eau absorbée, quantifiée par une analyse TGA, est d'environ 7,4% (Cf. Annexe 5).

1.5 Morphologie, taille et charge des NPMs

Les nanoparticules d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), synthétisées par co-précipitation de sels métalliques ont une forme de *rock-like* plus ou moins sphérique, comme observé sur les clichés de TEM de la Figure 42a. Un histogramme en taille des nanoparticules (Figure 42b) est tracé à partir du traitement de plusieurs images TEM avec le logiciel ImageJ, soit en utilisant la macro PSA-r12 pour une mesure automatique, soit en traçant manuellement le diamètre des nanoparticules si le contraste de l'image est faible ou s'il est difficile de voir le contour de chaque particule à cause des agrégats. Le comptage est effectué sur $n = 200$ particules. La distribution en taille des nanoparticules synthétisées suit une loi log-normale $P(d)$, tel que :

$$P(d) = \frac{1}{\sqrt{2 \times \pi \times \sigma \times d}} \times \exp \left[-\frac{\ln^2(d/d_{\text{phys}})}{2 \times \sigma^2} \right] \quad \text{Eq. 15}$$

où d_{phys} est le diamètre physique moyen des NPMs et σ l'écart type (ou indice de polydispersité) des $\ln d$. Ainsi, les NPMs ont un diamètre physique moyen $d_{\text{phys}} = 11,5$ nm et un écart-type $\sigma = 0,33$.

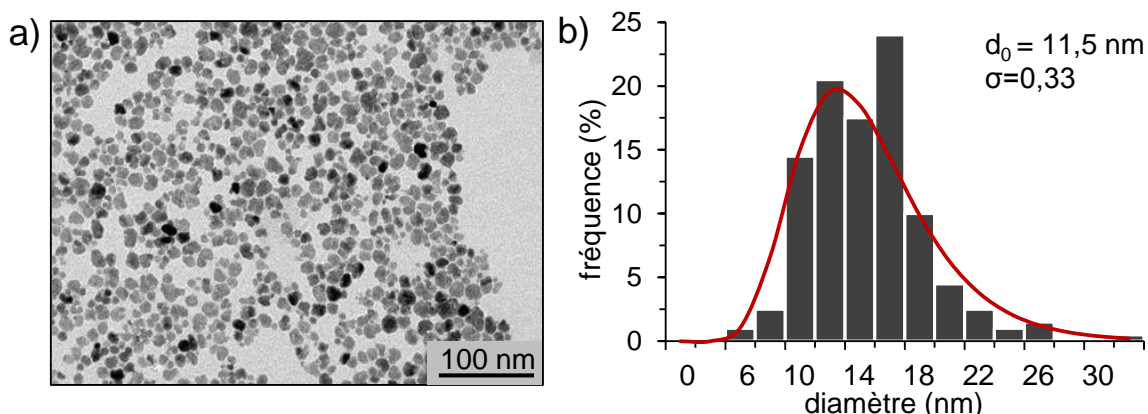


Figure 42. (a) Cliché TEM de NPs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) obtenues après un tri en taille. (b) Distribution en taille des NPMs obtenue par analyse des plusieurs clichés TEM ($n = 200$ particules) et ajustée par une loi log-normale (courbe rouge). Les NPMs ont un diamètre physique moyen $d_0 = d_{\text{phys}} = 11,5$ nm et un écart-type de $\sigma = 0,33$.

La taille des nanoparticules en suspension dans l'eau a été mesurée par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Dans ce cas, le diamètre mesuré (diamètre hydrodynamique d_h) est égale à 22,2 nm et l'indice de polydispersité (PDI) est égal à 0,36 (Figure 43). La grande valeur obtenue est attribuable à la contribution majoritaire des plus grosses NPs, via une moyenne en intensité diffusée qui revient à pondérer chaque contribution par le carré du volume.

La DLS permet également de mesurer le potentiel zéta (ζ) des nanoparticules magnétiques, c'est-à-dire la charge électrique qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent lorsqu'elle est en solution. Les NPMs ont un potentiel $\zeta = 25,3$ mV à pH < 3,0 dans une solution aqueuse d'acide nitrique.

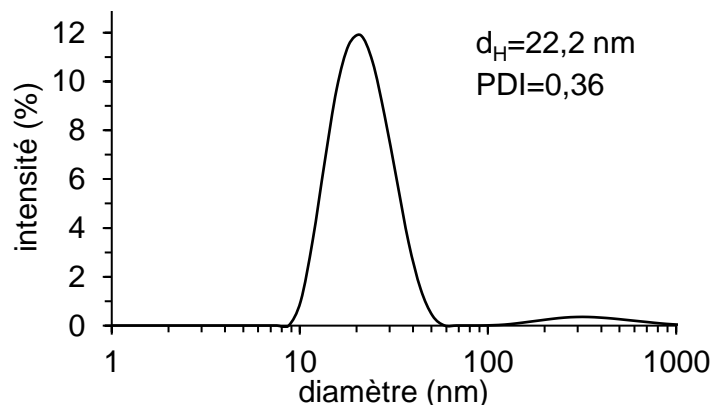


Figure 43. Distribution en taille des NPMs dispersées dans l'eau à pH < 3,0, mesurée par DLS.

1.6 Structure cristallographique des NPMs

La diffraction des rayons X sur poudre (PXRD) donne des informations sur la structure cristallographique. Pour cela, un volume de ferrofluide (Lot CC) a été lyophilisé pendant une nuit afin d'en retirer toute l'eau. L'échantillon sec est ensuite broyé et déposé sur un support en verre. Le diffractogramme est enregistré de 10 à 80 ° (pour 2θ), à une vitesse $0,05$ °C.min⁻¹, à 298 K et avec une radiation $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406$ Å) à l'aide d'un diffractomètre Rigaku Ultima IV.

La Figure 44 montre le diffractogramme de rayons X obtenu expérimentalement (courbe noire). Les principaux pics sont indexés par les indices de Miller (h, k, l), correspondant aux plans cristallographiques. Le logiciel PDXL (v.2) permet de modéliser de manière automatique la forme des pics (par la méthode de Rietveld, courbe rouge), de calculer les indices de Miller et d'identifier les phases (avec la base de données ouverte Cristallographie – COD). Les phases, identifiées avec le logiciel PDXL v.2 correspondent à la magnétite (Fe_3O_4) et à la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). La loi de Braag permet de calculer les paramètres de maille :

$$2d_{hkl}\sin\theta = n \cdot \lambda \quad \text{Eq. 16}$$

où d_{hkl} est la distance entre deux plans cristallographiques (avec $d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2+k^2+l^2}}$ pour un système cubique), θ est l'angle de Braag, n est l'ordre de diffraction et λ est la longueur d'onde des rayons X.

Ainsi, les paramètres de maille de la magnétite et la maghémite sont respectivement $a=b=c=8,3578 \text{ \AA}$ et $8,4053 \text{ \AA}$ et d'angles $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ (système cubique). Ces valeurs sont semblables aux données recueillies de la littérature ($8,32 - 8,39 \text{ \AA}$)¹²⁻¹⁵. Les valeurs des paramètres de maille de la magnétite et la maghémite sont très proches, car ces deux oxydes de fer appartiennent à la famille de spinelles. Il est donc difficile de distinguer les phases magnétite (Fe_3O_4) et maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) par PXRD. Il est possible d'estimer la taille moyenne des NPMs avec la formule de Scherrer qui tient en compte la largeur à mi-hauteur de la raie la plus intense :

$$d_{\text{PXRD}} = \frac{k \cdot \lambda}{\beta_{1/2} \cdot \cos(2\theta/2)} \quad \text{Eq. 17}$$

avec $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ la longueur d'onde de l'onde incidente, 2θ l'angle de Braag au sommet de la raie, β_i la largeur de la raie en radians et k un facteur de correction.

d_{PXRD} a été calculé pour le pic le plus intense (311) du spectre PXRD, avec $2\theta = 35,58^\circ = 0,6210\text{rad}$, $\beta_{1/2} = 87,48 \text{ \AA}$ (largeur à mi-hauteur du pic) et $k = 0,89$. Ainsi, le diamètre moyen des cristallites des NPMs est égale à $d_{\text{PXRD}} = 8,7 \text{ nm}$. Ces valeurs sont inférieures, mais assez proches du diamètre physique moyen ($d_{\text{phys}} = 11,5 \text{ nm}$) mesuré par TEM suggérant que les NPMs sont bien monocristallines. En considérant la taille total de la particule (100%) égale à $d_{\text{TEM}} = 11,5 \text{ nm}$, le degré de cristallinité de cet échantillon est estimé à 76%. Toutefois, la polydispersité de l'échantillon (distribution en taille très large), les imperfections du réseau cristallin des particules (contraintes, dislocations, défauts), ainsi que l'appareillage utilisé contribuent à l'élargissement des pics de diffraction. En conséquence, il faut prendre en compte que la valeur d_{PXRD} peut être entachée d'une certaine erreur.

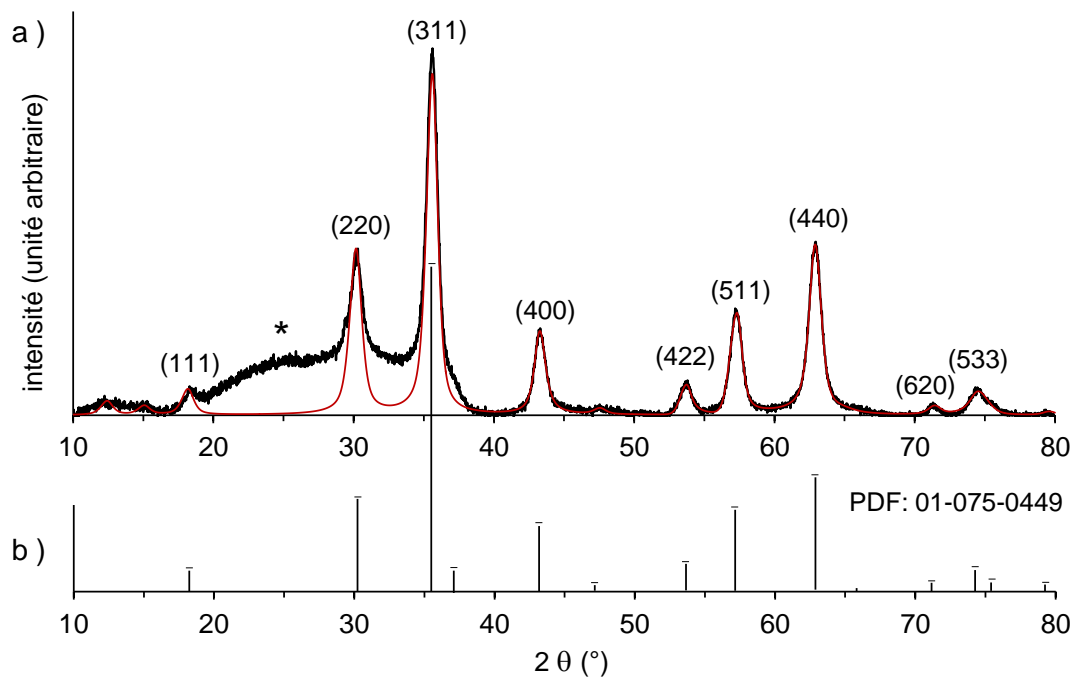


Figure 44. Diffractogramme de rayons X sur poudre de la maghémite (* raie élargie du porte-échantillon). (a) Les données expérimentales (en noir) et la forme des pics modélisée avec le logiciel PDXL v.2 (en rouge) permettant de calculer les indices de Miller (h, k, l) et les phases. (b) Le fichier JCPDS-PDF de la structure cubique de la magnétite (Réf. 01-075-0449).

Les diamètres moyens des nanoparticules de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ mesurés par différentes techniques d'analyse (DLS, TEM, VSM, PXRD) sont classés tels que :

$$d_{\text{DLS}} (22 \text{ nm}) > d_{\text{TEM}} (11,5 \text{ nm}) > d_{\text{VSM}} (9,8 \text{ nm}) > d_{\text{PXRD}} (7,2\text{-}8,7 \text{ nm})$$

Une étude récente a démontré que ces diamètres ont des significations physiques différentes et qu'ils doivent être reliés à la réponse magnétique des NPMs avec prudence¹⁶. Dans cette étude, B. Pacakova et al. suggèrent que la structure interne des NPMs et l'ordre du spin d'une particule individuelle sont les facteurs clés qui gouvernent les performances magnétiques macroscopiques des nanoparticules. Ils ont montré que lorsque les NPMs sont très cristallines, la valeur de M_s est très élevée, indépendante de la taille des NPMs. Ainsi, la valeur de M_s la plus forte qu'ils ont mesurée correspondait aux plus petites particules, mais aussi les plus cristallines (Figure 45a et b). Par contre, lorsque le degré de cristallinité des NPMs diminue et ce malgré une augmentation de leur taille, la valeur de M_s est également réduite (Figure 45c). Les auteurs ont conclu que le degré de cristallinité des nanoparticules, associé à la largeur de la distribution en taille entraînerait une réponse magnétique spécifique à l'échantillon.

Dans notre cas, les nanoparticules d'oxyde de fer que nous avons synthétisées ont des diamètres moyens tels que : $d_{TEM} > d_{mag} > d_{XRD}$, le schéma correspondant à ces NPMs est entouré en rouge sur la Figure 45.

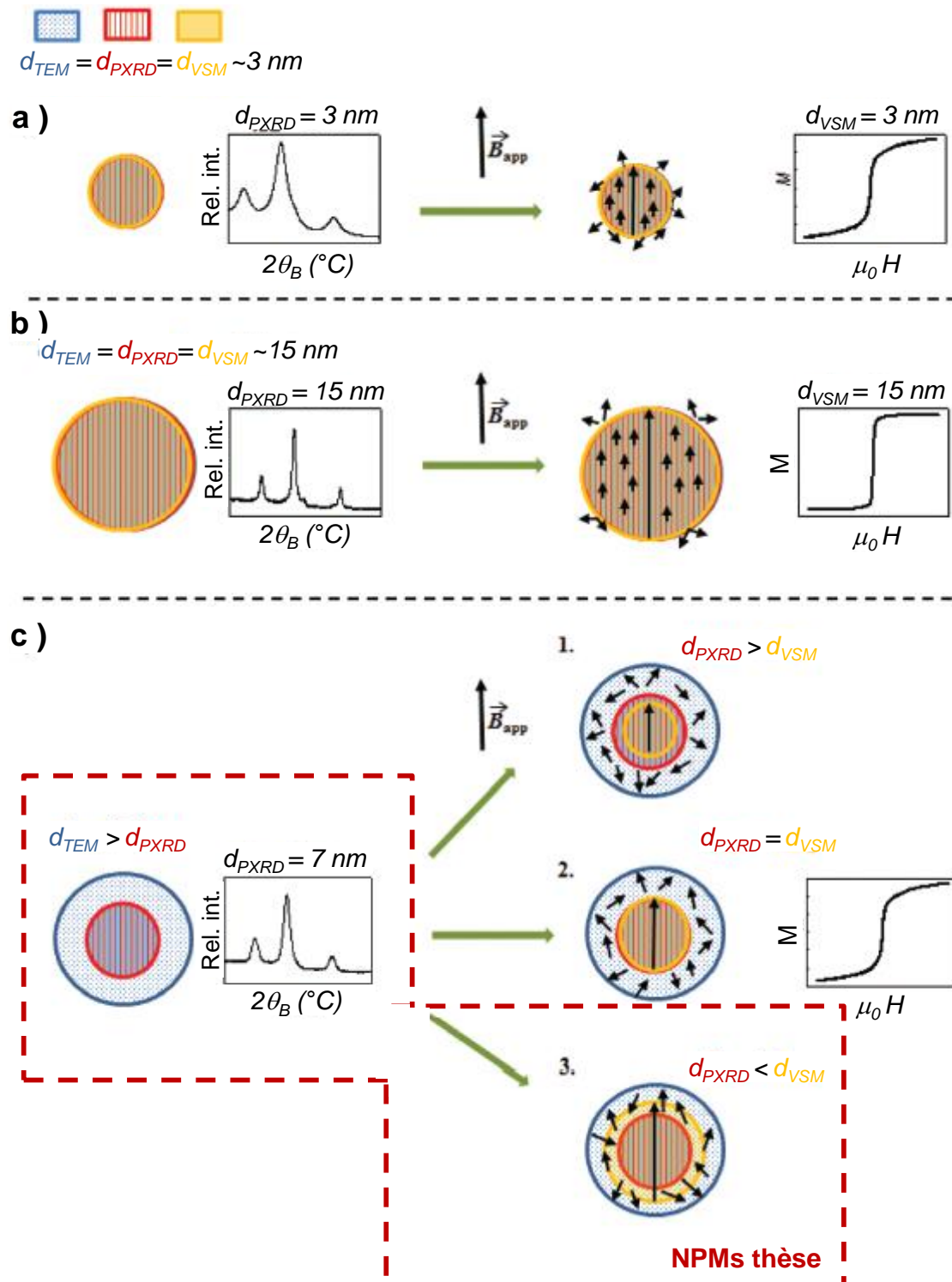


Figure 45. Schéma de nanoparticules magnétiques avec des tailles et des structures internes différentes. Les images sont une représentation simple de la structure interne des NPMs qui considère des spins alignés dans la direction du champ magnétique appliqué pour le cœur, et des spins orientés de manière aléatoire pour la coquille. Les diffractogrammes PXRD (à gauche), et les courbes

d'aimantation (à droite) sont schématisés. Plusieurs cas sont proposés : lorsque $d_{\text{TEM}} = d_{\text{PXRD}} = d_{\text{VSM}}$ pour des nanoparticules de (a) 3 nm et de (b) 15 nm (cas idéal), et lorsque $d_{\text{TEM}} > d_{\text{PXRD}}$ avec (1c) $d_{\text{PXRD}} > d_{\text{VSM}}$, (2c) $d_{\text{PXRD}} = d_{\text{VSM}}$ et (3c) $d_{\text{PXRD}} < d_{\text{VSM}}$. Adapté de¹⁶.

1.7 Propriétés magnétiques des NPMs

Les nanoparticules de maghémite élaborées par co-précipitation ont un diamètre inférieur à 20 nm. A cette taille chaque particule est un monocristal formé par un seul domaine magnétique.¹⁷ De ce fait, chaque particule possède un moment magnétique μ non nul, orienté selon l'axe principal d'aimantation de la NPM tel que :

$$\mu = m_s \cdot V_{\text{NPMs}} \quad \text{Eq. 18}$$

où m_s est l'aimantation volumique à saturation et V_{NPMs} est le volume de la particule.

Les particules auront un comportement superparamagnétique. À T_{amb} , si aucun champ magnétique n'est appliqué les moments des NPMs en dispersion sont orientés de manière aléatoire à cause de l'agitation thermique, l'aimantation globale de la dispersion est donc nulle. Par contre, si un champ magnétique est appliqué, les moments vont s'aligner suivant la direction du champ et l'aimantation globale obtenue sera supérieure à celle d'un matériau paramagnétique, d'où le terme superparamagnétique. Les propriétés d'aimantation d'un matériau sont illustrées par la courbe d'aimantation (Figure 46). Pour un échantillon superparamagnétique, la courbe d'aimantation atteint une asymptote horizontale à haut champ (10000 Gauss = 1 tesla), correspondant à l'alignement des moments magnétiques de toutes les particules selon la direction du champ magnétique. C'est l'aimantation à saturation M_s :

$$M_s = m_s \cdot \Phi \quad \text{Eq. 19}$$

où m_s est l'aimantation volumique à saturation du matériau (pour la maghémite $m_s = 3,1 \cdot 10^5 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1}$) et ϕ est la fraction volumique des NPMs. En connaissant la valeur de l'aimantation à saturation M_s , il est donc possible de remonter à la fraction volumique en particules Φ de l'échantillon. Lorsque l'échantillon est monodisperse, la courbe d'aimantation est modélisée par la loi de Langevin^{17,18} :

$$M(H) = M_s \left(\coth \xi - \frac{1}{\xi} \right) \quad \text{avec} \quad \xi = \frac{\mu \cdot H}{k_B \cdot T} \quad \text{Eq. 20}$$

avec ξ le paramètre de Langevin ; μ le moment dipolaire magnétique ; k_B la constante de Boltzmann ; T la température du milieu et H est le champ magnétique appliqué. En

assumant que la distribution en taille des nanoparticules suit une loi log-normale et en ajustant la courbe théorique à la courbe expérimentale, il est possible de calculer le diamètre magnétique (d_0 ou d_{mag}) et l'indice de polydispersité ou écart-type (σ) de la dispersion de NPMs. La courbe d'aimantation du lot CC de nanoparticules magnétiques (fraction volumique $\phi = 1,98 \%$) est donnée Figure 46a. Les NPMs ont un diamètre magnétique moyen $d_0 = 9,8 \text{ nm}$ et un écart-type $\sigma = 0,28$.

Le cycle d'hystérésis complet est mesuré avec un magnétomètre SQUID à 298 K. À différence du VSM, le SQUID permet de mesurer de manière précise dans une large gamme de champs magnétiques, et surtout à des champs magnétiques très faibles (pour des dispersions diluées). Par contre, les mesures sont très lentes (plusieurs heures pour un cycle d'hystérèse complet). L'appareil utilisé est un Quantum Design Ltd MPMS. D'après la Figure 46b, la valeur de l'aimantation à saturation M_s des NPMs est 98 emu.g^{-1} à 50 kOe ($[\text{Fe}] = 11,5 \text{ mM}$). Ces deux courbes confirment les propriétés superparamagnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées.

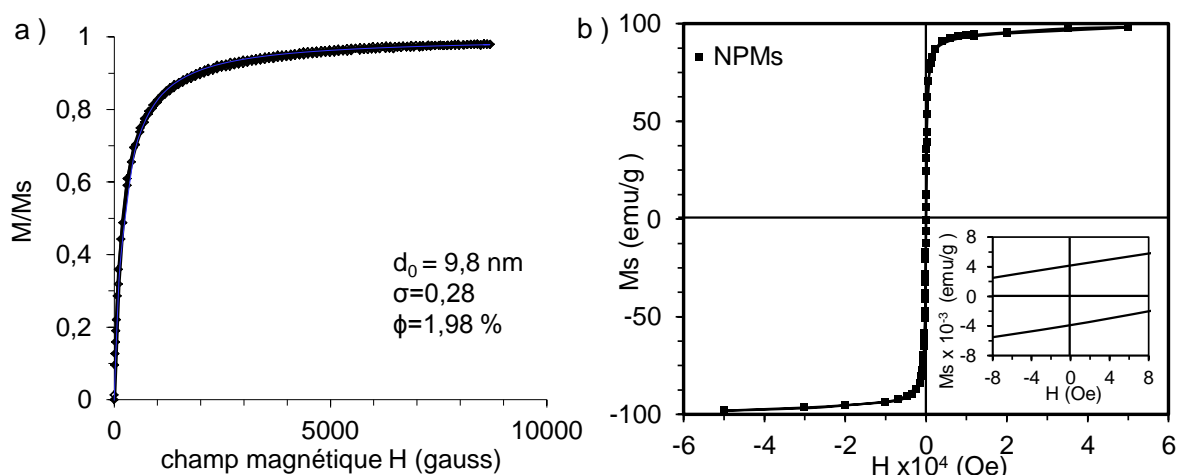


Figure 46. (a) Courbe d'aimantation des NPs de type $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ mesurée par VSM et modélisée par la fonction de Langevin. Les NPMs ont un diamètre magnétique $d_0 = 9,8 \text{ nm}$, un écart-type de $\sigma = 0,28$, une fraction volumique égale à $\phi = 1,98\%$. (b) Courbe d'aimantation des NPMs ou cycle d'hystérésis complet mesuré par SQUID à 298 K.

1.7.1 Propriétés d'hyperthermie magnétique

Les nanoparticules magnétiques génèrent de la chaleur lorsqu'elles sont exposées à un champ magnétique alternatif. En effet, elles sont capables de transformer une énergie électromagnétique en énergie thermique². Ce phénomène est connu sous le nom d'hyperthermie magnétique.

A. Modes de relaxation

La dissipation de chaleur est gouvernée par deux modes de relaxation :

(1) La relaxation de Néel, qui est due au basculement du moment magnétique de la particule pour laquelle le temps caractéristique τ_N est défini tel que :

$$\tau_N = \tau_0 \cdot \exp\left(\frac{K_v \cdot V_{NP}}{k_B T}\right) \quad \text{Eq. 21}$$

avec K_v l'anisotropie magnétique volumique du matériau, V_{NP} le volume des nanoparticules, k_B la constante de Boltzmann et τ_0 une constante de temps.

(2) La relaxation de Brown, qui repose sur la rotation de la particule elle-même, avec un temps caractéristique τ_B tel que :

$$\tau_B = \left(\frac{3\eta V_h}{k_B T}\right) \quad \text{Eq. 22}$$

avec η la viscosité du milieu dispersant et V_h le volume hydrodynamique des nanoparticules.

Il a été démontré que les nanoparticules de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) dont le diamètre est inférieur à environ 16 nm, ont un seul domaine magnétique et que la chaleur générée sous AMF par ce type de particules est attribuée à la relaxation de Néel c'est-à-dire à la rotation du moment magnétique au sein de la particule.²

B. Pouvoir chauffant ou *Specific Absorption Rate*

Afin d'évaluer l'efficacité des NPMs en tant que source d'hyperthermie magnétique, le pouvoir chauffant appelé Specific Absorption Rate (SAR) ou Specific Loss Power (SLP) des nanoparticules en dispersion a été mesuré. Pour cela, 1 mL de l'échantillon concerné est introduit dans un eppendorf et placé à l'intérieur d'une bobine magnétique. Puis, l'échantillon est soumis à un champ magnétique alternatif (AMF : 335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹) pendant 2 min à 25 °C. L'évolution de la température est mesurée *in situ* à l'aide d'un thermomètre à fibre optique non métallique. La valeur de SAR est calculée selon l'équation 10 et donnée en W.g⁻¹ d'oxyde de fer :

$$SAR = \frac{c_p}{\rho \cdot \phi} \cdot \left[\frac{d\theta}{dt}\right]_T \quad \text{Eq. 23}$$

avec C_p la capacité spécifique calorifique du solvant ($C_{p\text{eau}} = 4,184 \text{ J.K}^{-1}.\text{g}^{-1}$), ρ la densité des nanoparticules de maghémite ($\rho_{MNP\text{s}} = 4,9$), ϕ la fraction volumique en NPMs dans le ferrofluide et $\left[\frac{d\theta}{dt}\right]_T$ correspond à la pente des premiers 30 s de la courbe $T = f(\text{temps})$ de la Figure 47. La SLP mesure la capacité de l'échantillon magnétique à produire de la chaleur en présence d'un champ magnétique alternatif (échauffement dynamique). Elle correspond à la puissance volumique dissipée par l'échantillon sous forme de chaleur, normalisée par la masse de nanoparticules présentes dans la dispersion.

Comme illustré sur la Figure 47, la température d'une solution aqueuse très concentrée en NPMs ($[\text{Fe}] = 1,14 \text{ M}$, $\phi = 1,8\%$) augmente drastiquement de 20 à 46 °C ($\Delta T = 26 \text{ °C}$) après avoir été exposée au AMF pendant 2 min (335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m^{-1}). Pour une solution 10 fois moins concentrée, la température augmente de 20 à 24 °C ($\Delta T = 4 \text{ °C}$), et pour une solution diluée 100 fois, la température reste quasiment constante (20 °C). Afin d'évaluer l'efficacité des NPMs synthétisées à produire de la chaleur en présence d'un champ magnétique alternatif, la SLP du lot CC a été mesurée. La pente des 30 premières secondes de la courbe rouge ($[\text{Fe}] = 1,14 \text{ M}$) est utilisée pour le calcul de SAR. À 335 kHz, la SAR des NPMs est égale à 47 $\text{W.g}^{-1} \text{ Fe}$. Ainsi, ces NPMs peuvent bien être utilisées en tant que source de chaleur pour des applications biomédicales d'hyperthermie magnétique.

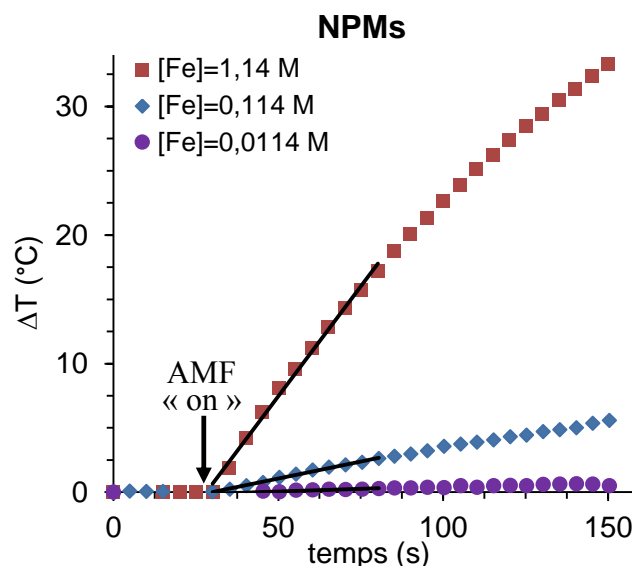


Figure 47. Évolution de la température de NPMs en dispersion dans l'eau ($\text{pH} < 3,0$) à différentes concentrations en fer sous AMF (335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m^{-1}) pendant 2 min.

2. Les Nanogels magnétiques

Les nanogels hybrides magnétiques sont des nanogels contenant des nanoparticules magnétiques dans leur matrice polymère. Ces nanoparticules peuvent être à l'intérieur ou à la surface des nanogels et leur confèrent des propriétés magnétiques, telles que la possibilité de les guider à l'aide d'un aimant permanent (vectorisation ou guidage magnétique), ou de générer de la chaleur en présence d'un champ magnétique alternatif (hyperthermie magnétique). Ici, nous présentons la synthèse et la caractérisation de ces nanogels hybrides notés MagNanoGels.

2.1 Matériel

Des nanogels à base de (macro)-monomères dérivés d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs) synthétisés précédemment ; des nanoparticules magnétiques de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (NPMs) élaborées précédemment ; des pastilles d'hydroxyde de potassium (KOH, Sigma-Aldrich) et une solution commerciale d'acide nitrique concentré à 68% (HNO_3 , Sigma-Aldrich) ont été utilisées pour la synthèse des nanogels magnétiques (MagNanoGels). Des solutions tampon d'hepes hemi-sodique (ou sel de sodium de l'acide sulfonique 4-(2-Hydroxyéthyle) piperazine-1-éthane à 0,1 M ; pH 7,5 – Sigma-Aldrich) ; et d'acide citrique (mélange d'acide citrique à 0,05 M et phosphate de sodium à 0,1 M ; pH 5,5 – Sigma-Aldrich) ont été utilisées pour les études de gonflement–dégonflement des MagNanoGels.

2.2 Synthèse des MagNanoGels

Pour synthétiser les nanogels magnétiques à base de (macro)-monomères d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs), notés MagNanoGels, nous avons adopté une stratégie similaire à celle mise en place par M. Boularas et al.¹⁹, en modifiant certains paramètres tels que le temps de polymérisation et la méthode de purification. Cette méthode est basée sur l'assemblage des NPMs et des nanogels préalablement synthétisés. Ainsi, les groupements carboxyles ($-\text{COOH}$ / $-\text{COO}^-$) de la matrice polymère vont complexer la surface des nanoparticules magnétiques. Cette méthode, illustrée Figure 48, permet d'incorporer de manière homogène une grande quantité de NPMs à

l'intérieur de la matrice polymère, tout en gardant les propriétés physico-chimiques individuelles des deux composants, les nanogels et les NPMs.

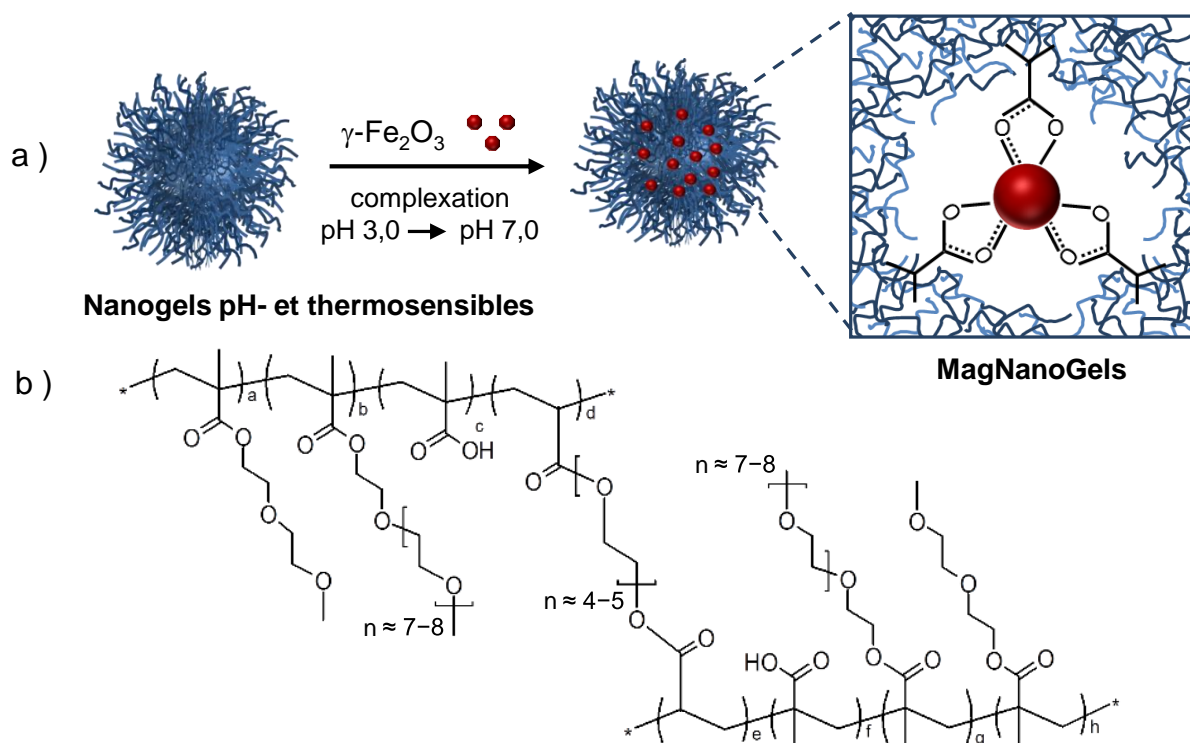


Figure 48. (a) Illustration de la synthèse des nanogels magnétiques (MagNanoGels) par complexation des groupements carboxyle, des nanogels P(OEGMAs-co-MAA) ou PEG-co-MAA, sur la surface des nanoparticules d'oxyde de fer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. (b) Structure chimique de la matrice polymère.

Protocole : Tout d'abord, le pH d'une dispersion de nanogels PEG-co-MAA ($V = 5$ mL) est ajusté à 3,0 par ajout goutte à goutte d'une solution d'acide nitrique HNO_3 à 0,1 M. Puis, un volume V de ferrofluide acide concentré ($[\text{Fe}] = 1,14$ M avec $V = [0,013 - 1,30]$ mL) est ajouté doucement dans la dispersion de nanogels et le pH est augmenté graduellement de 3,0 à 7,0 par ajout goutte à goutte d'une solution d'hydroxyde de potassium KOH à 0,1 M. Le volume de ferrofluide ajouté est choisi en fonction de la quantité de NPMs souhaitée dans les nanogels.

À pH 3,0, les NPMs sont chargées positivement et les nanogels sont neutres. Étant donné que le diamètre des NPMs est plus faible que la taille de la maille polymère, elles peuvent diffuser facilement à travers la matrice polymère sans flocculer. À pH 7,0, les NPMs ne sont plus chargées et les groupements carboxyle des nanogels vont se lier à la surface des NPMs par une réaction de complexation¹⁰, comme illustré dans l'encart de la Figure 48a. En suivant le protocole décrit ci-dessous, plusieurs lots de MagNanoGels-X %m, contenant des ratios massiques en NPMs X croissants, ont été préparés ($X = 9,0 ; 16,7 ; 28,6 ; 37,5 ; 50,0 ; 66,7 ; 83,3$ et $90,9$ % avec $X = m_{\text{NPMs}} / [m_{\text{NPMs}} + m_{\text{nanogels}}]$). L'objectif est de préparer des nanogels le plus magnétiques possibles (avec le ratio X le plus élevé possible) tout en gardant leur stabilité colloïdale dans l'eau.

Lorsque les nanogels ne contiennent pas d'acide méthacrylique (MAA), les NPMs restent à l'extérieur de la matrice polymère. Par contre, lorsque les nanogels sont copolymérisés avec du MAA, les NPMs sont encapsulées et distribuées dans toute la matrice polymère. En effet, les groupements carboxyle ($-\text{COOH} / -\text{COO}^-$), provenant du MAA vont se complexer à la surface des NPMs¹⁰.

2.3 Synthèse des MagNanoGels fluorescents

Afin d'observer l'internalisation des MagNanogels par microscopie confocale de fluorescence, des nanogels magnétiques fluorescents RHO-MagNanoGels, liés de manière covalente à de la rhodamine, ont été synthétisés.

Protocole : Une solution à 0,1 %m (ratio massique par rapport à la masse total des monomères) de rhodamine B acryloxyéthyle thiocarbamoylé (RHO – Polysciences, Inc.) est ajoutée avant la réaction de polymérisation. Ce produit est un monomère fluorescent dérivé de la rhodamine ($\lambda_{\text{ex}} = 548 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$).

2.4 Purification

À la fin de la synthèse, les MagNanogels sont lavés par décantation magnétique avec un aimant puissant de Neodyme-Fer-Bore (Nd-Fe-B, 110 x 89 x 20 mm ; 1,22–1,26 T), comme illustré Figure 49. Ainsi, les échantillons sont placés dans des seringues de 2 mL et collés contre l'aimant pendant une nuit. Les MagNanoGels vont être attirés plus vite que les NPMs par l'aimant. Les nanoparticules en excès (non encapsulées) contenues dans le surnageant sont éliminées et les MagNanoGels sont récupérés. Ces étapes sont effectuées plusieurs fois pour enlever le maximum de NPMs libres.

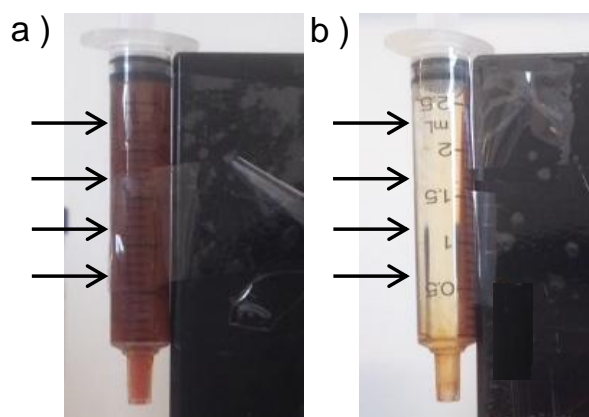


Figure 49. Élimination des NPMs non encapsulées : (a) les dispersions de MagNanoGels sont placées contre l'aimant pendant une nuit, puis (b) le surnageant est éliminé et les nanogels récupérés.

2.5 Composition chimique des MagNanoGels

2.5.1 Dosage du fer dans les MagNanoGels

La concentration en fer [Fe] dans les MagNanoGels-X% est mesurée, soit par spectrométrie d'absorption atomique flamme, soit par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-AES) comme décrit précédemment. Les valeurs de [Fe] sont données dans le Tableau 10. En outre, l'incorporation de NPMs dans les nanogels, et donc la concentration en fer, a également été quantifiée par des analyses thermogravimétriques (TGA) comme le montrent les courbes de la Figure 50.

Protocole : Les différents lots de MagNanoGels-X % ainsi que de NPMs seules et des nanogels sans NPMs ont été mis à sécher dans une étuve à 70 °C pendant une nuit, puis placés dans une capsule en aluminium. Les poudres sont analysées avec un appareil SDT Q600 (TA Instruments) sous flux d'azote $N_{2(g)}$ à 100 mL.min⁻¹, avec une vitesse de chauffage de 10 °C.min⁻¹ de 25 à 800 °C.

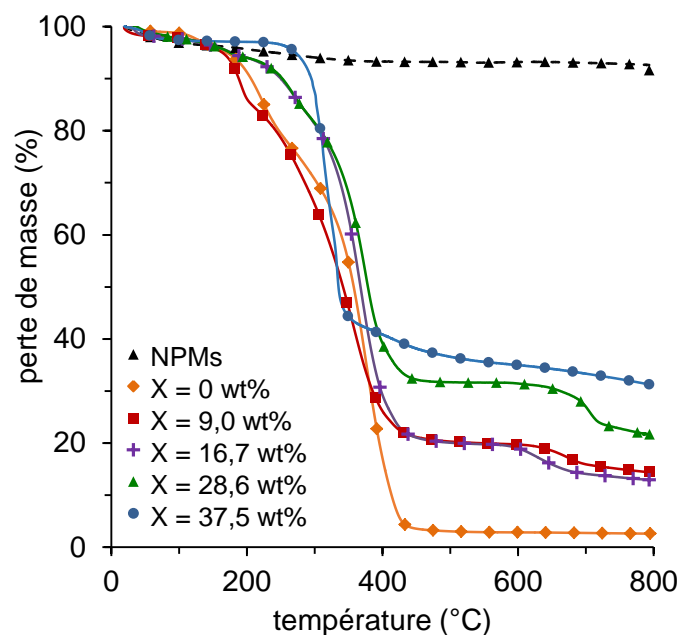


Figure 50. Analyse thermogravimétrique ($N_2(g)$; $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) des nanoparticules magnétiques (NPMs) et des MagNanoGels-X % chargés avec $X = 9,0$ à $37,5$ %m en NPMs.

Tout d'abord, une perte de masse de 14% entre 25 et 225 °C est observée pour les nanogels PEG-co-MAA ne contenant pas de nanoparticules magnétiques ($X = 0$ %, courbe orange). Cette masse correspond aux molécules d'eau encore présentes dans les nanogels, malgré l'étape préalable de séchage à l'étuve (70 °C pendant 30 min). Puis, comme prévu, la masse des nanogels diminue fortement de 225 à 430 °C du fait de la décomposition thermique de la matrice polymère, jusqu'à une perte quasi-totale de masse (environ 96%) autour de 450 °C. Concernant les courbes des nanogels magnétiques ($X = 9,0$ à $37,5$ %m), la perte de masse due à la matrice polymère diminue de 87% à 70% lorsque le taux incorporé de NPMs augmente. Ces résultats confirment la présence des NPMs dans les MagNanoGels et sont en accord avec les pourcentages massiques des NPMs initialement introduits dans les MagNanoGels (Tableau 10).

Tableau 10. Composition massique, en nanoparticules magnétiques et en polymères, des nanogels hybrides magnétiques MagNanoGels-X %.*

Échantillon	%m NPMs initial	Spectro Abs.		TGA			
		Atom.	[Fe] (mol.L ⁻¹)	masse finale (%)	%m NPMs	%m polymères	[Fe] (mol.L ⁻¹)
NPMs	100		1,14	92,6	-	-	-
PEG-co-MAA	0		0	2,59	-	-	-
MagNanoGels-X %m	9,0		6,50.10 ⁻⁴	5,9	10,7	89,3	4,16.10 ⁻⁴
	16,7		1,20.10 ⁻³	12,9	17,7	82,3	1,18.10 ⁻³
	28,6		2,60.10 ⁻³	21,7	26,5	73,5	3,08.10 ⁻³
	37,5		1,15.10 ⁻²	31,3	36,1	63,9	3,43.10 ⁻³

*La colonne « %m NPMs initial » correspond au pourcentage massique initial de NPMs ajouté lors de la synthèse. Les colonnes « %m NPMs » et « %m polymères » correspondent aux pourcentages massiques en NPMs et en polymères calculés par TGA. La concentration molaire en fer [Fe] est mesurée par spectroscopie d'absorption atomique et par TGA.

2.5.2 Estimation de la concentration massique des dispersions de MagNanoGels

Après les différentes étapes de purification des nanogels, la quantité de polymère présente dans la dispersion (m_{pol}) est estimée par analyse gravimétrique en mesurant l'extrait sec. Pour ce faire, 1 mL de chaque dispersion de MagNanoGels-X% est placé dans une étuve à 70 °C pendant 24 h, afin d'éliminer l'eau par évaporation. L'échantillon est pesé avant et après avoir été mis à l'étuve. La masse de l'extrait sec est calculée avec de l'équation 11 :

$$m_{\text{extrait sec}} = m_s - (\% \text{eau liée})m_s \quad \text{Eq. 24}$$

où m_s est la masse des nanogels secs et %eau liée est le pourcentage d'eau interagissant fortement avec les chaînes polymères (définie au chapitre II) et mesurée par TGA. Pour X = 9,0 à 28,6%, les MagNanogels contiennent une quantité d'eau liée proche de celle des nanogels ne contenant aucune NPM (%eau liée = 14-15%) alors que pour le ratio massique en NPMs le plus élevé (X = 37,5%) le taux en eau liée diminue à environ 3%. Les concentrations massiques en nanogels des différents lots de MagNanoGels-X sont regroupées dans le Tableau 11.

Tableau 11. Concentration massique des dispersions de MagNanoGels-X %m calculées par extrait sec

Échantillon	%m NPMs initial	TGA	Extrait sec
		%eau liée	[nanogels] (g (nanogels) .mL ⁻¹)
PEG-co-MAA	0	14,99	6,75
MagNanoGels-X %m	9,0	15,06	2,75
	16,7	13,66	2,86
	28,6	13,66	3,36
	37,5	3,01	2,07

2.6 Morphologie et taille des MagNanoGels

La morphologie des MagNanoGels a été observée par microscopie électronique à Transmission (TEM). Comme observé sur les images TEM de la Figure 51, les MagNanoGels sont sphériques et ont un diamètre d'environ 400 nm. De même, l'augmentation de la densité en NPMs (points noirs) encapsulées dans la matrice polymère avec un ratio massique en NPMs croissant $X = 9,0 ; 16,7 ; 28,6 ; 37,5 ; 50,0$ et $66,7$ % respectivement pour les images a, b, c, d et f est observée clairement. Par ailleurs, l'organisation des MagNanoGels en structure « nid d'abeille » est due au séchage des nanogels déposés sur la grille de TEM lors de la préparation des grilles. Pour le lot de MagNanoGels contenant le moins de NPMs ($X = 9,0$ %m), il est possible d'estimer le nombre de NPMs à l'intérieur de chaque MagNanoGel à partir d'un traitement d'images TEM (logiciel ImageJ). La procédure de comptage est donnée en Annexe 3. Le comptage a été effectué sur $n = 12$ nanogels et $m = 1510$ nanoparticules. Ainsi, les MagNanoGels-9,0 %m contiennent $126_{\text{NPMs/nanogel}}$. Pour tous les autres lots de MagNanoGels ($X \geq 16,7$ %m), il est impossible de faire un comptage du nombre de NPMs par nanogel, car les NPMs sont très rapprochées et/ou superposées.

Lorsque le ratio massique X est inférieur à 50 %, les MagNanoGels sont stables dans l'eau et les nanoparticules d'oxyde de fer semblent être distribuées de manière homogène (pas d'agrégats) à l'intérieur de la matrice polymère (Figure 51a à d). Cependant, il s'agit d'une projection 2D, il est donc difficile de localiser précisément les NPMs dans les nanogels (intérieur vs. surface). Au contraire, lorsque le ratio massique X est supérieur à 50 %, les NPMs forment des agrégats à la surface des nanogels (Figure 51e) jusqu'à former une coquille magnétique. Pour des nanogels avec $X = 66,7$ %m, les nanogels ressemblent à des

capsules avec une coquille très dense en nanoparticules d'oxyde de fer (Figure 51f). Ces deux derniers échantillons seront sûrement très intéressants d'un point de vue magnétique, cependant lorsque $X > 50\%$, les nanogels ne sont plus stables dans l'eau.

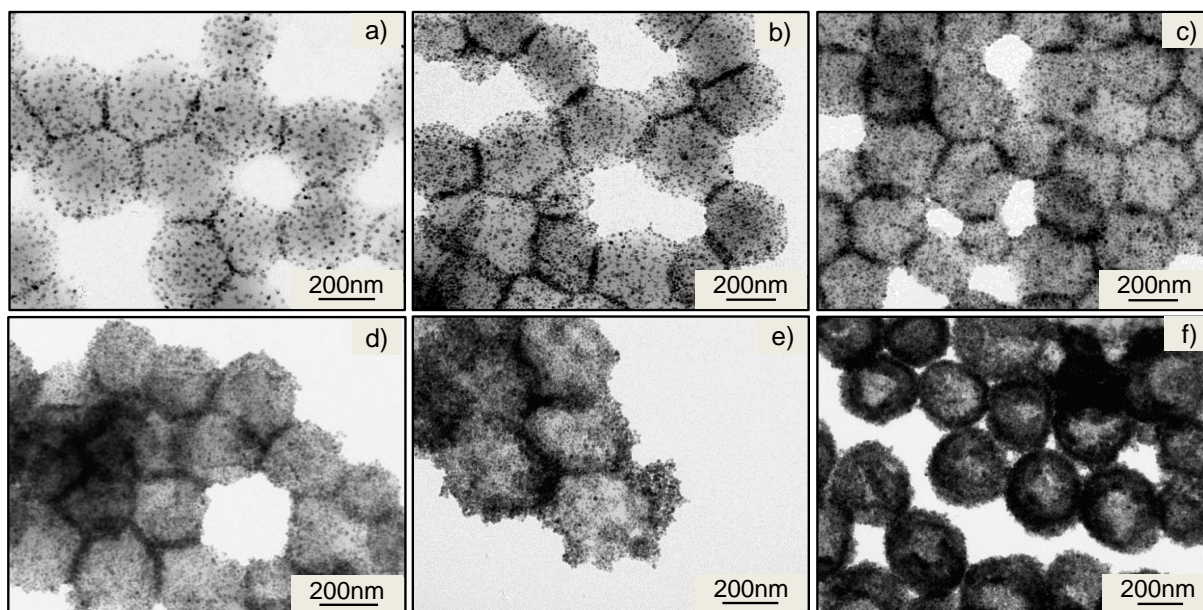


Figure 51. Clichés TEM des MagNanoGels-X%, avec un ratio massique en NPMs $X = 9,0 ; 16,7 ; 28,6 ; 37,5 ; 50,0$ et $66,7\%$ m; de a à f respectivement. Lorsque $X > 50\%$ m (e,f), les nanogels ne sont plus stables dans l'eau.

Le diamètre hydrodynamique (d_h) des MagNanoGels a été mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Dans l'eau à pH 5,5 et 25 °C, les nanogels sont dans un état gonflé. Le d_h de MagNanoGels augmente lorsque le ratio massique en NPMs X augmente, de 342 à 460 nm pour des nanogels contenant respectivement de 9,0 à 37,5 %m. À 50 °C, les nanogels sont dans un état dégonflé. Le d_h des MagNanoGels est plus grand que celui des nanogels sans NPMs, respectivement 295 et 275 nm pour des nanogels magnétiques et non-magnétiques, mais il n'est plus dépendant du ratio massique X et reste constant autour de 300 nm. On note par ailleurs une forte élévation du PDI (supérieur à 0,3) pour la plus grande quantité de NPMs, qui pourrait être attribuée à une désorganisation de la structure des nanogels ou bien à leur agrégation partielle, due à un potentiel zêta moins négatif (Cf. Tableau 9, page 132).

3. Effet de la température et du pH sur les MagNanoGels

3.1 Effet de la température

L'évolution du diamètre hydrodynamique (d_h) en fonction de la température des MagNanoGels-X % contenant différentes quantités de nanoparticules magnétiques (ratio massique $X = 9,0 ; 16,7 ; 28,6$ et $37,5$ %) a été analysée par diffusion dynamique de la lumière (Figure 52). Les mesures en DLS ont été effectuées avec des échantillons dilués (pourcentage massique des dispersions = $0,1\%$ m dans l'eau). Ces mesures montrent que le d_h de tous les MagNanoGels diminue lorsque la température augmente. Ce phénomène de « gonflement-dégonflement » prouve leur caractère thermosensible. Par exemple, le d_h diminue de 460 nm à 25 °C à 298 nm à 50 °C pour les MagNanoGels contenant $37,5$ %m en masse de NPMs ($\Delta d = 30$ nm), les nanogels magnétiques sont donc thermosensibles. Ce comportement de « gonflement – dégonflement » est entièrement réversible et semble être indépendant de la quantité de nanoparticules magnétiques contenue dans les nanogels. À pH $5,0$, la température de transition de phase volumique (VPTT) de tous les MagNanoGels est autour de 25 °C. Par ailleurs, l'ajout de NPMs à l'intérieur des nanogels augmente leur diamètre, de 345 nm à 360 nm lorsque la quantité de NPMs augmente de $9,0$ à $37,5$ %. Le diamètre de tous les nanogels magnétiques diminue lorsque la température augmente, donc la thermosensibilité intrinsèque aux polymères n'est pas modifiée lorsque la charge en NPMs croît.

Pour le calcul du taux de gonflements (Q) des MagNanoGels-X %, nous considérons que les nanogels sont sphériques. Ainsi, les volumes d'une sphère de gel à $T = 25$ et 50 °C ont été calculés, en utilisant les diamètres hydrodynamiques $d_h(25$ °C) et $d_h(50$ °C). Comme expliqué précédemment, la valeur de $Q \left(= V_{d_h(25\text{ °C})} / V_{d_h(50\text{ °C})} \right)$ dépend du degré de réticulation de la matrice polymère et est directement lié à la quantité d'eau contenue dans les nanogels à l'état gonflé. Ici tous les MagNanoGels ont été synthétisés avec la même quantité de réticulant ($3,9\%$ mol d'OEGDA₂₅₀ par rapport à $(\text{MEO}_2\text{MA} + \text{OEGMA}_{500}) = 3,66$ mmol = 100%). Ainsi, leur taux de réticulation devrait être similaire. À pH $5,5$, lorsque le ratio massique en NPMs augmente de 0 à $16,7$ %, Q diminue légèrement (de $1,7$ à $1,5$). Puis, lorsque $X \geq 28,6$ %, Q augmente de $1,8$ à $3,7$ respectivement pour $X = 28,6$ et $37,5$ %. En faisant varier le pH du milieu de $5,5$ à $7,5$, le taux de gonflement des nanogels non-

magnétiques reste constant ($Q \approx 1,7$), mais celui des MagNanoGels-37,5 % diminue de 3,7 à 1,6.

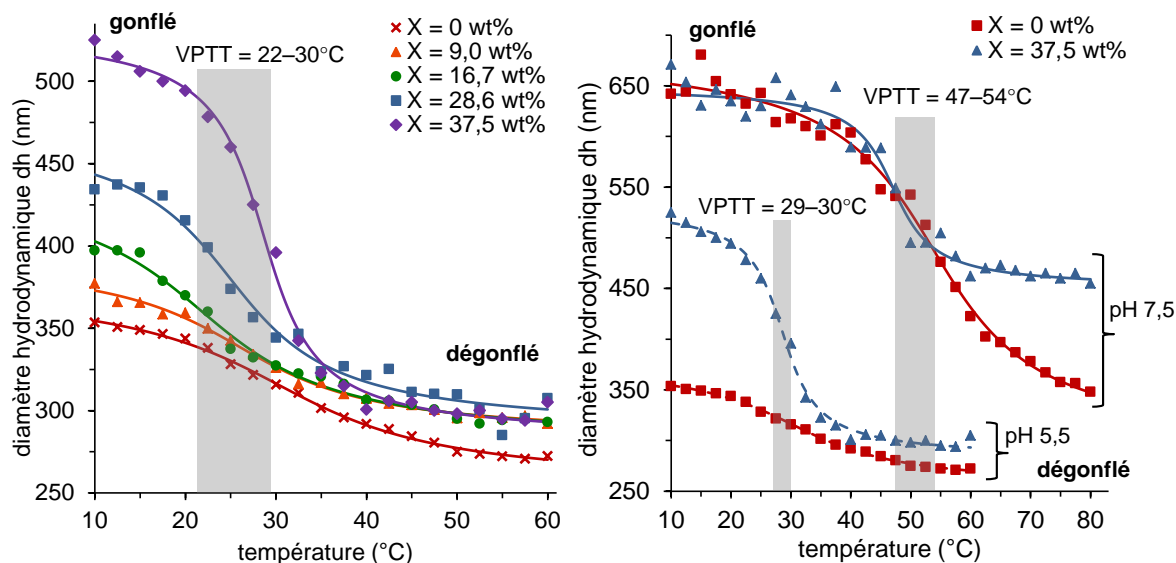


Figure 52. (a) Diamètre hydrodynamique (d_h) en fonction de la température de différents MagNanoGels-X % dans l'eau (pH 5,5) et (b) dans l'eau (pH 5,5) et dans un milieu physiologique (solution tampon d'HEPES à 0,1 M, pH 7,5) mesurés par DLS. Les données expérimentales (points) sont modélisées par la méthode des moindres carrés avec une fonction de type arc tangente (lignes), telle que $y = a \cdot (1 - \arctan[d \cdot x - b]) + c$.

L'effet de la température sur la taille des MagNanoGels a également été observé par cryo-TEM. Pour cela, une goutte de la dispersion de nanogels à analyser est déposée sur une grille de carbone avec des trous (Quantifoil®, Micro Tools GmbH) et rapidement congelée en la plongeant dans de l'éthane liquide. Les images sont enregistrées avec une caméra (Gatan) à couplage de charge Ultrascan 2k (CCD). La distribution de taille est obtenue à partir de l'analyse des images cryo-TEM avec le logiciel ImageJ et ajustée avec une loi log-normal ($n = 80$ particules) comme pour les images TEM. Comme observé sur les images de la Figure 53, le diamètre moyen d_{cryoTEM} diminue de 396 à 369 nm en chauffant de 25 à 50 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta d_{\text{moy}} = 27$ nm). Cette variation est plus faible que celle observée par DLS ($\Delta d_{\text{moy}} = 162$ nm – Tableau 9). À $T = 25$ $^{\circ}\text{C}$ ($T < \text{VPTT}$), les nanogels sont hydrophiles et gonflés dans l'eau, alors qu'à $T = 50$ $^{\circ}\text{C}$ ($T > \text{VPTT}$), les nanogels deviennent hydrophobes et leur volume diminue. Les images de cryo-TEM montrent un contact entre les nanogels, qui est amplifié à 50 $^{\circ}\text{C}$ par rapport à 25 $^{\circ}\text{C}$ en raison du dégonflement. De même, il est observé une localisation des NPMs préférentiellement sur le pourtour des nanogels, en comparaison de leur intérieur, qui apparaît moins contrasté.

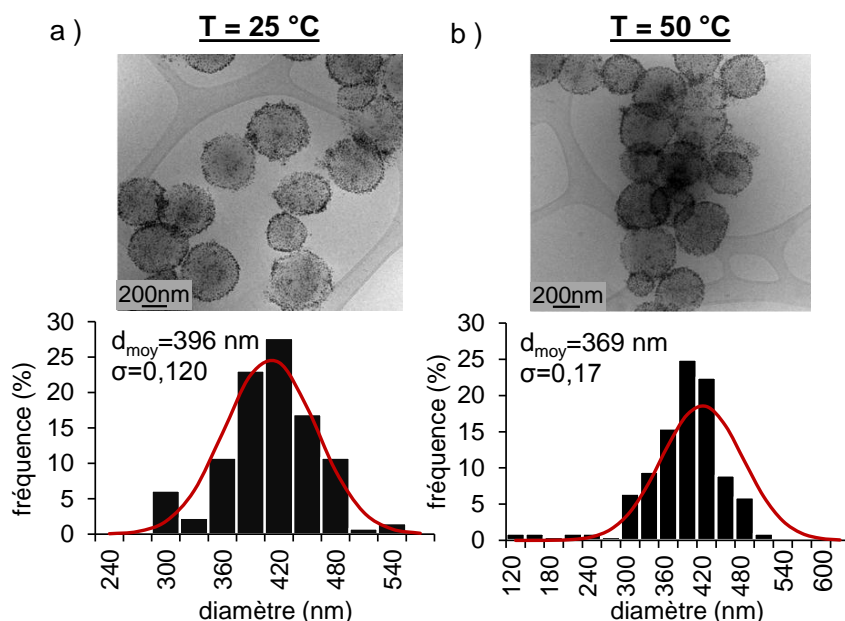


Figure 53. Clichés cryo-TEM de MagNanoGels-37.5 % (a) à T = 25 °C et (b) à T = 50 °C (chauffage dans une étuve – $\Delta d \approx 27 \text{ nm}$). La distribution en taille est obtenue à partir du traitement des plusieurs images cryo-TEM (logiciel ImageJ) et ajustée par une loi log-normale (courbe rouge). Erreur-type basé en $n = 80$ particules.

3.2 Effet du pH

Nous avons étudié l'effet du pH sur la taille des nanogels. Dans l'eau distillée (pH 5,5), tous les nanogels sont chargés négativement dû à la déprotonation de certains groupements carboxyle ($-\text{COO}^-$). Plus des NPMs sont ajoutées dans la matrice polymère, plus le potentiel zéta (ζ) augmente, avec ζ égal à -35,4 ; -32,6 ; -29,8 ; -29,4 et -24,7 mV respectivement pour $X = 0$; 9,0 ; 16,7 ; 28,6 et 37,5%. Lorsque le pH augmente, un déplacement de la valeur de la VPTT vers de plus hautes températures est observé. La VPTT de MagNanoGels-37,5 % augmente de 28,6 à 47,0 °C, en changeant le pH de 5,5 à 7,5 (Figure 52b), ils sont donc pH-sensibles. Cet effet du pH est dû à la présence des fonctions carboxyles ($-\text{COOH} / -\text{COO}^-$) dans le réseau polymère. Puisque la VPTT des nanogels est supérieure à 37 °C (température moyenne du corps humain) dans les conditions physiologiques (pH 7,5), ces nanogels peuvent être utilisés dans des applications biomédicales, en tant que nouveaux systèmes de libération contrôlée du principe actif d'un médicament.

En conclusion, les groupements carboxyles sont essentiels pour la structure et les propriétés physico-chimiques des nanogels hybrides magnétiques. Ils permettent : (1) d'encapsuler des nanoparticules d'oxyde de fer dans la structure polymère par

complexation des atomes de fer à la surface des NPMs, (2) d'augmenter la valeur de la VPTT des copolymères en OEGMAs afin d'avoir une température supérieure à 37 °C dans des conditions physiologiques (pH 7,5) en augmentant le caractère hydrophile des nanogels, (3) d'avoir des nanogels pH-sensibles et (4) d'encapsuler des molécules (par exemple, un principe actif) au sein de la matrice polymère par des interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogène.

Les principaux paramètres physico-chimiques des différents nanogels magnétiques synthétisés sont regroupés dans le Tableau 9.

Tableau 12. Principales caractéristiques des MagNanoGels-X % chargés avec différentes ratios massiques X (X = 0 à 37,5 %) à pH 5,5 et 7,5.

X (%m)	pH 5,5					pH 7,5	
	0	9,0	16,7	28,6	37,5	0	37,5
d_h à 25°C (nm) (PDI)	328 (0,021)	342 (0,086)	337 (0,107)	374 (0,132)	460 (0,364)	643 (0,087)	584 (0,371)
d_h à 50°C (nm) (PDI)	275 (0,037)	295 (0,039)	295 (0,047)	310 (0,115)	298 (0,312)	542 (0,078)	495 (0,367)
Q	1,70	1,56	1,50	1,76	3,68	1,66	1,64
ζ (mv)	-35,43	-32,63	-29,80	-29,35	-24,67	-12,67	-10,62
VPTT (°C)	30,31	25,95	21,75	24,91	28,57	53,54	47,01

*Le diamètre hydrodynamique (d_h) et l'indice de polydispersité (PDI) à 25 et 50 °C ; le taux de gonflement (Q), le potentiel zéta (ζ) et la Température de Transition de Phase volumique (VPTT) ont été mesurés par DLS.

3.3 Effet du champ magnétique

3.3.1 Propriétés magnétiques

La courbe d'aimantation des MagNanoGels-37,5 % mesurée par SQUID confirme les propriétés superparamagnétiques de ces nanogels (Figure 54a). La valeur de l'aimantation à saturation M_s des MagNanoGels-37,5 % contenant [Fe] = 11,5 mM est de 96 emu.g⁻¹ à 50 kOe. Cette valeur est semblable à celle des NPMs seules en solution (98 emu.g⁻¹), donc la valeur M_s des nanoparticules magnétiques demeure intacte après l'encapsulation des nanoparticules dans la matrice polymère. Par ailleurs, les MagNanoGels-X % avec X < 50 %m, sont bien dispersés dans l'eau si aucun champ permanent ou alternatif n'est appliqué. Comme le montre la Figure 54b, les nanogels peuvent être attirés par un aimant permanent. En réponse au gradient de champ magnétique, les MagNanoGels vont se déplacer et se concentrer sur la paroi du flacon près de l'aimant. Cette technique, dite de « décantation

magnétique », a été utilisée pour la purification des nanogels magnétiques après leur synthèse. En outre, les nanogels s'agrègent sous un champ magnétique alternatif (AMF), mais ce phénomène est réversible et les nanogels peuvent être redispersés dans la solution si l'AMF est arrêté (Figure 54c).

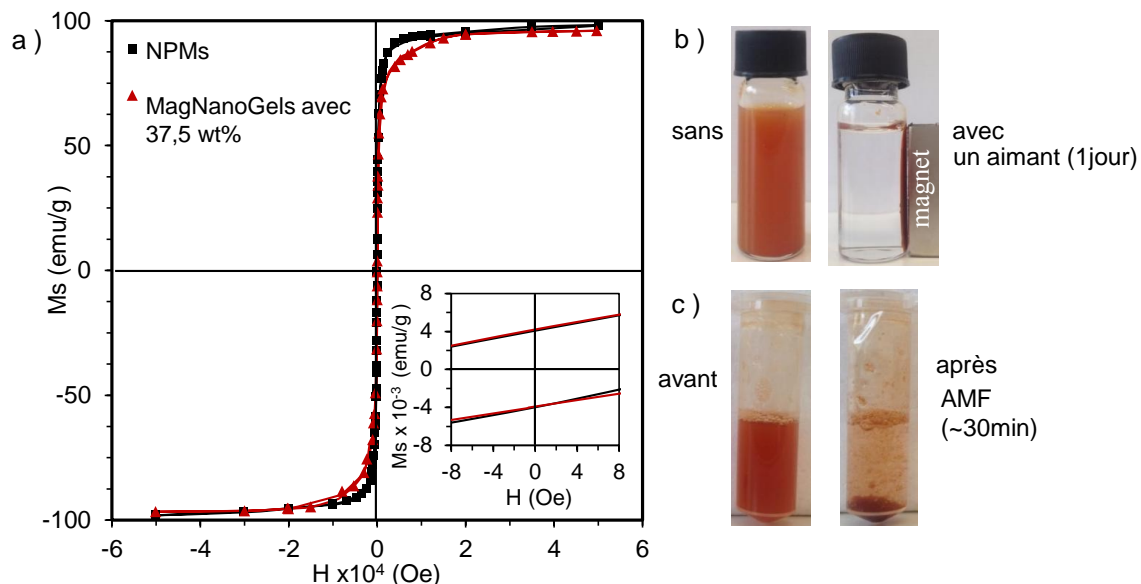


Figure 54. (a) Courbes d'aimantation de NPMs et de MagNanoGels-37,5 % à 298 K mesurées par SQUID et comportement magnétique de ces nanogels en présence de (b) un aimant permanent (Nd-Fe-B, 1,22-1,26 T) et (c) un champ magnétique alternatif (AMF, 335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹).

3.3.2 Propriétés d'hyperthermie magnétique

Afin d'évaluer l'efficacité des MagNanoGels-37,5 %m en tant que source d'hyperthermie magnétique, le pouvoir chauffant de ces nanogels a été mesuré en suivant le même protocole que celui utilisé pour les NPMs. La pente utilisée pour le calcul de SLP est celle des 30 premières secondes de la courbe $\Delta T = f(\text{temps})$ pour l'échantillon ayant la concentration en fer la plus élevée (courbe bleu, Figure 55b). À 335 kHz, la valeur de SLP des MagNanoGels-37,5 % est proche de celle obtenue précédemment pour les NPMs ($SLP_{\text{nanogels}} = 55 \text{ W.g}^{-1} \text{ Fe}$ et $SLP_{\text{MNP}} = 47 \text{ W.g}^{-1} \text{ Fe}$). Par conséquent, les NPMs conservent leur propriété d'hyperthermie magnétique après avoir été encapsulées dans les nanogels.

Comme illustré Figure 55a, la température de la dispersion de MagNanoGels-37,5% la plus concentrée ($[\text{Fe}] = 0,168 \text{ M}$, $\phi = 1,8\%$) augmente drastiquement de 20 à 30 °C ($\Delta T = 10 \text{ °C}$) après avoir été exposés à l'AMF pendant 30 min (335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹). Pour une solution 2 fois moins concentrée, la température augmente de 20 à 29 °C ($\Delta T = 9 \text{ °C}$); et pour une solution diluée 20 fois, la température augmente uniquement de

2 °C. Pour une durée plus courte d'exposition à l'AMF (2 min, Figure 55b), la température atteinte est plus faible.

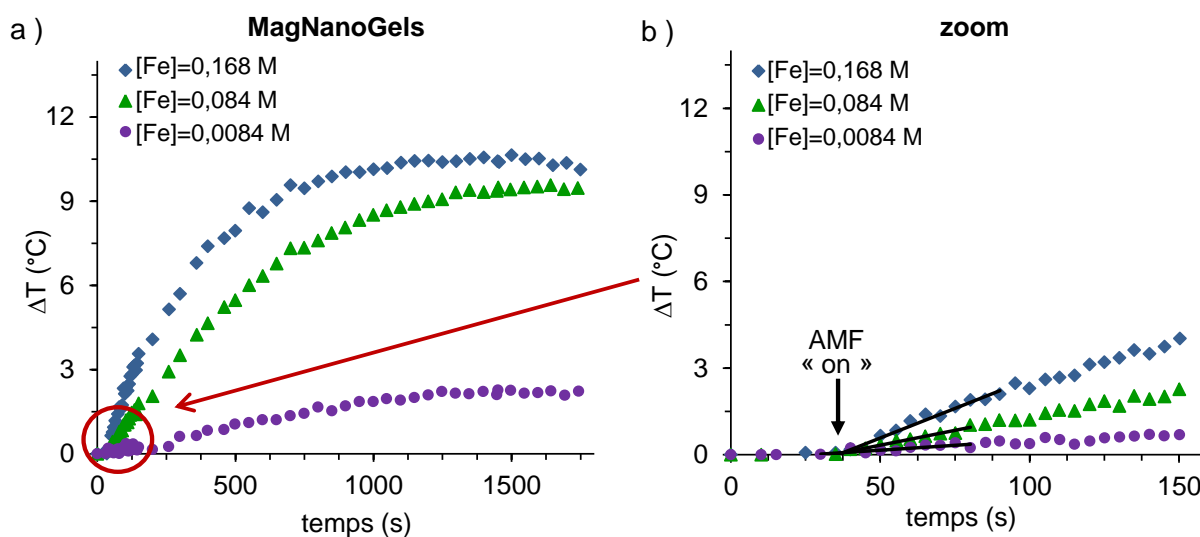


Figure 55. Évolution de la température de dispersions de (a) MagNanoGels-37,5 % à pH 5,5, à différentes concentrations en fer sous AMF (335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹) pendant 30 min. (b) Zoom du graphe (a) permettant de visualiser la pente pour le calcul de SLP.

Pour la suite des expériences, nous avons utilisé des dispersions de MagNanoGels très diluées afin d'éviter une élévation globale de la température de la solution et d'étudier la possibilité de contrôler à distance la transition de « gonflement – dégonflement » des nanogels magnétiques sous AMF en conditions athermiques, c'est-à-dire sans dégagement de chaleur à l'échelle macroscopique.

3.3.3 Influence du champ magnétique alternatif sur la taille des MagNanoGels

La variation du diamètre hydrodynamique de MagNanoGels-37,5 % ([nanogels] = 2,9 mg.mL⁻¹; ([Fe] = 8,4 mM) avant et après application d'un champ magnétique alternatif (335 kHz, 9 mT, 12.0 kA.m⁻¹) a été déterminée par DLS. Ne possédant pas un appareil permettant de mesurer simultanément le d_h lors de l'application d'AMF, l'échantillon a été placé successivement à l'intérieur de la bobine magnétique du Magnetherm, et à l'intérieur de la DLS, en réduisant au maximum le temps entre ces deux étapes. Lors de l'application d'AMF, la température de l'échantillon est mesurée *in situ* à l'aide d'un thermomètre à fibre optique non métallique.

Pour 1 mL de dispersion de MagNanoGels-37,5 %m, la température globale de la solution n'augmente pas sous AMF (conditions athermiques). En outre, le d_h diminue de 301 à 273 nm (ie. diminution de 9% ; $\Delta d_h = 28$ nm) après application d'un AMF pendant 30 min.

Ces résultats suggèrent que les chaînes de polymère deviennent hydrophobes et se contractent sous un champ magnétique alternatif et dans des conditions athermiques. Ainsi la longueur des chaînes diminue, provoquant le rapprochement des nanoparticules magnétiques à l'intérieur des nanogels. Ceci démontre que sous AMF, les NPMs contenues dans les nanogels se comportent en tant que sources de chaleur ponctuelles ou *hot spot*, en produisant de la chaleur de manière locale et que cette chaleur est suffisante pour provoquer le dégonflement de la matrice polymère. Il faut prendre en compte que le d_h mesuré par DLS est supérieur à celui atteint sous AMF, dû au temps qui s'écoule (3 min) entre ceux deux actions.

Cette diminution du diamètre des MagNanoGels sous AMF a également été mesurée par cryo-TEM et par analyse du suivi individuel de particules (NTA, *Nanoparticle Tracking Analysis*). En ce qui concerne l'analyse cryo-TEM, l'échantillon est soumis à un AMF (335 kHz, 9 mT, 12.0 kA.m⁻¹) pendant 30 min. Puis une goutte de cette dispersion est déposée sur une grille de carbone et rapidement plongée dans de l'éthane liquide pour figer les nanogels. De même, une grille contenant un échantillon n'ayant pas été soumis à l'AMF est analysée par cryo-TEM. Ces étapes doivent être effectuées le plus rapidement possible pour avoir une image le plus proche du moment où les nanogels sont soumis au champ magnétique alternatif. L'analyse de la distribution en taille des nanogels est ensuite effectuée sur plusieurs images ($n = 100$ particules) avec le logiciel ImageJ et modélisée par une loi log-normale.

Comme le montre la Figure 56a, avant d'appliquer un AMF, les NPMs sont réparties sur toute la surface des MagNanoGels-37,5 % et principalement entre les chaînes polymères dans la « chevelure » des nanogels. Après application de l'AMF, le diamètre moyen des MagNanoGels-37,5 % diminue de 462 à 430 nm, correspondant à une diminution de 7% ; $\Delta d = 32$ nm et les NPMs se rapprochent de la surface des nanogels en formant une « couronne », en accord avec le caractère thermosensible des chaînes de polymère constituant les nanogels. On remarque par ailleurs que la diminution du d_{moy} des nanogels les plus chargés en NPMs ($X = 66,7$ %m) est moindre, de 367 à 352 nm (correspondant à une diminution de 4% ; $\Delta d \approx 15$ nm, Figure 56c). Ces nanogels, qui ressemblent à des capsules avec une coquille très dense, ont une structure plus rigide due au grand nombre de NPMs dans le gel, ce qui limite leur diminution de diamètre. Les MagNanoGels sont donc *magnéto-thermosensibles*. Il faut noter que cette diminution de la taille des nanogels est observée sans élévation macroscopique de la température (conditions athermiques).

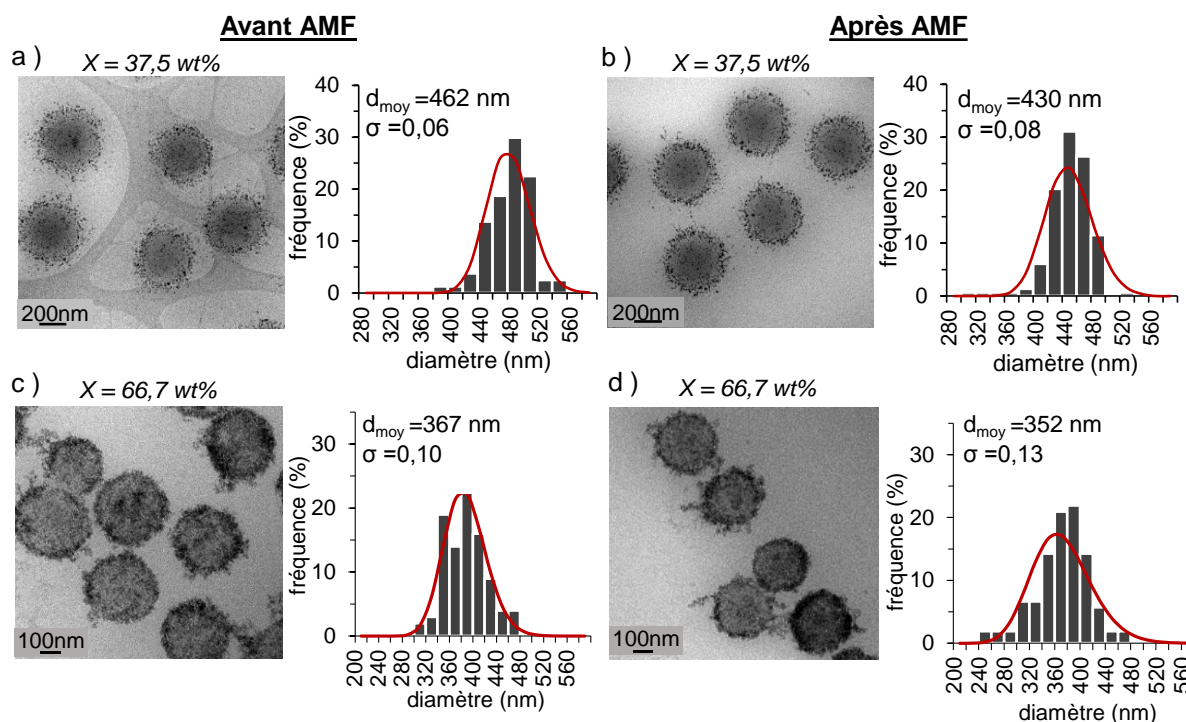


Figure 56. Clichés de cryo-TEM de MagNanoGels-37,5 % et de MagNanoGels-66,7 % (a, c) avant et (b, d) après application d'un AMF (335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹, 30 min).

Par ailleurs, il est intéressant de comparer les images en cryo-TEM des nanogels magnétiques chauffés de manière macroscopique (étuve à 50 °C ; Figure 53), à celles des nanogels chauffés localement par hyperthermie magnétique (AMF ; Figure 56). En comparant ces images, on constate que les MagNanoGels chauffés de manière globale (échelle macroscopique) sont plus ou moins déformés, et que certains d'entre eux se contractent plus que d'autres. Au contraire, lorsqu'ils sont chauffés de manière locale par hyperthermie magnétique (échelle nanométrique), les MagNanoGels se contractent en gardant leur forme sphérique. Cela peut s'expliquer par différents mécanismes de diffusion thermique. Lors du chauffage macroscopique, la chaleur diffuse de l'extérieur vers l'intérieur du réseau de polymère, alors que durant le chauffage magnétique, chaque nanoparticule magnétique se comporte comme une source de chaleur. Dans ce cas, si les NPMs sont distribuées de façon uniforme à l'intérieur des nanogels, alors la chaleur sera répartie de manière homogène dans toute la matrice polymère.

Une analyse de la taille des nanogels a également été réalisée par NTA avec un appareil NanoSight LM10 (Malvern), composé d'un microscope (grossissement x20), d'une caméra, d'un faisceau lumineux (laser) et d'une chambre pour déposer l'échantillon.

De même que pour les analyses précédentes (DLS, cryo-TEM), une diminution du diamètre des MagNanogels est observée après application d'un champ magnétique alternatif. Ainsi, le diamètre diminue de 152 à 130 nm ($\Delta d_h = 22$ nm). Contrairement à la DLS, dont la mesure du d_h moyen peut être biaisée par l'intensité des plus grosses particules pour un échantillon polydisperse, la NTA permet une meilleure résolution en mesurant le d_h de chaque particule individuellement et détecte les plus petites particules. Les résultats sont présentés par tranches, dites « déciles » ; D10, D50 et D90 correspondent respectivement à 10, 50 et 90% des nanogels présents dans la dispersion. De ce fait, 10% des nanogels présents dans le lot MagNanoGels-37,5 ont un diamètre de 43 nm qui semble légèrement augmenter en présence d'un AMF (de 43 à 48 nm ; $\Delta d_h = 5$ nm). Par contre, 50% des nanogels ont un diamètre de 126 nm qui diminue jusqu'à 109 nm (diminution de 13%, $\Delta d_h = 17$ nm). Enfin, le diamètre de 90% des nanogels présents dans l'échantillon diminue de 276 à 225 nm, soit une diminution de 18,5% ($\Delta d_h = 51$ nm). Cependant, même si la résolution de la NTA est meilleure, la reproductibilité des expériences par rapport à celle de la DLS est moindre, car le calcul des d_h est fait sur un nombre de particules plus faible. L'histogramme de la Figure 57 regroupe les d_h des MagNanoGels-37,5 % avant et après application d'un champ magnétique alternatif et mesurés par DLS, cryo-TEM et NTA.

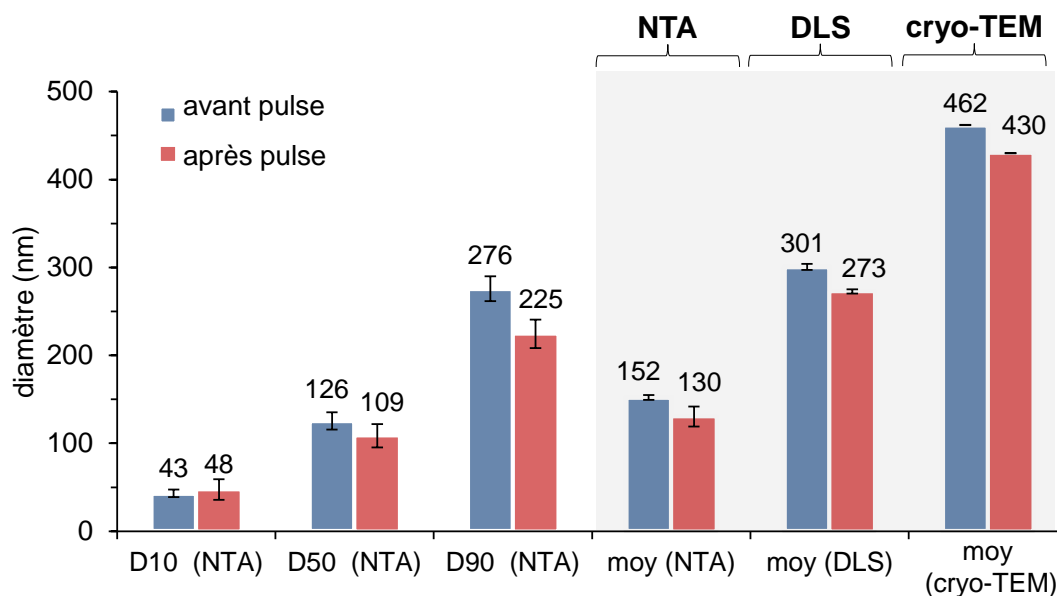


Figure 57. Histogramme de comparaison des valeurs du diamètre hydrodynamique (d_h) des MagNanoGels-37,5 % mesuré par NTA, DLS et cryo-TEM. Le d_h est mesuré avant (en bleu) et après l'application d'un champ magnétique alternatif (AMF : 335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹, en rouge).

Pour améliorer ces mesures, il faudrait modifier la configuration actuelle de la DLS en fabriquant un nouveau dispositif permettant de positionner la zone de mesure le plus proche

possible du laser, afin de mesurer le d_h *in situ*. Pour cela, on pourrait s'inspirer du dispositif mis en place par Hemery G. et al. permettant de positionner la tête de mesure de la DLS le plus proche possible d'une bobine magnétique pour mesurer *in situ* la variation de d_h après l'application d'une AMF²⁰.

4. Libération contrôlée de doxorubicine encapsulée dans les MagNanoGels sous stimuli

La prise de médicaments, indispensable pour soigner la plupart de maladies, peut générer des effets secondaires. Un effet secondaire est une réaction non voulue causée par la prise d'un médicament, qui peut se manifester sous forme de gêne ou d'allergie médicamenteuse passagère, mais qui peut aussi être néfaste pour la santé (toxicité). Une stratégie pour réduire ces effets indésirables est d'encapsuler autant que possible le médicament lors de son transport vers l'organe à soigner et de le libérer uniquement à l'endroit et au moment voulu (contrôle spatio – temporel). Dans ce but, les nanovecteurs à base de polymères ont été largement étudiés comme « systèmes à délivrance de médicaments » (DDS, de l'anglais *Drug Delivery Systems*) pour diverses maladies, notamment pour le traitement du cancer, car ils peuvent encapsuler de grandes quantités de molécules chimio-thérapeutiques et les transporter jusqu'aux tumeurs. De plus, en choisissant leur composition au début de la synthèse, il est possible de sélectionner le stimulus qui déclenchera la libération des molécules. Il existe des stimuli internes, propres à l'environnement intracellulaire, tels que la température, le pH, les réactions d'oxydo-réduction ; et des stimuli externes tels qu'un rayonnement proche infrarouge (NIR-L), les ultrasons (US) et le champ magnétique alternatif (AMF)²¹⁻²⁴.

Récemment, la préparation de nanovecteurs intelligents multi-stimulables, combinant deux stimuli ou plus, a suscité l'attention des chercheurs²⁵⁻²⁷. Particulièrement, les nanosystèmes combinant la sensibilité au pH et à un deuxième stimulus (interne ou externe) sont très intéressants pour les thérapies de lutte contre le cancer. En effet, les cellules cancéreuses ont un microenvironnement acide (pH 4,5 – 6,5), alors que les cellules normales ont un environnement physiologique, légèrement alcalin (pH 7,5). De plus, la mise en place d'un stimulus externe permet de déclencher à distance et à volonté la libération d'un principe actif, en assurant un contrôle spatio-temporel, dans ce cas, on parle de « Systèmes de

délivrance de médicaments contrôlée à distance » (RC-DDS, de *Remotely–Controlled Drug Delivery Systems*)²⁸. Ainsi, il est possible de réguler la quantité de molécules libérées et d'améliorer l'efficacité thérapeutique, tout en limitant les risques de toxicité systémique.

Nous avons démontré que les nanogels hybrides magnétiques élaborés lors de cette thèse (MagNanoGels) sont multi-stimulables. Ainsi, leur diamètre hydrodynamique peut être modifié en faisant varier le pH, la température et le champ magnétique alternatif. De plus, ils sont capables d'encapsuler et de libérer une grande quantité d'eau grâce à leur matrice en polymères réticulés. Par conséquent, ils devraient pouvoir encapsuler des molécules solubles dans l'eau (hydrophiles) et les libérer lors de l'application d'un ou plusieurs stimuli (Figure 58). Afin de montrer que les MagNanoGels peuvent être utilisés en tant que RC-DDS, une quantité importante de doxorubicine (DOX) a été encapsulée dans les nanogels et leurs réponses à plusieurs stimuli, tels que la température, le pH et le champ magnétique alternatif (AMF) ont été étudiées *en solution* (batch) et dans des cellules cancéreuses.

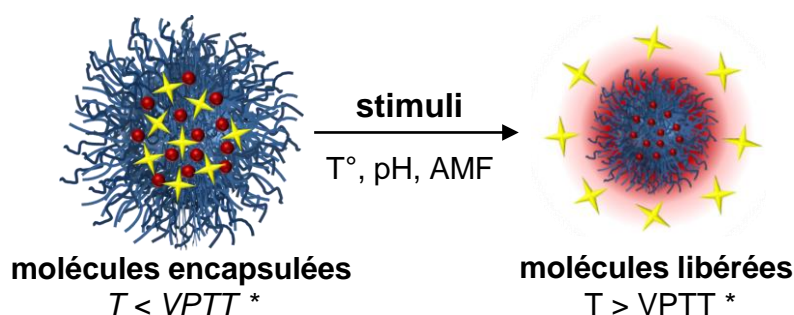


Figure 58. Schéma illustrant l'encapsulation des molécules (symbolisées par des étoiles jaunes) à l'intérieur des MagNanoGels et leur libération lors de l'application de stimuli tels que la température (T°), le pH et le champ magnétique alternatif (AMF) (*VPTT : *Volume Phase Temperature Transition*).

4.1 Matériel

Une solution tampon légèrement alcaline (pH 7,5) d'hépes hémisodique (ou sel de sodium de l'acide sulfonique 4-(2-Hydroxyéthyle)piperazine-1-éthane ; HEPES à 0,1 M – Sigma - Aldrich), une solution tampon d'acide citrique (mélange d'acide citrique à 0,05 M et de phosphate de sodium à 0,1 M – Sigma-Aldrich) et de la doxorubicine chlorohydratée (DOX – Sigma-Aldrich) ont été utilisées pour les études de libération de molécules en solution (batch). Tous les produits ont été utilisés tels que reçus sans purification.

4.2 Encapsulation de doxorubicine dans les MagNanoGels

Les MagNanoGels, constitués d'un réseau 3D de polymères-OEGMAs réticulés, sont des nanogels hydrophiles. Ainsi, pour les études d'encapsulation et libération de molécules dans les MagNanoGels, nous avons choisi comme molécule modèle la doxorubicine chlorohydratée (DOX). Cette molécule est hydrophile, contrairement à la doxorubicine non chlorohydratée (hydrophobe); elle peut donc être encapsulée à l'intérieur des MagNanoGels. La DOX, dont la structure chimique est donnée Figure 59a, est l'un des principes actifs anticancéreux les plus couramment utilisés dans la chimiothérapie de divers types de cancer. Appartenant à la famille des anthracyclines, la doxorubicine, également appelée adriamycine (n° CAS : 23214-92-8 ; $M_{\text{DOX}} = 543,52 \text{ g.mol}^{-1}$), est un agent intercalant des bases de l'ADN. De plus, la DOX inhibe les enzymes impliquées dans le maintien de la structure de l'ADN, empêchant la réplication de l'ADN des cellules cancéreuses.

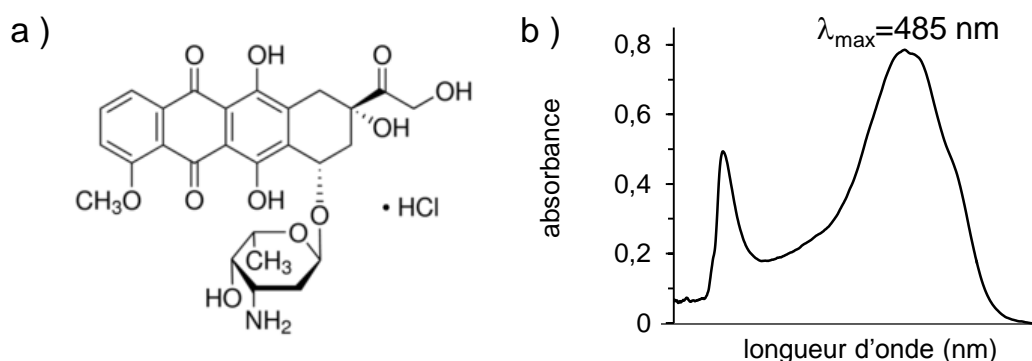


Figure 59. (a) Structure chimique de la doxorubicine chlorohydratée (DOX). (b) Spectre d'absorption de la DOX ; $\lambda_{\text{max}} = 485 \text{ nm}$ est le maximum d'absorption utilisé pour tracer la courbe de calibration.

Bien que permettant de traiter le cancer, la DOX, comme tous les médicaments anticancéreux, peut avoir des effets néfastes sur le corps humain. Elle peut provoquer une toxicité de l'appareil digestif (des nausées, des vomissements, des diarrhées), une cardiotoxicité (toxicité du cœur), une néphrotoxicité (toxicité des reins). Elle peut aussi engendrer une myélosuppression (diminution plus ou moins sévère des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes dans le sang) et la chute des cheveux des patients. C'est pour cela que l'encapsulation de la DOX dans des nanovecteurs à base de polymères (polymersomes, dendrimères, polymères à empreinte moléculaire, nanogels) ou de lipides (liposomes, notamment la LipoDox, produit commercial) s'avère être une solution pour réduire les effets secondaires.^{29,30} La DOX, étant hydrophile, devrait pouvoir être encapsulée à l'intérieur des nanogels lorsque la matrice polymère est hydrophile ($T < V_{\text{PTT}}$) et expulsée

vers l'extérieur des nanogels lorsque les chaînes polymères les constituant deviennent hydrophobes ($T > VPTT$).

Par ailleurs, la DOX est un très bon modèle de molécule thérapeutique car elle possède des propriétés d'absorbance (en solution aqueuse, elle est de couleur rouge), ainsi il est possible de quantifier la concentration de DOX en solution par spectrophotométrie UV-visible. En outre, elle possède des propriétés de fluorescence ($\lambda_{ex} = 488$ nm, vert et $\lambda_{em} = 595$ nm, rouge), il est donc possible de déterminer la localisation des molécules de DOX *in vitro* dans des cellules en utilisant un microscope confocal en fluorescence³¹.

Le protocole d'encapsulation de la DOX est schématisé Figure 60. La DOX est encapsulée dans les MagNanoGels par simple diffusion osmotique à travers la matrice polymère à température ambiante et à pH 7,5 (dans un tampon d'HEPES à 0,1 M). La stabilité chimique de la DOX dans des solutions tampon a déjà été étudiée dans la littérature³². La meilleure condition de stockage de la DOX en solution, permettant de garder une stabilité à long terme, est de préparer une solution en milieu acide ($pH < 4$) et de la conserver à basse température ($4 - 6$ °C). Par conséquent, les solutions tampon de DOX à pH 7,5 sont fraîchement préparées avant chaque expérience d'encapsulation.

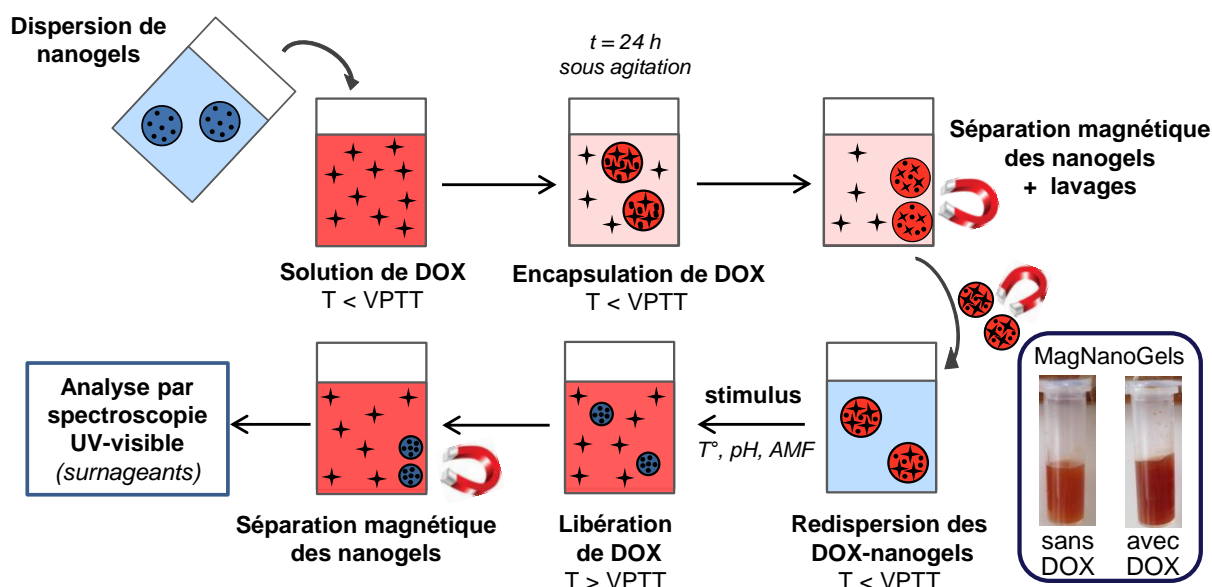


Figure 60. Schéma décrivant le protocole d'encapsulation de la doxorubicine (DOX) dans les MagNanoGels. L'analyse par spectroscopie UV-visible des divers surnageants permet de déterminer le taux d'encapsulation, ainsi que la quantité de DOX libérée au cours du temps.

Protocole : Tout d'abord, $72 \mu\text{L}$ d'une solution de DOX à 1 mg.mL^{-1} et pH 7,5 est ajoutée dans 1 mL d'une dispersion de MagNanoGels ($[\text{Fe}] = 8,36 \text{ mM}$; $[\text{nanogels}] = 2,94 \text{ mg.mL}^{-1}$, pH 7,5) et le mélange est agité pendant 24 heures. Ensuite, l'excès de DOX (les molécules non encapsulées et

encore libres dans la solution ; ainsi que les molécules adsorbées à la surface des nanogels) est éliminé par des lavages et des séparations magnétiques successifs, jusqu'à ce qu'il ne reste plus de DOX dans le surnageant. Pour chaque décantation magnétique, l'échantillon est posé près d'un aimant (Nd-Fe-B) pendant 10 min, puis le surnageant est enlevé et remplacé par le même volume de solution fraîche d'HEPES (1 mL). Tous les surnageants sont ensuite analysés par spectrophotométrie UV-visible et la quantité de DOX non encapsulée dans les nanogels est calculée en utilisant la courbe de calibration de la DOX dans une solution tampon d'HEPES (Figure 61) et en additionnant les valeurs de tous les surnageants. Enfin, la quantité de DOX encapsulée dans les nanogels, ainsi que l'efficacité d'encapsulation (%) sont calculées (Équations 12 et 13 respectivement).

Les nanogels magnétiques encapsulant la doxorubicine sont notés DOX-MagNanoGels.

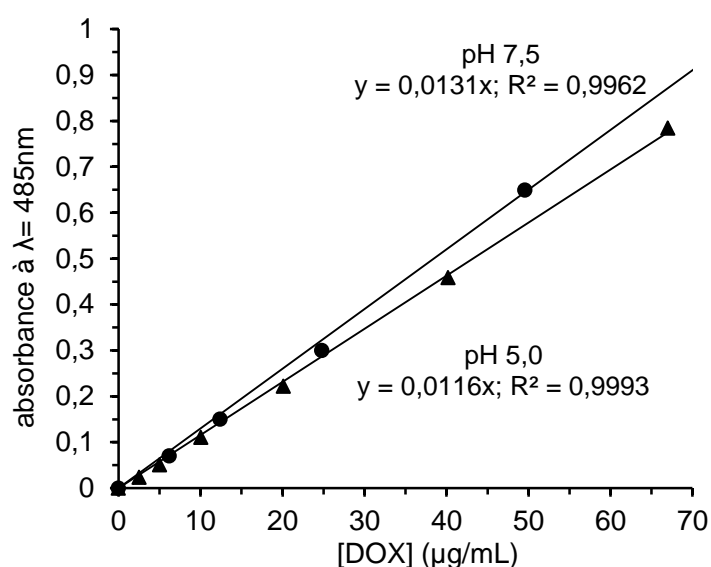


Figure 61. Courbe de calibration de l'absorbance de la doxorubicine (avec $\lambda_{\text{DOX}} = 485 \text{ nm}$) en fonction de la concentration de solutions standards de DOX dans deux solutions tampon : en milieu physiologique (pH 7,5 ; HEPES de sodium à 0,1 M) et en milieu acide (pH 5,0 ; 0,05 M acide citrique et 0,1 M phosphate de sodium)

$$DOX_{\text{encapsulée}} = \text{quantité initiale de DOX} - \text{quantité en excès de DOX} \quad \text{Eq. 25}$$

$$\text{Efficacité d'encapsulation (\%)} = \frac{DOX_{\text{encapsulée}}}{\text{quantité initiale de DOX}} \times 100 \quad \text{Eq. 26}$$

Toutes les expériences d'encapsulation ont été réalisées en utilisant 1 mL de solution d'HEPES contenant $2,94 \text{ mg.mL}^{-1}$ de MagNanoGels-37,5 %, $[\text{Fe}] = 8,36 \text{ mM}$ et $115,8 \text{ µM}$ de DOX initiale. Dans ces conditions, les DOX-MagNanoGels-37,5 % encapsulent $69,5 \text{ µM}$ de DOX, ce qui correspond à 63% d'efficacité d'encapsulation. Ces valeurs correspondent à une moyenne effectuée sur 10 expériences.

4.3 Libération de DOX des MagNanoGels par chauffage en bain thermostaté

La libération de la DOX encapsulée dans DOX-MagNanoGels-37,5 % en solution (batch) dans un tampon à pH 7,5 pour modéliser un milieu physiologique (HEPES de sodium à 0,1 M) et à différentes températures : 4, 25, 37, 50 et 70 °C a été étudiée. Pour cela, 1 mL d'une dispersion de DOX-MagNanoGels-37,5 % ([Fe] = 0,5 mM; [nanogels] = 0,16 mg.mL⁻¹; [DOX] = 4,4 µM, efficacité d'encapsulation = 63%) contenu dans un eppendorf est placé dans un bain d'eau à la température souhaitée (25, 37, 50 et 70 °C). La température du bain est régulée avec un thermomètre relié à une plaque chauffante. Pour l'expérience à basse température (4 °C), l'échantillon est placé dans un réfrigérateur. Tous les 30 min, et pour une durée totale de 4 heures, le surnageant est collecté par séparation magnétique, en rapprochant l'échantillon d'un aimant (Nd-Fe-B) pendant 5 min. Puis, il est analysé par spectrophotométrie UV-visible afin d'en déduire la quantité de DOX libérée. Après chaque analyse, 1 mL de solution fraîche de tampon à pH 7,5 est ajouté aux DOX-MagNanoGels. Chaque expérience a été effectuée trois fois et la moyenne des valeurs a été utilisée pour tracer les courbes de libération de DOX cumulée en fonction du temps.

Comme le montre la Figure 62, le relargage de DOX augmente lorsque la température globale du milieu est élevée. Après 4 heures, les MagNanoGels-37,5 % libèrent 17% (11,8 µM), 24% (16,7 µM), 32% (22,2 µM) et 36% (25,0 µM) de DOX à 23, 37, 50 et 70 °C respectivement. Le profil de libération de DOX à 37 °C et pH 7,5 (courbe jaune) correspond aux conditions physiologiques. Par ailleurs, la courbe correspondant à la libération de DOX à 4 °C (courbe bleu) montre que seulement 13% (9,0 µM) sont libérés après 4 heures. De plus, pour le même échantillon, après 1 mois à 4 °C, moins de 20% (13,9 µM) de DOX est libérée. Ces résultats montrent que les DOX-MagNanoGels peuvent être stockés efficacement à basse température.

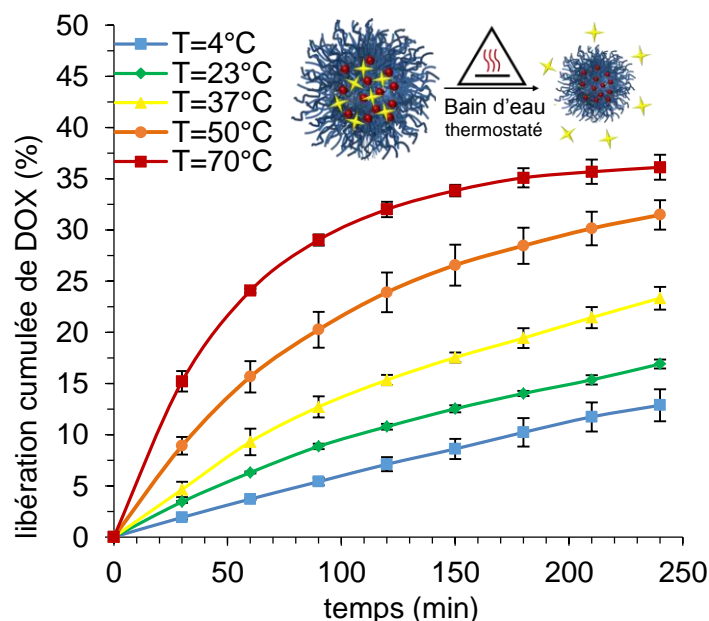


Figure 62. Profil de libération de la doxorubicine (DOX) en fonction du temps, contenue dans DOX-MagNanoGels-37,5 % ([Fe] = 8,4 mM) à pH 7,5 (tampon d'HEPES de sodium à 0,1 M) et à différentes températures (4, 23, 37, 50 et 70 °C). La quantité de DOX libérée est calculée à partir des mesures d'absorbance par spectrophotométrie UV-visible ($\lambda_{\text{DOX}} = 485 \text{ nm}$). L'erreur-type est basée sur $n = 3$ échantillons.

4.4 Libération de DOX par diminution du pH

Nous avons étudié la possibilité de déclencher la libération de DOX contenue dans DOX-MagNanoGels par une diminution du pH du milieu (stimulus interne). En effet, comme décrit précédemment, les cellules saines à l'intérieur du corps humain ont un environnement physiologique légèrement alcalin (pH 7,5), alors que les cellules cancéreuses ont un microenvironnement acide (pH 4,5 – 6,5). Ainsi, nous avons étudié la libération DOX dans deux solutions tampon de pH différent et à 37 °C : en milieu légèrement alcalin ou milieu physiologique à pH 7,5 (HEPES de sodium à 0,1 M) et en milieu acide à pH 5,0 (acide citrique à 0,05 M et phosphate de sodium à 0,1 M). Le même protocole de libération de DOX et d'analyse des surnageants détaillé précédemment est utilisé pour ces expériences.

Comme observé Figure 63, après 4 heures, à 37 °C et pH 7,5, seulement 24% (16,7 μM) de DOX est libérée, alors que lorsque le pH diminue de 7,5 à 5,0, la libération de molécules augmente drastiquement jusqu'à 96% (66,7 μM). Ainsi, la libération de DOX est réduite dans un environnement physiologique normal (pH 7,5) et lorsque les nanogels sont placés dans un milieu plus acide, le relargage de DOX est accéléré. Cet effet du pH peut être expliqué par des interactions électrostatiques entre la DOX et les MagNanoGels. À pH 7,5, la

libération de DOX est limitée par des interactions entre les fonctions carboxylates ($-\text{COO}^-$) des chaînes polymères chargées négativement et les groupements dérivés du cation ammonium ($\text{R}-\text{NH}_3^+$) de la DOX chargés positivement. À pH 5,0, la plupart des groupes carboxyles des MagNanoGels sont protonés ($-\text{COOH}$). Ceci réduit les interactions avec la DOX, mais également provoque la diminution du diamètre hydrodynamique (d_h) des nanogels, en augmentant ainsi l'expulsion des molécules hors de la matrice polymère. Ces résultats sont en accord avec divers travaux scientifiques récemment publiés et concernant des nanogels pH-sensibles fonctionnalisés avec des groupements carboxyles (à partir de monomères d'acide acrylique)^{26,33}. Cette réponse en pH des MagNanoGels est très importante et permet d'envisager des futures applications dans le traitement du cancer, grâce à l'acidité de l'environnement intracellulaire (par exemple, le pH des lysosomes est autour de 4,5).

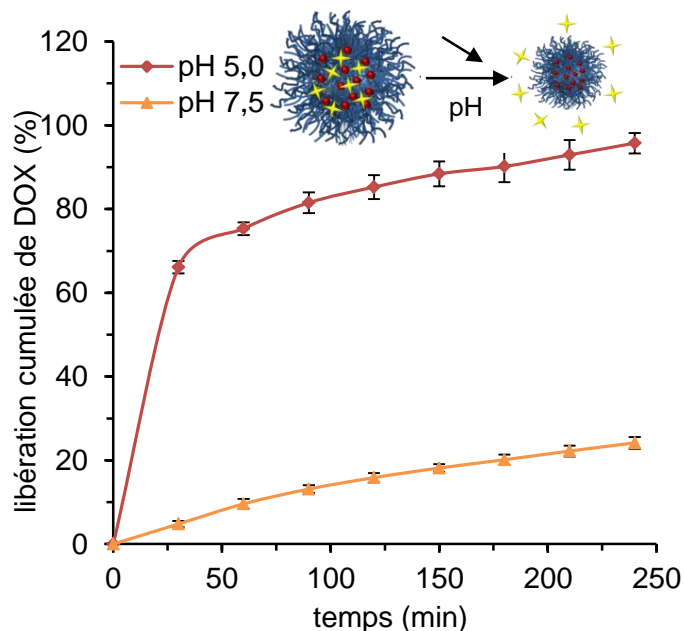


Figure 63. Profil de libération de la DOX en fonction du temps, contenue dans DOX-MagNanoGels-37,5 % ($[\text{Fe}] = 8,4 \text{ mM}$) en milieu légèrement alcalin (pH 7,5 ; tampon d'HEPES de sodium à 0,1 M) et en milieu acide (pH 5,0; 0,05 M acide citrique et 0,1 M phosphate de sodium) à 37 °C. La quantité de DOX libérée est calculée à partir des mesures d'absorbance par spectrophotométrie UV-visible ($\lambda_{\text{DOX}} = 485 \text{ nm}$). L'erreur-type est basée sur $n = 3$ échantillons.

4.5 Libération de DOX par application d'un champ magnétique alternatif

Nous avons démontré précédemment que, grâce à la présence de nanoparticules magnétiques (NPMs) dans la matrice polymère des gels, le d_h des MagNanoGels diminue en présence d'un AMF. Par conséquent, nous avons étudié la possibilité de déclencher à distance

la libération de doxorubicine encapsulée dans DOX-MagNanoGels lors de l'application d'un AMF (stimulus externe). Le même protocole de libération de DOX et d'analyse des surnageants que précédemment est utilisé mais ici l'échantillon est placé à l'intérieur de la source de champ magnétique alternatif, c'est-à-dire à l'intérieur de la bobine du système MagneTherm™ (Nanotherics) et 8 pulsations d'un AMF d'une durée de 30 min sont appliquées (AMF : 335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹). En outre, la température de l'échantillon est mesurée *in situ* avec un thermomètre à fibre optique non métallique et enregistrée tous les secondes. Comme le montre la Figure 64, le relargage de DOX est considérablement augmenté aux deux pH (5,0 ; 7,0) lorsqu'un champ magnétique alternatif est appliqué. Ainsi, après 4 heures à pH 7,5, les MagNanoGels libèrent deux fois plus de molécules sous AMF (47% – 32,7 μM vs. 24% – 16,7 μM) ; et à pH 5,0 toute la DOX est expulsée hors des nanogels sous AMF (100% – 69,5 μM vs. 96% – 66,7 μM).

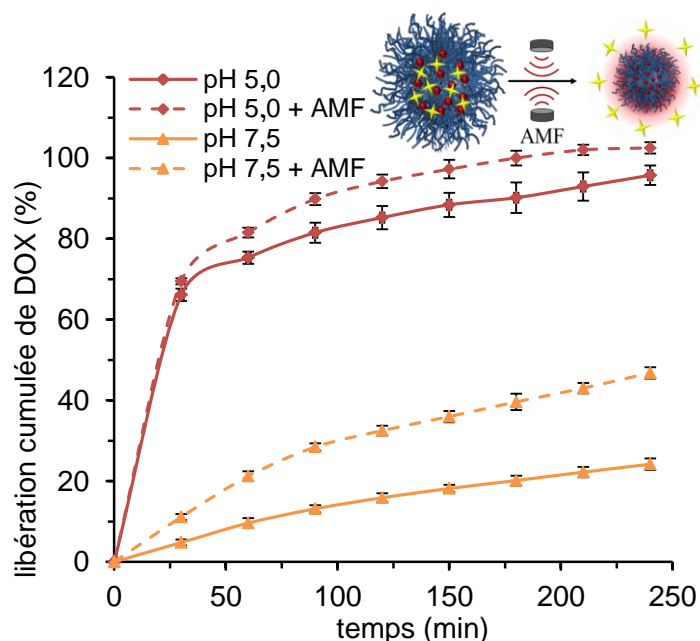


Figure 64. Profil de libération de la doxorubicine (DOX) en fonction du temps, contenue dans DOX-MagNanoGels-37,5 ([Fe] = 8,4 mM) en milieu légèrement alcalin (pH 7,5 ; tampon d'HEPES de sodium à 0,1 M) et en milieu acide (pH 5,0; 0,05 M acide citrique et 0,1 M phosphate de sodium) à 37 °C, avec ou sans AMF (chaque pulsation: 335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹, 30 min). La quantité de DOX libérée est calculée à partir des mesures d'absorbance par spectrophotométrie UV-visible ($\lambda_{\text{DOX}} = 485 \text{ nm}$). L'erreur-type est basée sur n = 3 échantillons.

Par ailleurs, si l'on augmente la fréquence et l'intensité du champ magnétique (471 kHz; 18 mT; 14,4 kA.m⁻¹), la quantité de DOX libérée augmente légèrement par rapport à celle libérée en présence d'un AMF à 335 kHz et 9 mT (Figure 65).

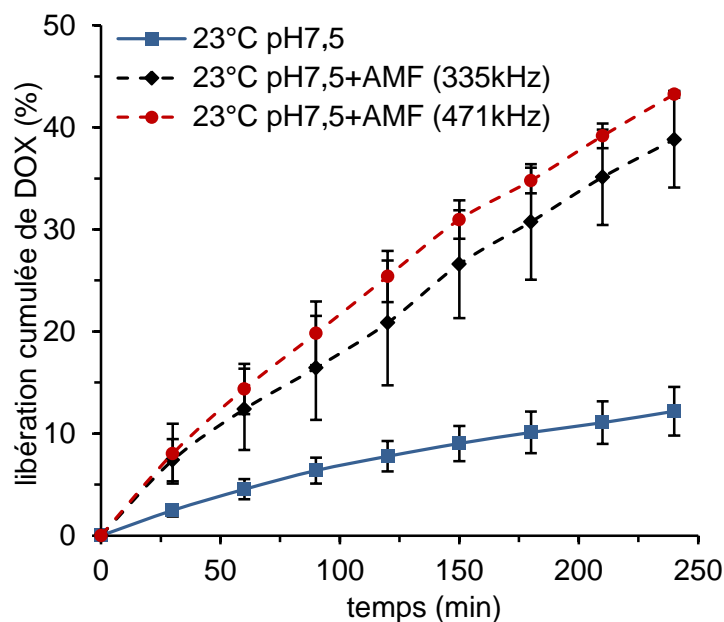


Figure 65. Profil de libération de la doxorubicine (DOX) en fonction du temps, contenue dans DOX-MagNanoGels-37.5 % ([Fe] = 8,4 mM) à 23 °C et pH 7,5 (HEPES de sodium à 0,1 M), avec ou sans AMF (pulsations de 30 min) à 335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹ et à 471 kHz; 18 mT; 14,4 kA.m⁻¹. La quantité de DOX libérée est calculée à partir des mesures d'absorbance par spectrophotométrie UV-visible ($\lambda_{\text{DOX}} = 485 \text{ nm}$). L'erreur-type est basée sur n = 3 échantillons.

Durant toutes les expériences sous AMF, la température de l'échantillon a été mesurée à l'aide d'un thermomètre à fibre optique non métallique et comme prévu aucune élévation macroscopique de la température n'a été détectée. En effet, nous avons utilisé des dispersions très diluées en MagNanoGels, et donc diluées en nanoparticules d'oxyde de fer, afin de travailler en conditions athermiques. De plus, nous avons montré que le d_h des MagNanoGels diminue sous AMF. La chaleur générée sous AMF est donc suffisante pour provoquer une contraction du réseau réticulé de polymère et accroître la libération de DOX. On peut donc faire l'hypothèse que la température atteinte à l'échelle nanométrique est supérieure à la température de transition de phase volumique (VPTT) des chaînes de polymère composant les nanogels. Pour les MagNanoGels-37,5 %, la VPTT est de 28,6 et 47,0 °C à pH 5,5 et 7,5 respectivement (Cf. Tableau 9). Ceci démontre que sous un AMF, les NPMs contenues dans les nanogels se comportent en tant que sources de chaleur ponctuelles ou *hot spot*, en produisant de la chaleur de manière locale, à l'échelle nanométrique et que cette chaleur est suffisante pour provoquer le dégonflement de la matrice polymère. L'AMF peut donc être utilisé comme stimulus externe pour déclencher la libération de DOX contenue dans les nanogels.

Ce phénomène d'hyperthermie magnétique locale surnommé *hot spot* a été observé pour d'autres RC-DDS à base de polymères : des NPMs enrobées avec des polymères thermosensibles^{34,35} ou des polymères à empreinte moléculaire³⁶; des polymersomes magnétiques³⁷. Concernant les nanogels, les systèmes le plus étudiés pour la libération contrôlée des molécules sous AMF sont élaborés avec le monomère N-isopropylacrylamide (NIPAM)^{38,39}. Même si le monomère NIPAM est hautement cytotoxique, il a été démontré dans la littérature que la cytotoxicité du polymère PNIPAM est moindre, voire nulle. Cependant, après plusieurs étapes de purification, les matrices réticulées en PNIPAM peuvent encore contenir des monomères, rendant le système toxique^{40,41}. De plus, le PNIPAM peut également interagir avec les protéines du corps humain à cause de la présence de plusieurs fonctions amide dans sa structure chimique⁴². Ainsi, il est très difficile de les utiliser pour des applications biomédicales, contrairement aux MagNanoGels, à base de monomères biocompatibles, solubles dans l'eau et non toxiques, dérivés de monomères-OEGMAs^{43,44}.

Tous ces résultats suggèrent que les MagNanoGels peuvent être utilisés dans le futur en tant que systèmes de délivrance de molécules déclenchée à distance RC-DDS pour le traitement des maladies telles que le cancer. La libération du principe actif est déclenchée à distance par application d'un champ magnétique alternatif (stimulus externe) dans des conditions athermiques, en assurant ainsi un contrôle spatio-temporel du relargage.

4.6 Estimation de la température locale induite sous AMF

Durant toutes les expériences de libération de DOX sous AMF, la température globale de l'échantillon, mesurée à l'aide un thermomètre à fibre optique non métallique, est restée inchangée (37 °C). Or, les résultats de ces expériences suggèrent une élévation de la température locale (échelle nanométrique) générée par les NPMs en présence d'un champ magnétique alternatif, telle que $T_{\text{locale}} > VPTT$.

La mesure de cette température est un enjeu important pour les applications biomédicales. Des chercheurs ont exploité les propriétés de thermosensibilité des certains molécules fluorescentes en les utilisant en tant que « thermomètres moléculaires » afin d'avoir une estimation des variations de la température d'une dispersion à l'échelle nanométrique^{45,46}. Dans notre cas, les données de la Figure 62 nous ont permis de tracer les courbes de libération de DOX en fonction de la température à pH 7,5 et à un temps (t) donné,

avec t compris entre 0,5 et 4 heures (Figure 66a). À l'aide de ces courbes et en connaissant la quantité de DOX libérée sous AMF à un temps t (Figure 64), il est possible d'en déduire la température nécessaire pour atteindre cette libération de DOX si la dispersion de DOX-MagNanoGels était chauffée de manière globale. Cette température a été estimée pour chaque pulsation d'AMF (Figure 66b). La moyenne de ces valeurs (8 pulsations) correspond à une estimation de la température locale à l'échelle nanométrique, avec T_{locale} moyenne ≈ 65 °C (Figure 66b). Ainsi, la présence des NPMs au sein des MagNanoGels permettrait une élévation de la température locale qui pourrait atteindre 65 °C.

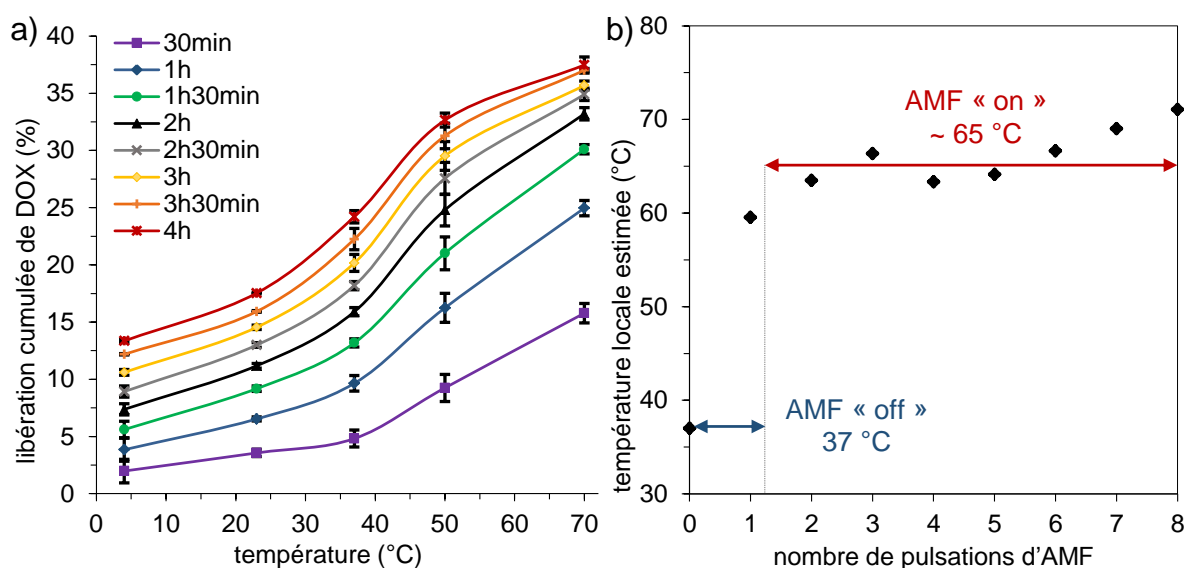


Figure 66. (a) Profil de libération de la doxorubicine (DOX) cumulée en fonction de la température d'incubation des DOX-MagNanoGels-37,5 % ([Fe] = 8,4 mM) à pH 7,5 (HEPES de sodium à 0,1 M) en contrôlant la température de l'échantillon (bain d'eau thermostaté) à un temps (t) donné ($t = 0,5$ à 4,0 h). (b) Estimation de la température locale près de la surface des NPMs à pH 7,5 lors de l'application des pulsations AMF (335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹, 30 min).

5. Libération de DOX intracellulaire déclenchée sous AMF

5.1 Matériel

Une solution tampon légèrement alcaline (pH 7,5) d'hepes hemi-sodique (ou sel de sodium de l'acide sulfonique 4-(2-Hydroxyéthyle)piperazine-1-éthane ; HEPES à 0,1 M – Sigma - Aldrich), une solution tampon d'acide citrique (mélange d'acide citrique à 0,05 M et de phosphate de sodium à 0,1 M – Sigma-Aldrich) et de la doxorubicine chlorohydratée (DOX – Sigma-Aldrich) ont été utilisées pour les études de libération intracellulaires. Des

cellules de cancer de prostate humaine, de type PC-3 (ATCC®, CRL-1435™), du milieu de culture cellulaire DMEM *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Sigma-Aldrich), du milieu de culture cellulaire RPMI contenant 5% de citrates (*Roswell Park Memorial Institute medium*, Thermo Fisher Scientific), du sérum bovin fœtal (FBS, *foetal bovine serum* – Gibco), de la pénicilline (Life Technologies), du réactif de dosage de viabilité cellulaire AlamarBlue™ (Life Technologies). Les expériences sur cellules ont été réalisées au sein du laboratoire MSC par Ana Espinosa et Claire Wilhelm.

5.1.1 Culture cellulaire

Les cellules de cancer de la prostate humaine PC-3 (ATCC® CRL-1435™) ont été cultivées en monocouche par adhésion dans un milieu de culture (DMEM enrichi avec 1% de pénicilline et 10% de sérum bovin fœtal FBS). Elles ont été maintenues à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ jusqu'à confluence. 100% de confluence décrit un tapis cellulaire ne présentant aucun interstice entre chaque cellule, c'est-à-dire les cellules se touchent toutes entre elles.

5.1.2 Incubation et marquage des cellules

Les cellules tumorales de prostate humaine (PC-3) ont été incubées à 37 °C par lots en présence d'une dispersion de MagNanoGels-37,5 %, une dispersion de DOX-MagNanoGels-37,5 % ou avec de la DOX libre en solution pendant 2 heures ([Fe] = 0,13 à 4,1 mM et [DOX] = 1,1 to 36,6 μM dans un milieu de culture cellulaire RPMI contenant 5% de citrates. Un lot de cellules PC-3 a été incubé avec une dispersion de NPMs pendant 2 heures, en tant qu'échantillon de contrôle ([Fe] = 0,13 à 1,1 mM). À la fin de l'incubation, tous les lots des cellules ont été lavés deux fois avec une solution fraîche de milieu de culture, puis incubés pendant 2 heures (période *chase*) dans un milieu complet DMEM enrichi avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) avant les expériences sous AMF. Le noyau des cellules est marqué avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, bleu).

5.1.3 Quantification de la capture cellulaire

La proportion de NPMs internalisée dans les cellules est déterminée par magnétophorèse de cellules individuelles, en suivant le protocole développé par C. Wilhelm et al.⁴⁷ Cette technique est basée sur la mesure de vitesse des objets magnétiques soumis à un gradient de champ magnétique. Les cellules PC-3 incubées avec des NPMs, des MagNanoGels-37,5 % ou des DOX-MagNanoGels-37,5 %, sont détachées et mises en suspension dans une chambre soumise à un gradient de champ magnétique calibré ($\text{grad}B = 145 \text{ mT}\cdot\text{m}^{-1}$; $B = 17 \text{ T}\cdot\text{m}^{-1}$) créée par un aimant permanent. Les cellules ayant capturé des NPMs deviennent magnétiques et vont donc se déplacer vers l'aimant. La migration individuelle des cellules vers l'aimant est enregistrée par vidéo. Les diamètres des cellules (d_{cell}), ainsi que leurs vitesses (v_{cell}) sont mesurés. L'aimantation par cellule (M_{cell}) est ensuite calculée pour 200 cellules indépendantes en équilibrant la force magnétique ($M_{\text{cellgrad}B}$) avec la force visqueuse (f_{visc}), tel que :

$$f_{visc} = 3 \times \pi \times \eta \times d_{cell} \times v_{cell} \quad \text{Eq. 27}$$

où η est la viscosité de l'eau. La masse de fer par cellule (m_{Fe}) est alors proportionnelle à M_{cell} . Pour les NPMs d'oxyde de fer de type maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) contenues dans les nanogels, un moment magnétique de $6,6 \times 10^{-14}$ A.m² correspond à 1 pg de fer.

5.1.4 Tests de cytotoxicité

La viabilité cellulaire est mesurée par la méthode colorimétrique standard d'Alamar Blue™. Ce produit commercial est un indicateur coloré d'oxydo-réduction. Il contient de la résazurine, molécule bleue faiblement fluorescente, qui peut être réduite de manière irréversible en résorufine, molécule rouge, fortement fluorescente, en présence de milieu réducteur, tel que le cytosol des cellules vivantes. De plus, ces deux molécules sont très peu toxiques pour les cellules vivantes, assurant ainsi une bonne évaluation de la cytotoxicité des produits testés (Figure 67)⁴⁸.

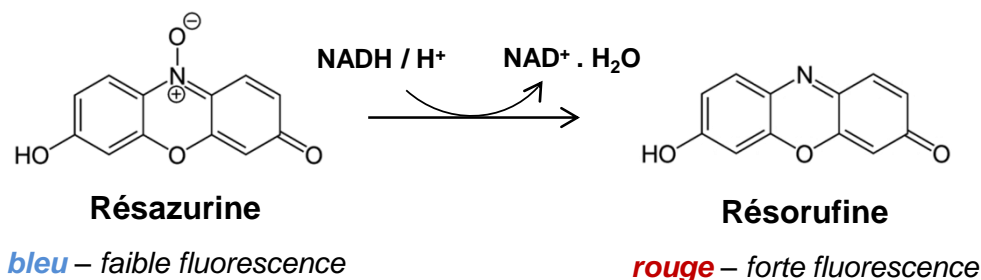


Figure 67. Equation bilan du test de viabilité cellulaire standard Alamar Blue™. La résazurine est réduite en résorufine.

Protocole : les cellules PC-3 sont incubées avec 10% d'Alamar Blue dans un milieu de culture DMEM pendant 2 heures. Le réactif Alamar Blue est ensuite transféré dans une plaque à 96 puits pour être analysé avec un lecteur de microplaques (BMG FluoStar Galaxy) à une longueur d'onde d'excitation $\lambda_{ex} = 550$ nm. Les cellules sont détectées par fluorescence à $\lambda_{em} = 590$ nm, correspondant à la longueur d'onde d'émission de la résorufine. Enfin, la viabilité cellulaire est déterminée par comptage des cellules traitées.

La valeur est calculée avec l'équation ci-dessous (Équation 15) :

$$\% \text{ viabilité cellulaire} = \frac{I_{fluo} - \text{Moyenne}(I_{fluo \text{ sans cellules}})}{\text{Moyenne}(I_{fluo \text{ cellules de contrôle}}) - \text{Moyenne}(I_{fluo \text{ sans cellules}})} \quad \text{Eq. 28}$$

où I_{fluo} est l'intensité en fluorescence.

5.1.5 Application du champ magnétique alternatif

Préalablement à l'application d'AMF, les cellules PC-3 sontensemencées dans un puits de culture de 1 cm de diamètre et sont incubées jusqu'à confluence. Après la période d'incubation et de chasse, les cellules sont soumises à un AMF pendant 2 heures (471 kHz, 18 mT; $14,4 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$, 4 pulsations x 30 min = 2 heures). L'AMF est généré avec un système DM3 (NanoScale Biomagnetics), avec une fréquence de 470 kHz et une amplitude de 18 mT. La température de l'échantillon est mesurée avec un thermomètre à fibre optique non métallique et enregistrée toutes les secondes.

5.2 Etudes intracellulaires des MagNanoGels

La capture cellulaire des MagNanoGels-37,5 %, DOX-MagNanoGels-37,5 % et de la DOX libre en solution, ainsi que la libération intracellulaire de la DOX déclenchée sous AMF ont été étudiés sur une lignée de cellules cancéreuses humaines de type PC-3 (cancer de la prostate).

5.2.1 Capture cellulaire et cytotoxicité des MagNanoGels et DOX-MagNanoGels

Après 2 heures d'incubation des cellules PC-3 avec une dispersion de MagNanoGels-37,5 %m, la quantité de fer absorbée par les cellules, corrélée à la capture des nanogels magnétiques, est mesurée par magnétophorèse. Comme illustré sur la Figure 68a, les MagNanoGels et les DOX-MagNanoGels sont capturés de manière équivalente par les cellules tumorales PC-3, avec une concentration [Fe] autour de 15 pg de fer par cellule. La présence de DOX dans les nanogels n'interfère donc pas avec leur internalisation cellulaire. Un fait encore plus remarquable est que les MagNanoGels et les DOX-MagNanoGels ont été internalisés aussi efficacement que les NPMs libres en solution.

Par ailleurs, l'activité métabolique des cellules PC-3, et donc leur viabilité, est mesurée 24 heures après la fin des 2 heures d'incubation avec de la DOX libre en solution ; des MagNanoGels ou des DOX-MagNanoGels en présence ou non d'un AMF. Pour les expériences sous champ, l'AMF est appliqué 2 heures après la fin de la période d'incubation. Durant toutes les expériences, les échantillons cellulaires ont été maintenus à température constante de 37 °C. Sur la Figure 68b, l'axe des abscisses principal (concentration en fer) ainsi que l'axe des abscisses secondaire (concentration en DOX) sont liés entre eux par le ratio $[\text{Fe}]/[\text{DOX}] = 0,13$, correspondant à la quantité de NPMs et de DOX contenue dans les différents lots de nanogels. Pour les MagNanoGels, seul l'axe concernant [Fe] s'applique ;

pour la DOX libre en solution, seul l'axe [DOX] s'applique ; et pour les DOX-MagNanoGels les deux axes sont utilisés ([Fe] et [DOX]). D'après cette figure, les MagNanoGels (sans DOX) présentent une viabilité cellulaire élevée (courbe orange) prouvant ainsi que ces nanogels ne sont pas toxiques aux concentrations en fer testées ([Fe] = 0,5–4,2 mM). Par ailleurs, lorsque les cellules sont incubées avec des DOX-MagNanoGels (courbe noire), leur viabilité est plus faible que lorsqu'elles sont incubées avec de la DOX libre en solution (courbe bleu), pour toute la gamme de concentrations en DOX étudiée ([DOX] = 4–32 μ M). Par exemple, pour la même concentration en [DOX] = 16 μ M (et [Fe] = 2,1 mM), la viabilité des cellules est réduite de 58 à 51% lorsque la DOX est encapsulée dans les MagNanoGels. Par conséquent, la concentration inhibitrice médiane maximale (IC_{50}), c'est-à-dire la concentration nécessaire en DOX pour réduire la viabilité cellulaire de 50% est meilleure pour les DOX-MagNanoGels (IC_{50} = 19 μ M) que pour la DOX libre (IC_{50} = 26 μ M). Ceci correspond à une amélioration d'environ 27% de l' IC_{50} de la DOX libre.

Ces résultats démontrent que les MagNanoGels sont d'excellents vecteurs pour la doxorubicine, permettant une meilleure internalisation de celle-ci lorsqu'elle est encapsulée dans la matrice polymère.

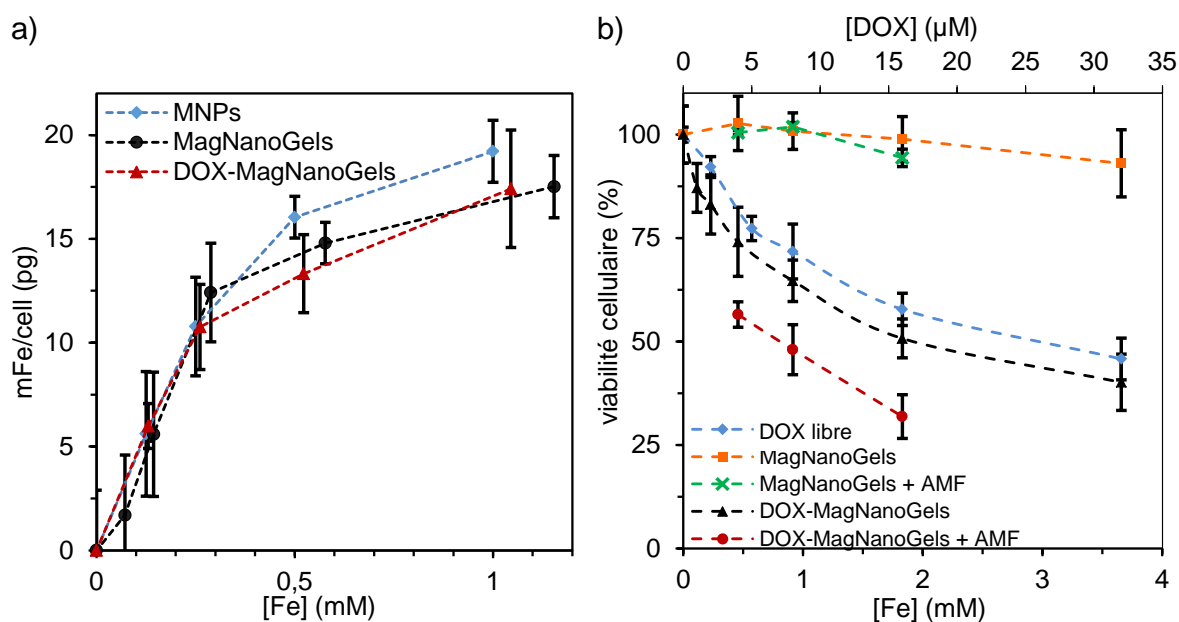


Figure 68. (a) Concentration de fer par cellule (mFe/cell, en pg) mesurée par magnétophorèse de cellules individuelles, après une incubation cellulaire de 2 h en présence des MagNanoGels, des DOX-MagNanoGels ou des MNPs ([Fe] = 0,13 à 1,2 mM). (b) Viabilité cellulaire des cellules de cancer de prostate humaine PC-3 (normalisée par les cellules de contrôle) incubées pendant 2 h avec de la DOX libre en solution, des MagNanoGels et des DOX-MagNanoGels en présence ou non d'un AMF (471 kHz, 18 mT; 14,4 $kA \cdot m^{-1}$, 4 pulsations x 30 min = 2 heures).

Les clichés de microscopie confocale des Figure 69 et 33 montrent respectivement la localisation de MagNanoGels et DOX-MagNanoGels dans les cellules PC-3 immédiatement, 4 heures ou 24 heures (uniquement pour DOX-MagNanoGels) après la période d'incubation.

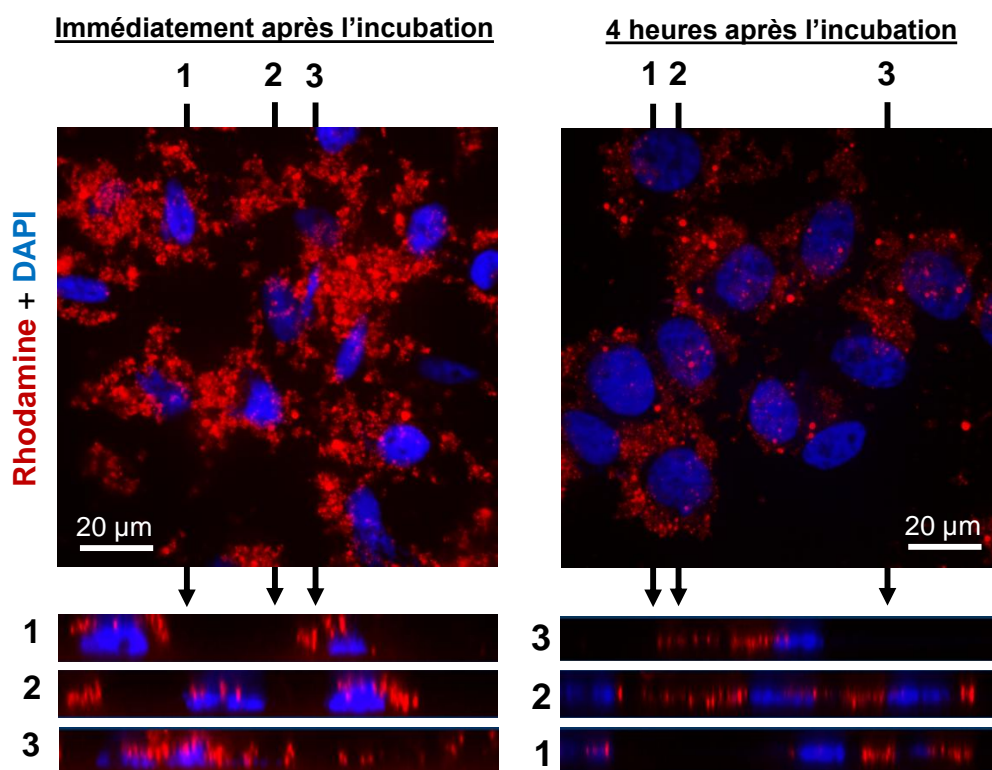


Figure 69. Clichés en microscopie confocale montrant la localisation des MagNanoGels à l'intérieur des cellules PC-3 immédiatement après l'incubation (gauche) ou 4 heures après (droite). Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (bleu) et les MagNanoGels sont liés de manière covalente à la rhodamine (RHO, rouge). Reconstruction 3D des vues sur l'axe Z à partir de la superposition de 20 clichés (intersection de 0,5 µm). Chaque image 1, 2 et 3 correspond au plan indiqué par les lignes et les flèches 1, 2 et 3.

Les nanogels ont été liés de manière covalente, pendant la polymérisation, avec de la rhodamine (RHO, rouge) et chargés en DOX (verte). Les noyaux des cellules ont été marqués avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, bleu). Immédiatement après l'incubation, on observe que les deux lots de nanogels, encapsulant ou non de la DOX, sont situés majoritairement dans les membranes plasmiques autour des cellules et que la DOX encapsulée dans les MagNanoGels est encore à l'intérieur des nanogels. Cette localisation membranaire est précisément observée sur la reconstruction 3D des vues sur l'axe Z de la Figure 69. La reconstruction 3D est obtenue à partir de la superposition de 20 clichés et des intersections de 0,5 µm. Chaque image 1, 2 et 3 correspond au plan indiqué par les lignes et les flèches 1, 2 et 3.

En revanche, 4 heures après l'incubation, les MagNanoGels et les DOX-MagNanoGels sont clairement internalisés dans le cytoplasme des cellules et localisés sous forme d'amas de points rouges dans le plan basal intracellulaire, identifiés comme des endosomes. Ceci est également confirmé sur la reconstruction 3D (Figure 69). De plus, la DOX encapsulée dans les MagNanoGels est en partie libérée passivement dans les noyaux cellulaires (couleur verte sur les clichés microscopiques de la Figure 70), ceci est dû probablement à une diminution de pH à l'intérieur des cellules.

Par ailleurs, 24 heures après l'incubation, une grande quantité de DOX reste encore encapsulée dans les MagNanoGels (points verts autour des noyaux cellulaires), malgré le relargage passif de celle-ci dans les noyaux des cellules (Figure 70). En outre, les MagNanoGels semblent localisés dans le cytoplasme des cellules (« petits points rouges » dû à la RHO), probablement piégés dans des endosomes, alors que les cellules deviennent plus petites et plus arrondies, à cause de la cytotoxicité de la DOX libérée.

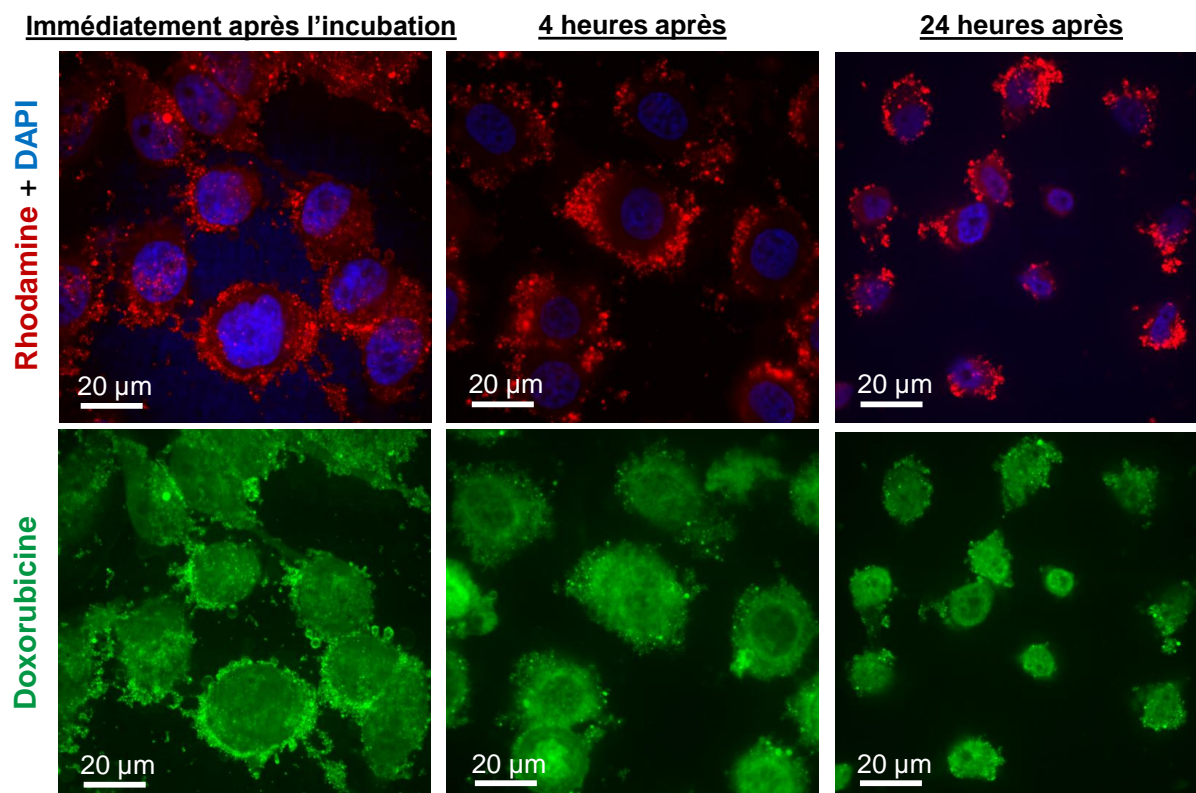


Figure 70. Clichés de microscopie confocale en fluorescence montrant l'internalisation des DOX-MagNanoGels-37 % dans les cellules cancéreuses PC-3 : immédiatement (gauche), 4 heures (centre) ou 24 heures (droite) après l'incubation. Les DOX-MagNanoGels sont liés de manière covalente à la rhodamine (RHO, rouge) et chargés avec de la doxorubicine (DOX, vert). Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (bleu)

5.2.2 Libération de DOX intracellulaire déclenchée à distance sous AMF

La viabilité cellulaire est aussi évaluée lors des expériences de libération de DOX déclenchée à distance sous AMF (AMF : 4 pulsations x 30 min = 2 heures. 471 kHz, 18 mT; 14.4 kA.m⁻¹) sur des lots de cellules incubées avec MagNanoGels et DOX-MagNanoGels.

Comme observé sur la Figure 68b, la viabilité cellulaire diminue significativement lorsque les cellules ayant internalisé des DOX-MagNanoGels sont soumises à un AMF (courbe rouge). Par exemple, pour la même concentration en [DOX] = 16 µM (et [Fe] = 2,1 mM), la viabilité des cellules est réduite de 51 à 32% lorsque les cellules contenant des DOX-MagNanoGels sont soumises à un AMF. En conséquence, l'IC₅₀ des DOX-MagNanoGels devient 2,3 fois plus faible, et donc meilleur, sous AMF (IC₅₀ = 19 µM et 8 µM avec et sans AMF respectivement). Au total, il est possible de réduire l'IC₅₀ de la DOX libre (IC₅₀ = 26 µM) d'environ 70% en l'encapsulant dans les MagNanoGels et en appliquant un AMF. Ceci est primordial pour envisager des applications biomédicales, car cela signifie que l'on pourrait réduire les doses de DOX administrées aux patients, lorsqu'elle est encapsulée dans les MagNanoGels, et atteindre le même pourcentage de mort cellulaire. Enfin, mais tout aussi important, aucune élévation de la température globale des échantillons n'a été constatée pendant toutes les expériences de libération de DOX intracellulaire sous AMF.

De plus, une expérience de contrôle, où des cellules incubées avec des MagNanoGels (sans DOX) sont soumises à un AMF, a montré que la viabilité des cellules n'était pas affectée par la seule présence d'un AMF (courbe verte, Figure 68b). Cette viabilité est semblable à celle des MagNanoGels (sans DOX ni AMF) et est proche de 100% (courbe orange, Figure 68b). Les résultats précédents prouvent qu'il n'y a pas de mort cellulaire par simple chauffage créé sous AMF, confirmant ainsi les conditions athermiques des expériences en solution. Par conséquent, la mort de cellules cancéreuses augmentée sous AMF est due exclusivement à la libération de la DOX contenue dans les MagNanoGels. L'échauffement local sous AMF des NPMs contenues dans les nanogels est donc suffisamment élevé pour déclencher à distance la libération de DOX à l'intérieur des cellules, mais pas assez pour induire une mort cellulaire.

Les expériences de libération de DOX intracellulaire en présence ou non d'un AMF ont également été suivies par microscopie confocale en fluorescence (Figure 71). Pour cela,

les cellules ont été incubées avec une dispersion de DOX-MagNanoGels à deux concentrations en doxorubicine ($[DOX] = 4$ et $8 \mu M$) et elles ont été fixées 4 heures après la fin de l'incubation. Au cours de cette période de 4 h, soit les cellules ont été soumises à des cycles d'AMF (4 pulsations x 30 min; 471 kHz; 18 mT; $14,4 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$), soit elles ont été conservées dans un incubateur à 37°C (sans AMF). Toutes les images ont été prises 4 heures après la fin de la période d'incubation. La fluorescence a été collectée dans le canal bleu pour le DAPI (coloration des noyaux cellulaires, $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$); dans le canal rouge pour la rhodamine – RHO (coloration des MagNanoGels, $\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$). Pour éviter une superposition de deux rouges, la fluorescence de la DOX, dont la fluorescence intrinsèque est dans le rouge, est collectée dans le canal vert ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Avant l'application d'un AMF, lorsque les cellules PC-3 sont incubées avec une dispersion de DOX-MagNanoGels, une partie de la DOX encapsulée dans les nanogels est relarguée passivement et rentre dans le noyau cellulaire; l'autre partie de la DOX reste dans le cytoplasme, co-localisée avec la fluorescence de la rhodamine (RHO), qui est liée de manière covalente aux nanogels. Ainsi, même après l'internalisation des DOX-MagNanoGels dans les cellules, une quantité non négligeable de DOX est encore encapsulée dans les nanogels (Figure 71a et 36b). Ceci a également été observé lors des expériences de capture cellulaire et de cytotoxicité détaillées précédemment. Les intensités de fluorescence de la RHO et de la DOX sont liées puisqu'elles correspondent respectivement à la quantité de nanogels présents dans la dispersion et à la quantité de DOX encapsulée dans les gels. En conséquence, on constate que l'intensité de fluorescence de la DOX et celle de la RHO sont amplifiées lorsque les cellules sont incubées avec une concentration initiale en DOX plus élevée; de même la quantité de DOX libérée passivement à l'intérieur des cellules est plus élevée lorsque $[DOX]$ augmente (comparaison des images de microscopie contenant $[DOX] = 8 \mu M$ (Figure 71a) et $4 \mu M$ (Figure 71b) sans AMF).

Par ailleurs, deux lots de contrôle contenant des cellules incubées pendant 2 heures avec de la DOX libre en solution ($[DOX] = 8 \mu M$ et $4 \mu M$) ont également été observés au microscope confocal en fluorescence (Figure 71c). Dans ce cas, toute la DOX est localisée à l'intérieur des noyaux des cellules. Il convient de remarquer que sur les images, la quantité de DOX fournie par les DOX-MagNanoGels jusqu'au noyau cellulaire semble légèrement plus élevée que lorsque la DOX est libre en solution. L'observation la plus frappante concerne l'intensité de la fluorescence de la DOX (verte) des noyaux dans les cellules cancéreuses

incubées avec une dispersion de DOX-MagNanoGels et soumises à un champ magnétique alternatif pendant 2 heures (Figure 71a et 36b avec 4 pulsations x 30 min d'AMF). En comparant les images avant et après AMF pour $[DOX] = 4 \mu M$, une amplification de l'intensité de la fluorescence (verte) est nettement observée sous AMF. Le même effet est constaté pour le lot de cellules incubé avec DOX-MagNanoGels à une concentration initiale $[DOX] = 8 \mu M$.

Pour quantifier cette variation en intensité, des cercles ont été tracés à l'intérieur des noyaux cellulaires et l'intensité en fluorescence de DOX (verte) de ces surfaces circulaires a été mesurée avec le logiciel ImageJ. L'intensité moyenne en fluorescence est ensuite calculée (avec $n > 16$ images), permettant de tracer l'histogramme de la Figure 71d. Dans un premier temps, ces mesures confirment que l'intensité de la fluorescence nucléaire est supérieure pour les cellules incubées avec des DOX-MagNanoGels que pour celles incubées avec de la DOX libre en solution. Ces résultats sont en accord avec la plus grande cytotoxicité des DOX-MagNanoGels, comparée à celle de la DOX libre. Le graphe de la Figure 71d montre avec clarté l'augmentation de l'intensité en fluorescence des noyaux lorsque les cellules sont soumises à un AMF (4 pulsations x 30 min), démontrant ainsi qu'il est possible de déclencher à distance sous AMF la libération intracellulaire de la DOX.

Il est à noter qu'après ces 4 pulsations d'AMF, des *spots verts* sont encore visibles dans le cytoplasme des cellules, il reste donc encore de la DOX encapsulée à l'intérieur des MagNanoGels. De ce fait, et malgré le relargage passif de la DOX inhérent à la matrice réticulée de polymères constituant les nanogels (matrice poreuse), les MagNanoGels peuvent être considérés comme des réservoirs pour stocker de la DOX à l'intérieur de cellules. La DOX peut ensuite être libérée, soit par diffusion passive à travers la matrice polymère (doses faibles), soit à volonté en appliquant un AMF (doses plus élevées).

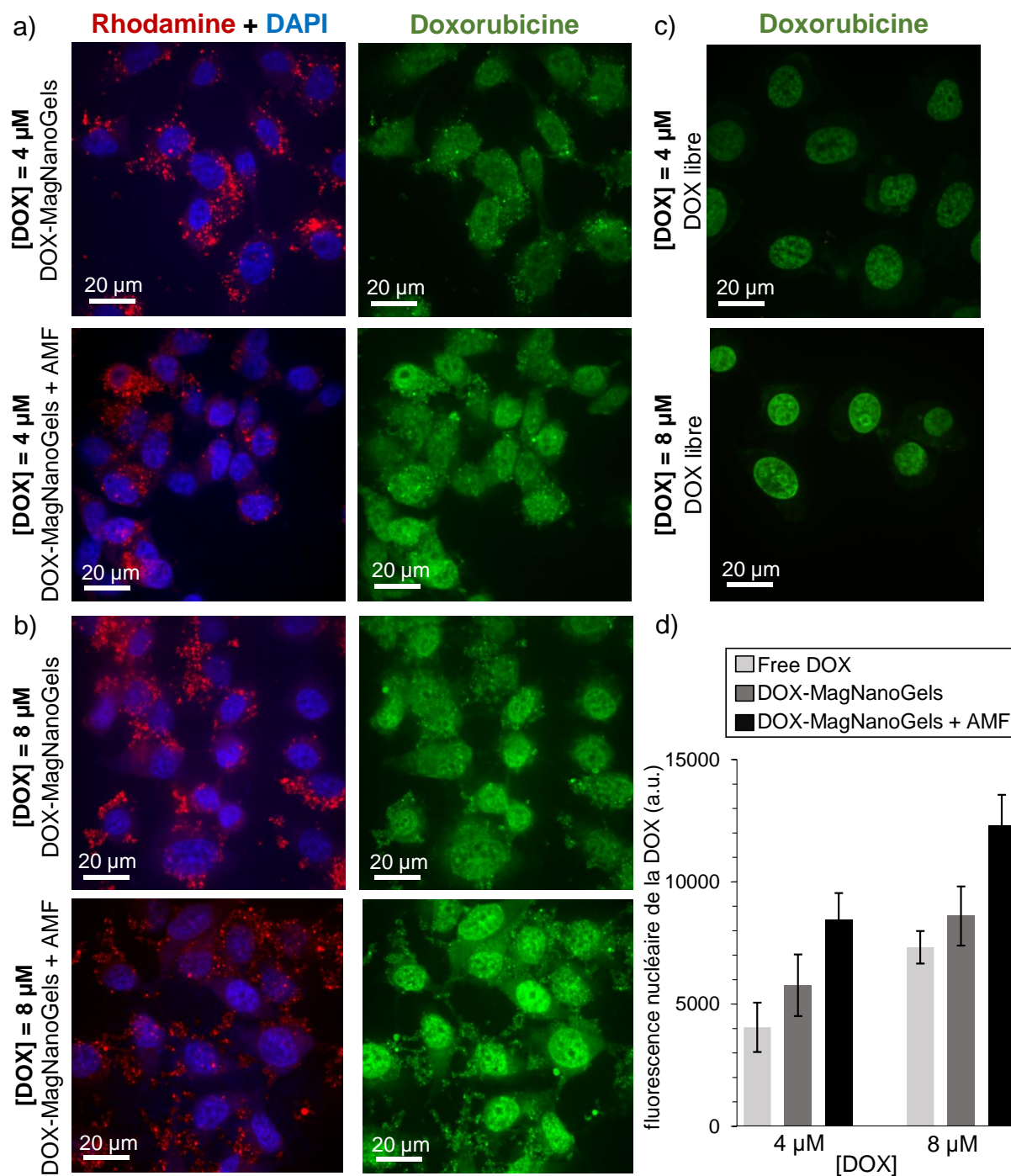


Figure 71. Clichés en microscopie confocale en fluorescence de cellules cancéreuses de prostate humaine (PC-3) après 2 h d’incubation (a, b) avec une dispersion de DOX-MagNanoGels ou (c) avec de la DOX libre en solution à deux concentrations en DOX : 4 et 8 μM. Les images correspondent à des cellules 4 h après l’incubation, en présence d’un cycle de 2 h d’AMF (4 pulsations x 30 min ; 471 kHz, 18 mT; 14,4 kA.m⁻¹), ou laissées à 37 °C dans un incubateur sans AMF (images du haut) ou en présence d’AMF (conditions + AMF, images du bas). (c) Des cellules incubées avec de la DOX libre, aux mêmes concentrations en DOX. Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (DAPI, λ_{ex} = 405 nm), les MagNanoGels en rouge (RHO, λ_{ex} = 561 nm) et la DOX en vert (λ_{ex} = 488 nm). (d) Quantification de l’intensité moyenne de la fluorescence nucléaire, due à la présence de la DOX. Les barres d’erreur représentent l’écart-type sur n > 16 images.

Conclusion et Perspectives

Dans ce chapitre, nous avons synthétisé de nanogels hybrides, biocompatibles et multifonctionnels (MagNanoGels) constitués d'un réseau polymère thermosensible à base de (macro)-monomères dérivés d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs, partie organique) et des nanoparticules d'oxyde de fer de type maghémite (γ -Fe₂O₃, partie inorganique).

La doxorubicine (DOX), l'une des molécules les plus utilisées dans la thérapie du cancer, a été encapsulée avec succès dans des MagNanoGels, contenant 37 %m en NPMs, par simple diffusion osmotique à travers la matrice polymère (69,5 μ M de DOX ; correspondant à 63% d'efficacité d'encapsulation). Nous avons montré que la transition de phase gonflement-dégonflement, ainsi que la libération de la DOX peuvent être déclenchées tantôt par des stimuli internes (pH), tantôt par des stimuli externes (température, champ magnétique alternatif). De ce fait, la libération de DOX peut être amplifiée par une élévation globale de la température du milieu (17 vs. 36% à 23 et 70 °C respectivement), par une diminution du pH (24 vs. 96% à pH 7,5 et 5,0 respectivement) et par la présence d'un AMF (24 vs. 47% sans et avec un AMF respectivement). La réponse en pH est très importante pour des applications futures de traitement des cancers. En effet, les cellules tumorales ont un microenvironnement acide (pH 4,5 – 6,5) par rapport au microenvironnement des cellules normales (pH 7,5). De plus, l'application de champs magnétiques (permanents et alternatifs) permet d'envisager un contrôle spatio-temporel de la libération des molécules, et donc, une possible diminution des effets secondaires du traitement.

L'ensemble des résultats sur des cellules humaines tumorales PC-3 montrent que les MagNanoGels sont d'excellents vecteurs pour la DOX. En effet, ils permettent une meilleure capture de la DOX par les cellules, en amplifiant ainsi la cytotoxicité de la DOX. Et plus important encore, nous avons démontré que grâce aux nanogels, il est possible de déclencher à distance et au cœur des cellules tumorales, la libération de la DOX sous l'influence d'un AMF en conditions athermiques, par effet *hot spot*. Les MagNanoGels sont donc des nanovecteurs RC-DDS permettant de contrôler à distance la libération de molécules hydrophiles. En déclenchant la libération de DOX à l'intérieur des cellules, l'AMF permet d'augmenter encore plus la cytotoxicité de cette molécule. De ce fait, pour la même concentration en [DOX] = 16 μ M et en [Fe] = 2,1 mM, la viabilité cellulaire est de 58, 51 et

32% respectivement pour la DOX libre, les DOX-MagNanoGels et les DOX-MagNanoGels sous AMF. Au total, il est possible de réduire l'IC₅₀ de la DOX libre (IC₅₀ = 26 μM) d'environ 70% en l'encapsulant dans les MagNanoGels et en appliquant un AMF (IC₅₀ = 8 μM).

Il est à noter que tous les constituants des MagNanoGels sont biocompatibles : les polymères dérivés de monomères-OEGMAs⁴⁹ et les nanoparticules d'oxyde de fer^{50,51}. En outre, la cytotoxicité de la DOX est affaiblie lorsqu'elle est encapsulée dans les nanogels. Par ailleurs, étant donné que l'AMF, stimulus utilisé pour la libération de la DOX, n'est pas non plus toxique par lui-même, à des fréquences et d'intensité de champ magnétique adaptées, et qu'il peut pénétrer profondément dans les tissus humains, de tels nanovecteurs sont une stratégie prometteuse pour la délivrance contrôlée de médicaments, applicable à d'autres molécules hydrophiles. Ces résultats confirment la possibilité d'engager un traitement chimiothérapeutique avec des DOX-MagNanoGels, via une stratégie d'hyperthermie magnétique athermique, c'est-à-dire sans échauffement global. Ceci est particulièrement encourageant pour limiter les effets néfastes de la chimiothérapie sur les tissus normaux environnants.

Ces travaux, nous ont permis de mettre au point une thérapie innovante pour la délivrance contrôlée de molécules, déclenchée à distance sous AMF, pour le traitement du cancer⁵². Par ailleurs, les propriétés intrinsèques des NPMs contenues dans les nanogels, telles que la visualisation en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et le ciblage magnétique, font des MagNanoGels des candidats idéaux pour une approche théranostique (diagnostic et traitement) sur une même nano-plateforme polymérique^{22,25}.

Références

- (1) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17* (2), 1247–1248.
- (2) Fortin, J.-P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Ménager, C.; Bacri, J.-C.; Gazeau, F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (9), 2628–2635.
- (3) Lefebure, S.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Neveu, S.; Massart, R. Monodisperse Magnetic Nanoparticles: Preparation and Dispersion in Water and Oils. *J. Mater. Res.* **1998**, *13* (10), 2975–2981.
- (4) Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fähling, H.; Roland Felix. Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH): Cancer Treatment with AC Magnetic Field Induced Excitation of Biocompatible Superparamagnetic Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201* (1–3), 413–419.
- (5) Costo, R.; Morales, M. P.; Veintemillas-Verdaguer, S. Improving Magnetic Properties of Ultrasmall Magnetic Nanoparticles by Biocompatible Coatings. *J. Appl. Phys.* **2015**, *117* (6), 064311.
- (6) Cheraghipour, E.; Tamaddon, A. M.; Javadpour, S.; Bruce, I. J. PEG Conjugated Citrate-Capped Magnetite Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **2013**, *328*, 91–95.
- (7) Hu, L.; Hach, D.; Chaumont, D.; Brachais, C.-H.; Couvercelle, J.-P. One Step Grafting of Monomethoxy Poly(Ethylene Glycol) during Synthesis of Maghemite Nanoparticles in Aqueous Medium. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *330* (1), 1–7.
- (8) Sun, J.; Zhou, S.; Hou, P.; Yang, Y.; Weng, J.; Li, X.; Li, M. Synthesis and Characterization of Biocompatible Fe₃O₄ Nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, *80A* (2), 333–341.
- (9) Mamani, J. B.; Costa-Filho, A. J.; Cornejo, D. R.; Vieira, E. D.; Gamarra, L. F. Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles Coated with Lauric Acid. *Mater. Charact.* **2013**, *81*, 28–36.
- (10) Fauconnier, N.; Bée, A.; Roger, J.; Pons, J. N. Synthesis of Aqueous Magnetic Liquids by Surface Complexation of Maghemite Nanoparticles. *J. Mol. Liq.* **1999**, *83* (1–3), 233–242.
- (11) Yee, C.; Kataby, G.; Ulman, A.; Prozorov, T.; White, H.; King, A.; Rafailovich, M.; Sokolov, J.; Gedanken, A. Self-Assembled Monolayers of Alkanesulfonic and -Phosphonic Acids on Amorphous Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **1999**, *15* (21), 7111–7115.
- (12) The Structure of Magnetite and the Spinels: Abstract: Nature <http://www.nature.com/accesdistant.upmc.fr/nature/journal/v95/n2386/abs/095561a0.html?foxtrotcallback=true> (accessed Aug 16, 2017).
- (13) Pecharromán, C.; González-Carreño, T.; Iglesias, J. E. The Infrared Dielectric Properties of Maghemite, γ -Fe₂O₃, from Reflectance Measurement on Pressed Powders. *Phys. Chem. Miner.* **1995**, *22* (1), 21–29.
- (14) Okudera, H.; Kihara, K.; Matsumoto, T. Temperature Dependence of Structure Parameters in Natural Magnetite: Single Crystal X-Ray Studies from 126 to 773 K. *Acta Crystallogr. B* **1996**, *52* (3), 450–457.
- (15) Bepari, R. A.; Bharali, P.; Das, B. K. Controlled Synthesis of α - and γ -Fe₂O₃ Nanoparticles via Thermolysis of PVA Gels and Studies on α -Fe₂O₃ Catalyzed Styrene Epoxidation. *J. Saudi Chem. Soc.* **2017**, *21*, S170–S178.

- (16) Pacakova, B.; Kubickova, S.; Salas, G.; Mantlikova, A. R.; Marciello, M.; Morales, M. P.; Niznansky, D.; Vejpravova, J. The Internal Structure of Magnetic Nanoparticles Determines the Magnetic Response. *Nanoscale* **2017**, *9* (16), 5129–5140.
- (17) Bacri, J.-C.; Perzynski, R.; Salin, D.; Cabuil, V.; Massart, R. Magnetic Colloidal Properties of Ionic Ferrofluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **1986**, *62* (1), 36–46.
- (18) Chantrell, R.; Popplewell, J.; Charles, S. Measurements of Particle Size Distribution Parameters in Ferrofluids. *IEEE Trans. Magn.* **1978**, *14* (5), 975–977.
- (19) Boularas, M.; Gombart, E.; Tranchant, J.-F.; Billon, L.; Save, M. Design of Smart Oligo(Ethylene Glycol)-Based Biocompatible Hybrid Microgels Loaded with Magnetic Nanoparticles. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36* (1), 79–83.
- (20) Hemery, G.; Garanger, E.; Lecommandoux, S.; Wong, A. D.; Gillies, E. R.; Pedrono, B.; Bayle, T.; Jacob, D.; Sandre, O. Thermosensitive Polymer-Grafted Iron Oxide Nanoparticles Studied by *in Situ* Dynamic Light Backscattering under Magnetic Hyperthermia. *J. Phys. Appl. Phys.* **2015**, *48* (49), 494001.
- (21) Brazel, C. S. Magnetothermally-Responsive Nanomaterials: Combining Magnetic Nanostructures and Thermally-Sensitive Polymers for Triggered Drug Release. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (3), 644–656.
- (22) Luk, B. T.; Zhang, L. Current Advances in Polymer-Based Nanotheranostics for Cancer Treatment and Diagnosis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (24), 21859–21873.
- (23) Kaur, S.; Prasad, C.; Balakrishnan, B.; Banerjee, R. Trigger Responsive Polymeric Nanocarriers for Cancer Therapy. *Biomater Sci* **2015**, *3* (7), 955–987.
- (24) Bergueiro, J.; Calderón, M. Thermoresponsive Nanodevices in Biomedical Applications: Thermoresponsive Nanodevices in Biomedical Applications *Macromol. Biosci.* **2015**, *15* (2), 183–199.
- (25) Molina, M.; Asadian-Birjand, M.; Balach, J.; Bergueiro, J.; Miceli, E.; Calderón, M. Stimuli-Responsive Nanogel Composites and Their Application in Nanomedicine. *Chem Soc Rev* **2015**.
- (26) Yang, H.; Wang, Q.; Huang, S.; Xiao, A.; Li, F.; Gan, L.; Yang, X. Smart PH/Redox Dual-Responsive Nanogels for On-Demand Intracellular Anticancer Drug Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (12), 7729–7738.
- (27) Álvarez-Bautista, A.; Duarte, C. M. M.; Mendizábal, E.; Katime, I. Controlled Delivery of Drugs through Smart PH-Sensitive Nanohydrogels for Anti-Cancer Therapies: Synthesis, Drug Release and Cellular Studies. *Des. Monomers Polym.* **2016**, *19* (4), 319–329.
- (28) Li, Z.; Ye, E.; David; Lakshminarayanan, R.; Loh, X. J. Recent Advances of Using Hybrid Nanocarriers in Remotely Controlled Therapeutic Delivery. *Small* **2016**, *12* (35), 4782–4806.
- (29) Smeets, N. M. B.; Hoare, T. Designing Responsive Microgels for Drug Delivery Applications. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2013**, *51* (14), 3027–3043.
- (30) Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. A Review of Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. *J. Controlled Release* **2008**, *126* (3), 187–204.
- (31) Karukstis, K. K.; Thompson, E. H. Z.; Whiles, J. A.; Rosenfeld, R. J. Deciphering the Fluorescence Signature of Daunomycin and Doxorubicin. *Biophys. Chem.* **1998**, *73* (3), 249–263.
- (32) Janssen, M.; Crommelin, D.; Storm, G.; Hulshoff, A. Doxorubicin Decomposition on Storage. Effect of PH, Type of Buffer and Liposome Encapsulation. *Int. J. Pharm.* **1985**, *23* (1), 1–11.
- (33) Xiong, W.; Wang, W.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Chen, H.; Xu, H.; Yang, X. Dual Temperature/PH-Sensitive Drug Delivery of Poly(N-Isopropylacrylamide-Co-Acrylic

- Acid) Nanogels Conjugated with Doxorubicin for Potential Application in Tumor Hyperthermia Therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *84* (2), 447–453.
- (34) Guisasola, E.; Baeza, A.; Talelli, M.; Arcos, D.; Moros, M.; de la Fuente, J. M.; Vallet-Regí, M. Magnetic-Responsive Release Controlled by Hot Spot Effect. *Langmuir* **2015**, *31* (46), 12777–12782.
- (35) Deka, S. R.; Quarta, A.; Di Corato, R.; Riedinger, A.; Cingolani, R.; Pellegrino, T. Magnetic Nanobeads Decorated by Thermo-Responsive PNIPAM Shell as Medical Platforms for the Efficient Delivery of Doxorubicin to Tumour Cells. *Nanoscale* **2011**, *3* (2), 619–629.
- (36) Griffete, N.; Fresnais, J.; Espinosa, A.; Wilhelm, C.; Bée, A.; Ménager, C. Design of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Controlled Release of Doxorubicin under an Alternative Magnetic Field in Athermal Conditions. *Nanoscale* **2015**.
- (37) Oliveira, H.; Pérez-Andrés, E.; Thevenot, J.; Sandre, O.; Berra, E.; Lecommandoux, S. Magnetic Field Triggered Drug Release from Polymersomes for Cancer Therapeutics. *J. Controlled Release* **2013**, *169* (3), 165–170.
- (38) Regmi, R.; Bhattarai, S. R.; Sudakar, C.; Wani, A. S.; Cunningham, R.; Vaishnava, P. P.; Naik, R.; Oupicky, D.; Lawes, G. Hyperthermia Controlled Rapid Drug Release from Thermosensitive Magnetic Microgels. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (29), 6158.
- (39) Jaiswal, M. K.; De, M.; Chou, S. S.; Vasavada, S.; Bleher, R.; Prasad, P. V.; Bahadur, D.; Dravid, V. P. Thermoresponsive Magnetic Hydrogels as Theranostic Nanoconstructs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (9), 6237–6247.
- (40) Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers Poly(N-Isopropylacrylamide), Poly(N-Vinylcaprolactam) and Amphiphilically Modified Poly(N-Vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, *26* (16), 3055–3064.
- (41) Wadajkar, A. S.; Koppolu, B.; Rahimi, M.; Nguyen, K. T. Cytotoxic Evaluation of N-Isopropylacrylamide Monomers and Temperature-Sensitive Poly(N-Isopropylacrylamide) Nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11* (6), 1375–1382.
- (42) Bianco-Peled, H.; Gryc, S. Binding of Amino Acids to “Smart” Sorbents: Where Does Hydrophobicity Come into Play? *Langmuir* **2004**, *20* (1), 169–174.
- (43) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470.
- (44) Lutz, J.-F. Thermo-Switchable Materials Prepared Using the OEGMA-Platform. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (19), 2237–2243.
- (45) Brites, C. D. S.; Lima, P. P.; Silva, N. J. O.; Millán, A.; Amaral, V. S.; Palacio, F.; Carlos, L. D. A Luminescent Molecular Thermometer for Long-Term Absolute Temperature Measurements at the Nanoscale. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (40), 4499–4504.
- (46) Riedinger, A.; Guardia, P.; Curcio, A.; Garcia, M. A.; Cingolani, R.; Manna, L.; Pellegrino, T. Subnanometer Local Temperature Probing and Remotely Controlled Drug Release Based on Azo-Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Lett.* **2013**, *13* (6), 2399–2406.
- (47) Wilhelm, C.; Gazeau, F.; Bacri, J.-C. Magnetophoresis and Ferromagnetic Resonance of Magnetically Labeled Cells. *Eur. Biophys. J.* **2002**, *31* (2), 118–125.
- (48) O’Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (17), 5421–5426.

- (49) Lutz, J.-F.; Andrieu, J.; Üzgün, S.; Rudolph, C.; Agarwal, S. Biocompatible, Thermoresponsive, and Biodegradable: Simple Preparation of “All-in-One” Biorelevant Polymers. *Macromolecules* **2007**, *40* (24), 8540–8543.
- (50) Mazuel, F.; Espinosa, A.; Luciani, N.; Reffay, M.; Le Borgne, R.; Motte, L.; Desboeufs, K.; Michel, A.; Pellegrino, T.; Lalatonne, Y.; Wilhelm, C. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano* **2016**, *10* (8), 7627–7638.
- (51) Kolosnjaj-Tabi, J.; Lartigue, L.; Javed, Y.; Luciani, N.; Pellegrino, T.; Wilhelm, C.; Alloyeau, D.; Gazeau, F. Biotransformations of Magnetic Nanoparticles in the Body. *Nano Today* **2016**, *11* (3), 280–284.
- (52) Cazares-Cortes, E.; Espinosa, A.; Guigner, J.-M.; Michel, A.; Griffete, N.; Wilhelm, C.; Ménager, C. Doxorubicin Intracellular Remote Release from Biocompatible Oligo(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylate-Based Magnetic Nanogels Triggered by Magnetic Hyperthermia. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (31), 25775–25788.

CHAPITRE IV

Les nanogels hybrides magnéto-plasmoniques à base d'oligo(éthylène glycol) méthacrylate

1. Les nanobâtonnets d'or	169
1.1 Matériel.....	169
1.2 Synthèse des nanobâtonnets d'or.....	170
1.3 Chimie de surface des AuNRs.....	173
1.4 Morphologie et taille des AuNRs	176
1.5 Propriétés plasmoniques des AuNRs.....	177
1.5.1 Propriétés optiques	177
1.5.2 Propriétés de photothermie.....	178
2. Les nanogels plasmoniques – PlasmNanoGels.....	184
2.1 Matériel.....	184
2.2 Synthèse des nanogels plasmoniques – PlasmNanoGels	184
2.3 Morphologie, taille et charge des PlasmNanoGels.....	186
2.4 Effet de la lumière	188
2.4.1 Propriétés optiques	188
2.4.2 Propriétés de photothermie.....	189
3. Les nanogels magnéto-plasmoniques MagPlasmNanoGels.....	191
3.1 Matériel.....	192
3.2 Synthèse des MagPlasmNanoGels à structure simple.....	192
3.3 Synthèse des MagPlasmNanoGels à structure cœur@coquille	193
3.4 Morphologie, taille et charge des MagPlasmNanoGels	195
4. Vers des nanogels pour la thérapie	201
4.1.1 Propriétés magnétiques et optiques	201
4.1.2 Propriétés d'hyperthermie magnétique et photothermie	202
Conclusions et Perspectives	206
Références	208

CHAPITRE IV :

Les nanogels hybrides magnéto-plasmoniques à base d'oligo (éthylène glycol) méthyle éther méthacrylate

Ce chapitre décrit l'élaboration et la caractérisation des nanogels hybrides plasmoniques (PlasmNanoGels) constitués du même réseau de polymères biocompatibles que précédemment (MEO₂MA, OEGMA₅₀₀, MAA) et de nanobâtonnets d'or ; ainsi que des nanogels hybrides magnéto-plasmoniques (MagPlasmNanoGels) contenant à la fois des nanoparticules d'oxyde de fer et des nanobâtonnets d'or. Dans un premier temps, nous décrirons la synthèse et la caractérisation des nanobâtonnets d'or (AuNRs), puis nous étudierons la synthèse des PlasmNanoGels et MagPlasmNanoGels, ainsi que leur comportement vis-à-vis de plusieurs stimuli, tels que la température, le champ magnétique alternatif (AMF) et la lumière laser dans le proche infrarouge (NIR-L). Enfin, l'évolution de la température du milieu en fonction de l'application d'un stimulus externe AMF ou NIR-L ou des deux stimuli simultanés sera étudiée.

1. Les nanobâtonnets d'or

Les nanobâtonnets d'or (AuNRs) peuvent convertir une irradiation proche infrarouge (NIR-L) en chaleur grâce à leur résonance de plasmon de surface localisée (LSPR). Ainsi, et de la même manière que les NPMs, les AuNRs peuvent agir comme sources de chaleur ponctuelle lors de l'application d'un stimulus externe, ici une irradiation laser infrarouge. En fonction de la température atteinte, cette chaleur pourra être utilisée, soit pour déclencher la libération d'une molécule encapsulée à l'intérieur de la matrice de polymères, soit pour détruire les cellules tumorales par photothermie plasmonique (PPT) ^{1,2}.

1.1 Matériel

Du bromure de cetyltriméthylammonium 98% (CTAB, M = 364,45 g.mol⁻¹ – Sigma-Aldrich), de l'acide tétrachloraurique (HAuCl₄, M = 339,79 g.mol⁻¹ – Sigma-Aldrich), de l'acide ascorbique (M = 176,12 g.mol⁻¹ – Sigma-Aldrich), du nitrate d'argent

(AgNO₃, M = 169,87 g.mol⁻¹ – Sigma-Aldrich), du tétrahydroborate de sodium (NaBH₄, M = 37,83 g.mol⁻¹ – Sigma-Aldrich) ont été utilisés pour la synthèse des nanobâtonnets d'or. De l'eau ultra pure Milli-Q est utilisée durant toutes les étapes de la synthèse. Tous les produits ont été utilisés sans purification ultérieure.

1.2 Synthèse des nanobâtonnets d'or

Dans la littérature, il existe des nombreuses synthèses permettant de préparer des nanoparticules d'or à des tailles et des morphologies bien définies : des nanoparticules sphériques³, des nanocages ou nanocoquilles⁴, des nanoétoiles⁵ et des nanobâtonnets⁶. Nous avons choisi de synthétiser des nanobâtonnets d'or car cette morphologie possède une LSPR dans la région proche de l'infrarouge, entre 650 et 900 nm, et que dans cette région les tissus biologiques absorbent très peu la lumière⁷. En outre, ces particules absorbent fortement les irradiations infrarouges, rendant meilleures leurs performances en tant que sources de chaleur. Les nanobâtonnets d'or (AuNRs) ont été synthétisés par la méthode dite de germination-croissance (*Seed-Mediated Growth Method*) en suivant le protocole établi par B. Nikoobakht et M.A. El-Sayed⁸. Cette méthode nécessite l'ajout d'un agent réducteur fort en faible quantité, typiquement le NaBH₄ pour la formation *in situ* de germes par la réduction partielle des précurseurs de sel d'or en or métallique Au⁰.

Protocole : Pour la synthèse d'une dispersion aqueuse d'AuNRs, nous avons préparé préalablement 100 mL d'une solution de CTAB à 0,2 M (7,3 g ; 0,02 mol de CTAB). Étant donné qu'à température ambiante le CTAB cristallise, il faut le solubiliser par agitation dans un bain thermostaté à 30 °C, en vérifiant que le flacon contenant la solution est plongé intégralement dans le bain pour éviter la formation de mousse. La solution de CTAB est gardée dans le bain tout le long de son utilisation. De même, 15 mL d'une solution (S₀) de HAuCl₄ à 0,01 M sont préparés (0,051 g ; 0,15 mmol de HAuCl₄). À partir de la solution précédente, 2 mL d'une solution de HAuCl₄ à 0,001 M sont préparés (0,2 mL de S₀ dans 1,8 mL d'eau). 10 mL d'une solution d'AgNO₃ à 0,004 M sont préparés (6,8 mg ; 0,04 mM d'AgNO₃). Enfin, 5 mL d'une solution d'acide ascorbique à 0,079 M sont préparés (0,069 g ; 0,392 mmol d'acide ascorbique). La synthèse est composée de deux étapes :

Étape n°1 : Préparation de germes d'or. Quelques minutes avant la synthèse, 5 mL d'une solution de NaBH₄ à 0,01 M (1,89 mg ; 0,05 mmol de NaBH₄) sont préparés en utilisant de l'eau glacée, préalablement plongée dans un bac de glace. En effet, une dissolution de ce réactif à température ambiante est à proscrire car il réagit violemment avec l'eau en dégageant du dihydrogène, qui est un gaz explosif et inflammable. Pour la synthèse de germes, 2,5 mL d'une solution de CTAB à 0,2 M (le CTAB doit être complètement dissous), 1,5 mL d'une solution d'HAuCl₄ à 0,001 M, 2,5 mL d'eau et 0,6 mL d'une solution glacée de NaBH₄ à 0,01 M sont ajoutés dans un bécher. Le mélange est

ensuite agité vigoureusement à 1000 tr.min⁻¹ avec un barreau aimanté. NaBH₄ va permettre de réduire les sels d'or. L'acide ascorbique peut réduire les ions or en atomes d'or uniquement en présence des nanoparticules métalliques catalysant cette réaction⁶. Lorsque la couleur du mélange vire du jaune pâle au marron-jaune, l'agitation est poursuivie encore 2 min. Puis, la solution est conservée à 25 °C. Les germes sont des petits nucléi d'or métallique, de l'ordre de 5 nm de diamètre, servant de point de départ pour la croissance des nanobâtonnets.⁹

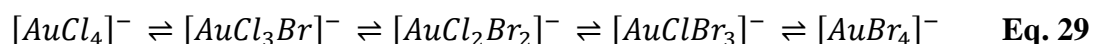
Étape n°2 : Croissance des nanobâtonnets d'or. 80 mL d'une solution de CTAB à 0,2 M sont ajoutés dans un bécher de 250 mL, immergé préalablement dans un bain d'eau à 30 °C. Après solubilisation complète du CTAB, 12 mL d'une solution de HAuCl₄ à 0,01 M ; 4,5 mL d'une solution d'AgNO₃ et 68 mL d'eau ultra pure Milli-Q sont ajoutés successivement dans le bécher sous agitation à 500 tr.min⁻¹. Puis 2 mL d'une solution d'acide ascorbique à 0,079 M sont ajoutés goutte à goutte au mélange. La présence d'AgNO₃ est essentielle pour contrôler le rapport d'aspect des nanoparticules d'or sphériques ou en forme de bâtonnets. En l'absence des ions Ag⁺, seulement 10 à 20% des particules formées ont la forme de bâtonnets, leur rapport d'aspect sont très élevés et sont très polydisperses¹⁰. Par ailleurs, l'acide ascorbique, agent réducteur doux, fait virer la couleur de la solution du jaune foncé à l'incolore⁸. Puis, le barreau aimanté est retiré de la solution de croissance qui est laissée à décanter pendant 5 min dans le bain d'eau à 30 °C. Ensuite, 1,6 mL de la solution de germes d'or y sont ajoutés. Le barreau aimanté est remis dans le bécher et le mélange est agité à 500 tr.min⁻¹ pendant 5 min. Après 20 min de réaction, la solution vire au rouge-violet. Le barreau aimanté est à nouveau enlevé et la solution est couverte avec du parafilm et laissée à reposer une nuit à 35 °C. Enfin, il faut laisser reposer encore 12 h à température ambiante.

À la fin de la synthèse, la dispersion des AuNRs est centrifugée deux fois à 36 000 g, 20 °C pendant 30 min, puis deux fois à 15 000 g à 20 °C, pendant 30 min avec une centrifugeuse (Thermo Fisher Scientific) pour enlever l'excès de CTAB. À chaque centrifugation, le surnageant est enlevé et remplacé par de l'eau ultra pure Milli-Q. Enfin, les AuNRs sont redispersés dans l'eau. La concentration en or de la dispersion d'AuNRs est déterminée soit par AAS, soit par ICP-AES. Avant le dosage, un volume donné de la dispersion d'AuNRs, compris entre 50 et 150 µL, est placé en présence d'un volume d'eau régale dix fois supérieur pendant au moins une nuit, afin de dégrader les nanobâtonnets. L'eau régale est une des rares solutions à pouvoir dissoudre l'or, elle est constituée d'un mélange d'acide chlorhydrique HCl et d'acide nitrique HNO₃.

La concentration en or de la dispersion d'AuNRs synthétisée est de $[Au]_{mère} = 5,4.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} = 1,1.10^{-1} \text{ mg.mL}^{-1}$. Les deux étapes de la synthèse consistent en : (1) la préparation d'une solution contenant des germes d'or par la réduction de HAuCl₄ avec du NaBH₄ glacé, en présence de molécules de tensioactif CTAB. (2) L'addition des germes d'or dans une solution d'ions Au⁺, obtenus par la réduction de HAuCl₄ avec de l'acide ascorbique, en présence de CTAB. L'AgNO₃ est introduit dans la solution d'or avant l'ajout des germes pour faciliter la formation des nanobâtonnets d'or. Les sels d'or HAuCl₄ sont utilisés en tant que précurseurs des AuNRs. Trois états d'oxydation de l'or sont impliqués : Au^{III} et Au^I

respectivement en tant que précurseurs et intermédiaires des AuNRs ; Au^0 dans les AuNRs finaux¹¹. Un équilibre entre ces trois états d'oxydation est établi lors de la synthèse des nanobâtonnets d'or, tel que : $Au^{3+} + 2Au^0 \rightleftharpoons 3Au^+$.

En présence de molécules de tensioactif CTAB, un échange de ligands se produit pour former $AuBr_4^-$, dû à la forte affinité des ions bromures (Br^-) pour se lier de manière covalente aux atomes d'or, par rapport aux ions chlorures (Cl^-), tel que :



Puis les ions $[AuBr_4]^-$ forment un complexe avec les molécules de tensioactif ($AuBr_4^-$ -CTAB), modifiant le potentiel redox de ces molécules. Ces paramètres vont influencer la cinétique de croissance des AuNRs. Les ions $AuBr_4^-$ vont ensuite se réduire en présence de $NaBH_4$ pour former des atomes Au^0 (réactions d'oxydo-réduction)¹².

C. J. Orendorff et C. J. Murphy ont proposé un mécanisme pour expliquer le processus de croissance des nanobâtonnets en présence d'ions argent. Les molécules de CTAB vont former des micelles plus ou moins allongées, dont la taille dépend de la concentration en tensioactif, de la force ionique de la solution et de la température de Kraft (température critique de formation des micelles). En introduisant les germes d'or enrobés de CTAB dans la solution de croissance, ils rentrent dans la micelle permettant la croissance des AuNRs. Les ions Ag^+ sont réduits en Ag^0 à la surface métallique des germes si le potentiel de surface est inférieur au potentiel de réduction standard d' Ag^+ . Ces ions se déposent plus facilement sur les bords des AuNRs que sur la longueur générant une croissance préférentielle aux bords. L'ajout supplémentaire d'ions Ag^+ provoque le dépôt de ces ions sur toute la surface des AuNRs, et donc l'arrêt de la croissance des nanobâtonnets.^{6,13} Le mécanisme est illustré Figure 72.

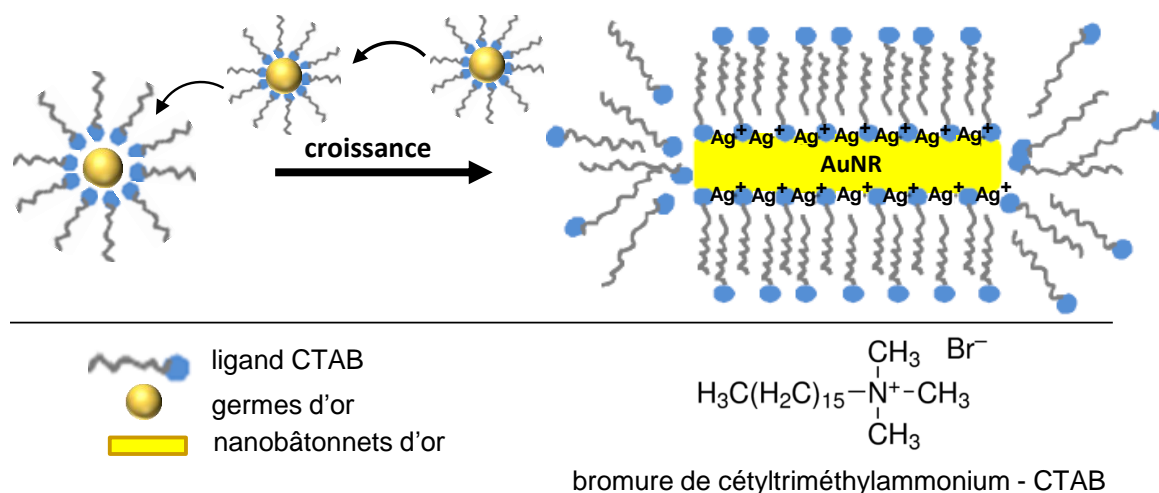


Figure 72. Schéma illustrant le mécanisme de croissance par germination-croissance des nanobâtonnets d'or en présence d'ions Ag^+ .

De la même manière que pour les nanoparticules d'oxyde de fer, la stabilité des AuNRs en suspension dans un liquide dépend de plusieurs paramètres, notamment de la taille des particules, de la température et de la viscosité du milieu et des interactions attractives de Van der Waals (de type dipôle-dipôle) entre particules. Les nanobâtonnets doivent être stables dans l'eau pour pouvoir les utiliser dans la synthèse de nanogels hybrides. Ils peuvent être stabilisés par des interactions répulsives électrostatiques ou stériques. Ici, les AuNRs sont stabilisés par un enrobage des molécules de CTAB, qui est un tensioactif cationique. Les molécules de CTAB s'organisent en formant une double couche de tensioactif autour des nanobâtonnets⁸, comme montré sur les schémas de la Figure 72, ainsi les AuNRs seront chargés positivement et des répulsions électrostatiques vont empêcher leur agrégation. Le potentiel zêta, corrélé à la charge des AuNRs en dispersion dans l'eau est de +45,3 mV.

1.3 Chimie de surface des AuNRs

Il est bien connu que les nanobâtonnets d'or synthétisés par germination-croissance avec AgNO_3 contiennent entre 2,5 et 9% d'argent à leur surface, soit sous forme métallique Ag^0 , soit sous forme complexe Ag-Br ¹³⁻¹⁶. De même, des chercheurs ont démontré que le complexe Ag-Br-CTAB s'adsorbe à la surface des AuNRs plus fortement que le tensioactif CTAB seul¹⁷. Nous avons vérifié la présence de CTAB à la surface des AuNRs par FT-IR avec un spectromètre Bruker Tensor 27 entre 4000 à 400 cm^{-1} . Le protocole d'analyse des échantillons est le même que celui décrit pour les NPMs. La Figure 73 montre les spectres FT-IR des AuNRs stabilisés par un enrobage de CTAB et du CTAB pur. Sur le spectre des AuNRs, une bande forte et large attribuée à la vibration d'élongation des groupements

hydroxyle ($-OH$) est observée à 3445cm^{-1} , provenant probablement de l'acide ascorbique. Les bandes fortes et fines à 2918 et 2850 cm^{-1} , présentes sur le spectre IR du CTAB pur sont dues aux vibrations d'élongation des liaisons $C-H$. Ces bandes sont également présentes dans le spectre des AuNRs. Ces résultats suggèrent que des molécules de CTAB sont présentes à la surface des AuNRs. La présence de CTAB enrobant les AuNRs, après les différents cycles de lavage, est conforme aux données de la littérature^{17,18}.

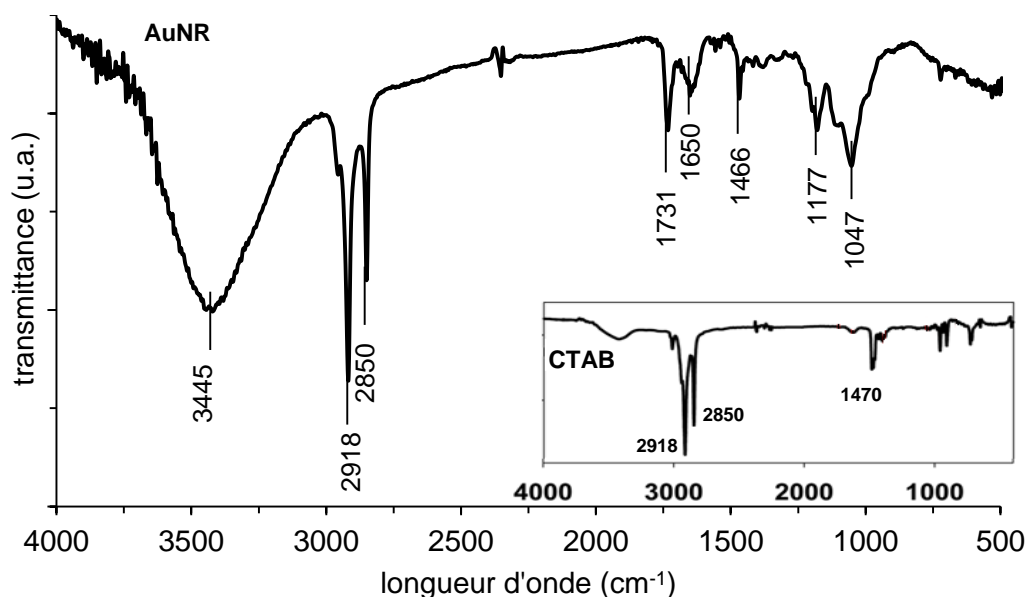


Figure 73. Spectres FT-IR des nanobâtonnets d'or AuNRs. Le spectre des molécules de CTAB seules (en bas à droite) est extrait de¹⁸.

Il est établi dans la littérature que les molécules de CTAB, complexées ou non avec Ag, vont s'organiser à la surface des nanobâtonnets d'or en formant une bicouche, par des interactions électrostatiques entre le groupement cationique ammonium et la surface anionique des AuNRs constituée des complexes de bromure métallique^{19,20}. S. Gomez-Graña *et al.* ont estimé, par diffusion de neutrons aux petits angles (SANS) et par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), que l'épaisseur de cette bicouche de tensioactif est de $32 \pm 2 \text{ \AA}$ ²¹.

Par ailleurs, une estimation du nombre de molécules de CTAB enrobant les AuNRs peut être obtenue par analyse thermogravimétrique (TGA)²²⁻²⁴. En effet, la TGA permet de mesurer la perte de masse de l'échantillon en fonction de la température, et donc d'estimer le ratio massique AuNRs/CTAB. Tout d'abord, la dispersion d'AuNRs doit être soigneusement purifiée par des cycles de centrifugation afin d'enlever le maximum de CTAB libre en solution. Cependant, il est impossible d'enlever tout le CTAB libre en solution, car les ligands à la surface des AuNRs sont en équilibre avec les ligands libres. Si l'on enlève trop de CTAB,

les AuNRs vont s'agréger²⁴. Après les cycles de centrifugation, un volume de la dispersion d'AuNRs est séché dans une étuve à 70 °C pendant une nuit, puis placé dans une capsule en aluminium. La poudre est analysée avec un appareil SDT Q600 (TA Instruments) sous flux d'azote N₂(g) à 100 mL.min⁻¹, avec une vitesse de chauffage de 10 °C.min⁻¹ de 25 à 800 °C. La Figure 74 montre la courbe TGA des nanobâtonnets d'or. Premièrement, une perte de masse d'environ 2% est observée entre 25 et 200 °C. Cette masse correspond à l'évaporation des molécules d'eau encore présentes dans les AuNRs (couche de solvation). Puis, la masse des AuNRs diminue de 98 à 85% ($\Delta m = 13\%$) lorsque l'échantillon est chauffé entre 200 et 500 °C. Cette perte de masse correspond à la désorption des ligands CTAB et à leur décomposition thermique. L'échantillon est donc composé de 13% de CTAB et de 87% d'AuNRs ; le ratio massique CTAB/AuNRs est égal à 0,15.

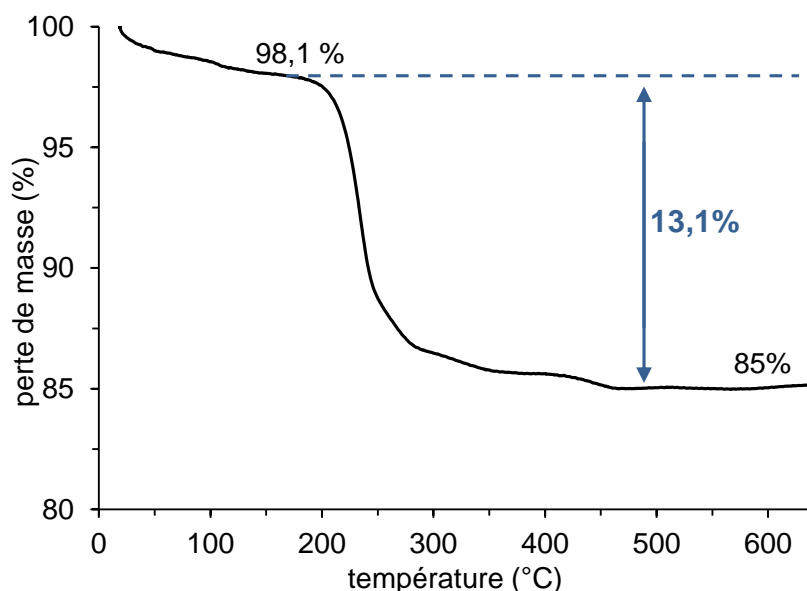


Figure 74. Analyse thermogravimétrique (N₂ (g) ; 10 °C.min⁻¹) des nanobâtonnets d'or enrobés avec une bicouche de CTAB.

Par ailleurs, afin d'envisager des applications biomédicales, il est indispensable de modifier la surface des AuNRs pour enlever le maximum de CTAB, car ce produit est très toxique pour les cellules, même à des faibles concentrations de l'ordre de la micromole. La technique la plus utilisée pour les rendre biocompatibles est la PEGylation, consistant à effectuer un échange des ligands CTAB par des ligands PEG-SH²⁴. En outre, les molécules de CTAB permettent d'obtenir des AuNRs facilement modifiables, en déposant par exemple des couches de polyélectrolytes chargés (technique *layer-by-layer*)^{25,26}, par enrobage d'une coquille de silice mesoporeuse²⁷, ou bien en modifiant la surface de manière covalente avec des groupements thiols (technique d'échange de ligands)^{28,29}. Même si plusieurs ligands sont capables de déplacer les molécules de CTAB de la surface d'or et de les remplacer, les

molécules possédant un groupement thiol sont les plus utilisées dans la littérature car la liaison covalente or-thiolate est très forte.^{26,28,30,31}

1.4 Morphologie et taille des AuNRs

Comme illustré sur les images TEM de la Figure 75, les AuNRs synthétisés par la méthode de germination-croissance ont majoritairement une forme de bâtonnets, d'où leur nom nanobâtonnets d'or. Leur structure cristalline est celle de l'or métallique (Cf. Annexe 4).

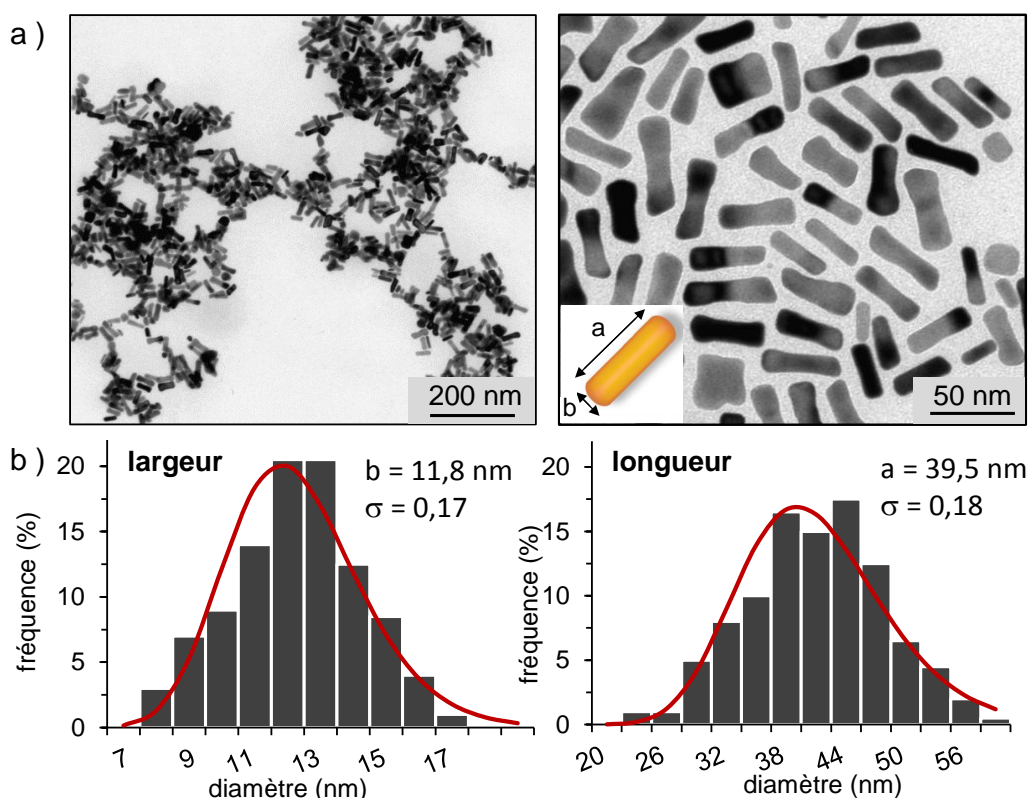


Figure 75. (a) Cliché de microscopie électronique à transmission (TEM) de nanobâtonnets d'or (AuNRs) après purification. (b) Distributions en taille de la longueur (a) et largeur (b) moyenne des AuNRs (histogrammes) obtenues par analyse des plusieurs clichés TEM ($n = 200$ particules) et ajustées par une loi log-normale (courbe rouge). Les AuNRs ont une longueur et largeur moyennes de 39,5 et 11,8 nm respectivement, dont les écart-types respectives sont $\sigma = 0,18$ et 0,17.

Sur les clichés TEM, on observe également quelques particules carrées et sphéroïdes. La longueur (a) et la largeur (b) moyennes des AuNRs ont été déterminées à partir du traitement manuel des plusieurs images TEM avec le logiciel ImageJ. Le comptage est effectué sur $n = 200$ particules. Les nanoparticules carrées et sphéroïdes n'ont pas été prises en compte dans les calculs des moyennes. La distribution en taille de chaque paramètre (longueur et largeur) est modélisée par une loi log-normal (courbes rouges). La longueur et la

largeur moyenne sont respectivement $a = 39,5 \text{ nm}$ ($\sigma = 0,18$) et $b = 11,8 \text{ nm}$ ($\sigma = 0,17$), d'où le rapport d'aspect AR égal à 3,3.

1.5 Propriétés plasmoniques des AuNRs

1.5.1 Propriétés optiques

Les propriétés optiques des AuNRs sont gouvernées par les oscillations cohérentes des électrons-6s de la bande de conduction de l'or, en résonance avec une radiation électromagnétique ; ce phénomène est la résonance du plasmon de surface localisée (LSPR, *Localized Surface Plamon Resonances*).²⁴ La LSPR varie en fonction de la forme (sphéroïdes, sphères, bâtons, étoiles), la taille (et donc le rapport d'aspect) des nanoparticules d'or et de la constante diélectrique du milieu^{32,33}. La diversité des couleurs des dispersions colloïdales des AuNRs est due au couplage de la lumière dans la région visible du spectre électromagnétique (400–800 nm) avec la LSPR. La Figure 76a illustre la variation de la couleur de dispersions de nanobâtonnets d'or en fonction du rapport d'aspect (AR). Les AuNRs que nous avons synthétisés forment une dispersion aqueuse de couleur pourpre ; ils ont une bande plasmonique longitudinale à 753 nm et une bande transversale à 525 nm (Figure 76b).

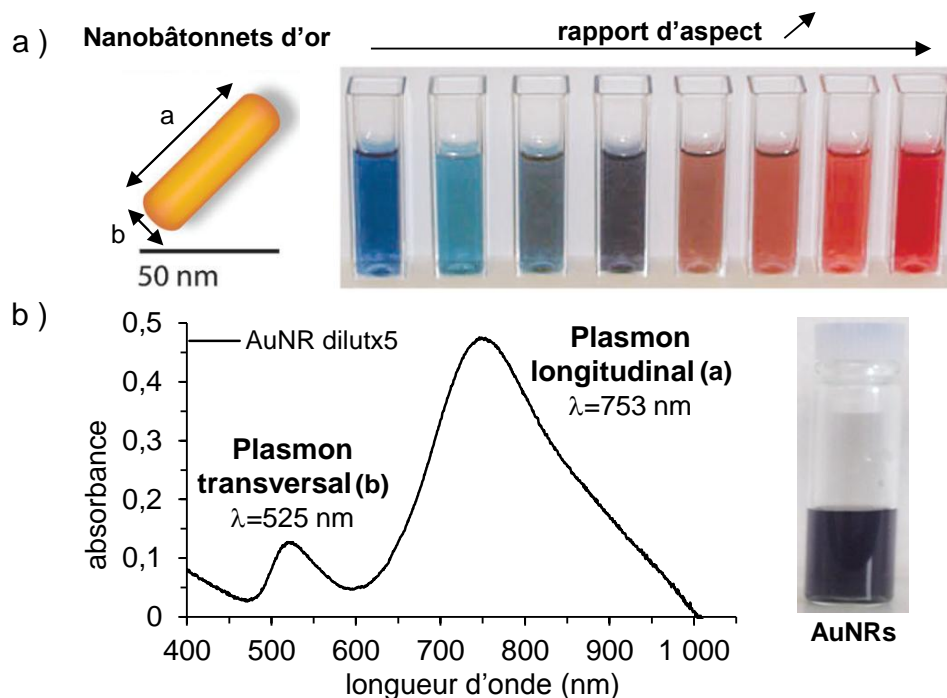


Figure 76. (a) Dispersion aqueuses d'AuNRs. La couleur varie en fonction du rapport d'aspect (AR). Image adapté de³². (b) Spectre d'absorption visible-infrarouge des nanobâtonnets d'or AuNRs que nous avons synthétisé par la méthode de germination-croissance. Photo d'une dispersion d'AuNRs avec un rapport d'aspect AR = 3,3.

La résonance longitudinale est particulièrement sensible au rapport d'aspect des AuNRs. Nous avons choisi de synthétiser des AuNRs ayant une valeur de LSPR dans la région proche infrarouge, entre 650 et 900 nm ($\lambda_{\text{longitudinale}} = 753$ nm) correspondant à un rapport d'aspect $AR = 3,3$, car dans cette région l'absorption de la lumière par les tissus biologiques est minimale^{7,32}.

1.5.2 Propriétés de photothermie

La thérapie photothermique (PTT) est une thérapie peu invasive dans laquelle l'énergie photonique d'une irradiation proche infrarouge (NIR-L) est convertie en chaleur pour détruire des cellules cancéreuses. Les AuNRs absorbent fortement la lumière et convertissent l'énergie des photons en chaleur rapidement et efficacement, ce qui en fait des candidats idéaux pour la PTT. Cette nouvelle thérapie a connu un intérêt particulier au cours des dernières années.^{2,34} L'irradiation des AuNRs avec un laser-NIR provoque l'excitation cohérente des électrons à la surface des AuNRs. La relaxation rapide de ces électrons excités génère une forte chaleur localisée capable de détruire les cellules cancéreuses proches de ces particules. La photothermie induite par des nanoparticules d'or est connue sous le nom de thérapie plasmonique-photothermique (PPTT)².

A. Modes de relaxation

La lumière absorbée par les nanoparticules est convertie rapidement en chaleur par deux processus :

- (1) la relaxation électron-électron de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s)
- (2) la relaxation électron-photon de l'ordre de la picoseconde (10^{-12} s)

Des températures de plusieurs dizaines de degrés peuvent être atteintes facilement à la surface des nanoparticules grâce à ces électrons chauds. Les parois des AuNRs vont ensuite refroidir par une relaxation phonon-phonon ; cela signifie que la chaleur va être dissipée.³⁴ Si les AuNRs sont proches des cellules cancéreuses et que la température s'élève entre 41 et 47 °C, la chaleur va modifier les fonctions biologiques des cellules et les détruire, via l'apoptose ou la nécrose en fonction du type de laser (pulsé, continu), de la puissance et du temps d'irradiation.³⁵

B. Pouvoir chauffant

Afin d'évaluer l'efficacité des AuNRs en tant que source de chaleur pour une thérapie plasmonique photothermique, nous avons étudié l'évolution de la température sous l'irradiation d'un laser-NIR.

Protocole : Pour activer l'effet photothermique des échantillons, une diode laser de 808 nm couplée avec une fibre optique est utilisée (Laser Diode Driver System, BWT Beijing Ltd. ; Modèle DS3-11312-110-K808F15FA-6.000W ; AC 230 V 50 Hz) avec une puissance réglable jusqu'à 5 W. Le laser est choisi de sorte que sa longueur d'onde d'émission soit la plus proche possible de la bande LSPR-longitudinale des AuNRs ($LSPR_{longitudinale} = 753$ nm). La distance entre l'échantillon contenu dans un eppendorf (150 μ L) et le laser est de 3 cm, avec un spot lumineux de 1 cm^2 et la puissance du laser est fixée à 0,3 $W.cm^{-2}$. L'élévation de la température, entre 25 et 70 $^{\circ}C$, est enregistrée chaque seconde *in situ* avec une caméra infrarouge d'imagerie thermique (FLIR modèle SC7000, FLIR Systems). 150 μ L d'une dispersion d'AuNRs, à une concentration [Au] donnée, sont placés dans un eppendorf et irradiés avec un laser-NIR 808 nm pendant 5 min à une puissance de 0,3 $W.cm^{-2}$.

La Figure 77a montre les images thermiques de la dispersion à t_0 (image de gauche) et à $t = 5$ min après irradiation. La Figure 77b montre l'évolution de la température de l'échantillon en fonction du temps pendant toute la durée d'irradiation. Après 5 min d'irradiation laser, la température d'une dispersion d'AuNRs à $[Au] = 6,4.10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ s'élève à environ 39 $^{\circ}C$ ($\Delta T = 14,8$ $^{\circ}C$). L'efficacité du pouvoir chauffant des AuNRs est exprimée, de la même manière que pour les nanoparticules magnétiques, avec le taux d'absorption spécifique (SAR). La SAR, en $W.g^{-1}$ d'or, correspond à la dissipation de la puissance par unité de masse d'or et mesure la capacité de l'échantillon plasmonique à produire de la chaleur en présence d'une irradiation lumineuse. Pour cet échantillon, la valeur de SAR est de 5129 $W.g^{-1}$. Donc le pouvoir chauffant de ces particules est très important, ce qui fait de ces particules de bons candidats pour une thérapie photothermique. Dans la littérature, des valeurs plus élevées de SAR ont été répertoriés. Ainsi par exemple A. Espinosa *et al.* ont mesuré une SAR proche de 10 000 $W.g^{-1}$ avec un laser 808 nm à 1 $W.cm^{-2}$ pour des nanoétoiles d'or³⁶ ; et S. Freddi *et al.* ont mesuré une SAR d'environ 430 000 $W.g^{-1}$ et 190 000 $W.g^{-1}$ avec un laser 800 nm à 13 $W.cm^{-2}$, pour des nanobâtonnets et des nanoétoiles d'or respectivement³⁷. Cependant, ces valeurs sont atteintes avec des puissances de laser 3 fois à 43 fois plus élevées que celles que nous utilisons. Pour envisager des applications biomédicales, il faut limiter la puissance du laser-NIR le plus possible, tout en atteignant une élévation thérapeutique de la

température. Dans la littérature il est conseillé de ne pas dépasser $0,3 \text{ W.g}^{-1}$ pour une thérapie sur l'homme.⁷

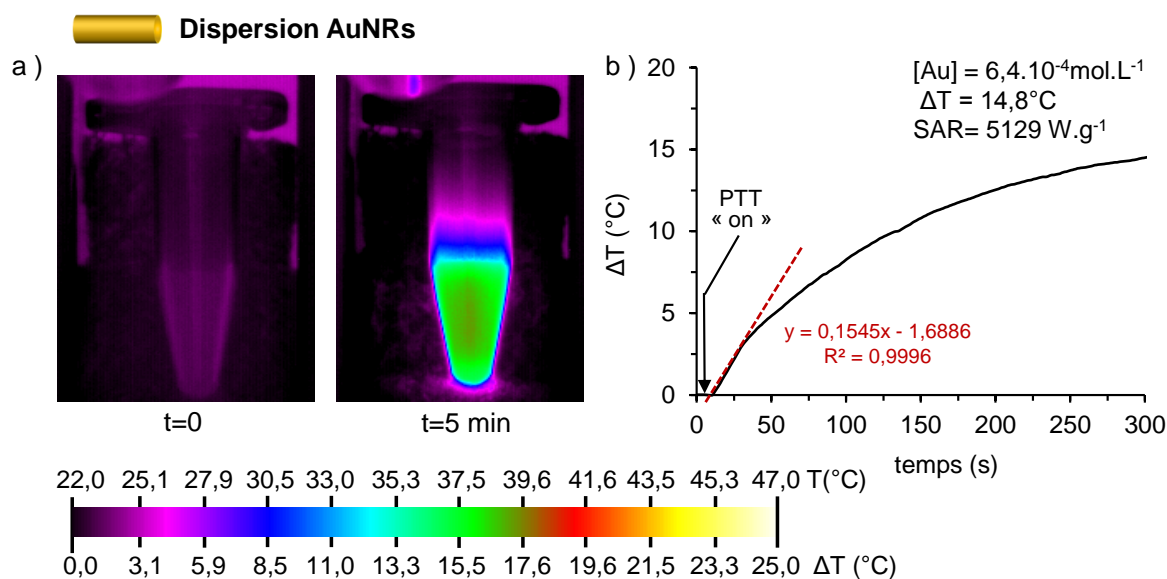


Figure 77. Pouvoir chauffant des AuNRs. (a) Images thermiques d'une dispersion d'AuNRs ($V = 150 \mu\text{L}$, $[\text{Au}] = 6,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) enregistrées avec une caméra infrarouge (FLIR SC7000) avant (t_0 , photo de gauche) et après irradiation ($t = 5 \text{ min}$, photo de droite) avec un laser-NIR 808 nm à $0,3 \text{ W.cm}^{-2}$, pendant 5 min. (b) Évolution de la température de cette dispersion en fonction du temps sous irradiation laser-NIR.

C. Influence de la puissance du laser

Afin d'étudier l'influence de la puissance du laser sur le pouvoir chauffant des nanobâtonnets d'or, une dispersion d'AuNRs ($V = 150 \mu\text{L}$, $[\text{Au}] = 6,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) est soumise à une irradiation avec un laser-NIR 808 nm, avec une puissance variable de $0,15$ à $2,4 \text{ W.cm}^{-2}$ pendant la même durée (5 min). Les images thermiques de la Figure 78a montrent clairement que pour une même durée d'irradiation, la température atteinte est directement reliée à la puissance du laser. Ainsi, après 5 min d'irradiation-NIR, la température de l'échantillon augmente à $32, 41, 56, 81$ et 82°C , respectivement pour une puissance de $0,15 ; 0,3 ; 0,6 ; 1,2$ et $2,4 \text{ W.cm}^{-2}$. À partir de $0,3 \text{ W.cm}^{-2}$, la chaleur commence même à se propager en dehors du flacon contenant la dispersion d'AuNRs en chauffant le support en mousse. Pour la puissance la plus élevée ($2,4 \text{ W.cm}^{-2}$), la température de la dispersion atteinte au bout de 5 min d'irradiation est de 83°C ; et la température du support en mousse à proximité des parois du flacon est de 55°C .

Les courbes de la Figure 78b montrent bien que lorsque le laser est allumé (mode *on*) la température augmente et lorsque le laser est éteint (mode *off*) la chauffe de la dispersion

est arrêté. En fonction de la température maximale atteinte, l'échantillon peut prendre plus ou moins de temps pour refroidir. Comme prévu d'après les données fournies dans la littérature, la valeur du SAR augmente linéairement avec la puissance du laser^{36,37}. Ici, une augmentation de 2 046 à 14 266 W.g⁻¹ est observée lorsque la puissance du laser est amplifiée de 0,15 à 1,2 W.cm⁻² (Figure 78c). Si l'on continue à augmenter la puissance du laser appliqué, la température globale de la dispersion continue à augmenter jusqu'à atteindre un maximum (symbolisé par un plateau sur les courbes orange et rouge de la Figure 78b). Ce plateau est atteint lorsque la température de la dispersion s'élève au-dessus de 80 °C ; ainsi cette limite est due probablement au début de l'ébullition de la dispersion, dont le solvant est l'eau. De même, plus la puissance du laser est élevée, plus le temps pour atteindre une température donnée sera court pour atteindre le plateau. Ainsi par exemple pour atteindre 42 °C, il faut irradier l'échantillon pendant environ 5 min avec une puissance appliquée de 0,3 W.cm⁻² ; alors qu'il faut seulement 30 s avec une puissance à 2,4 W.cm⁻² pour atteindre la même température.

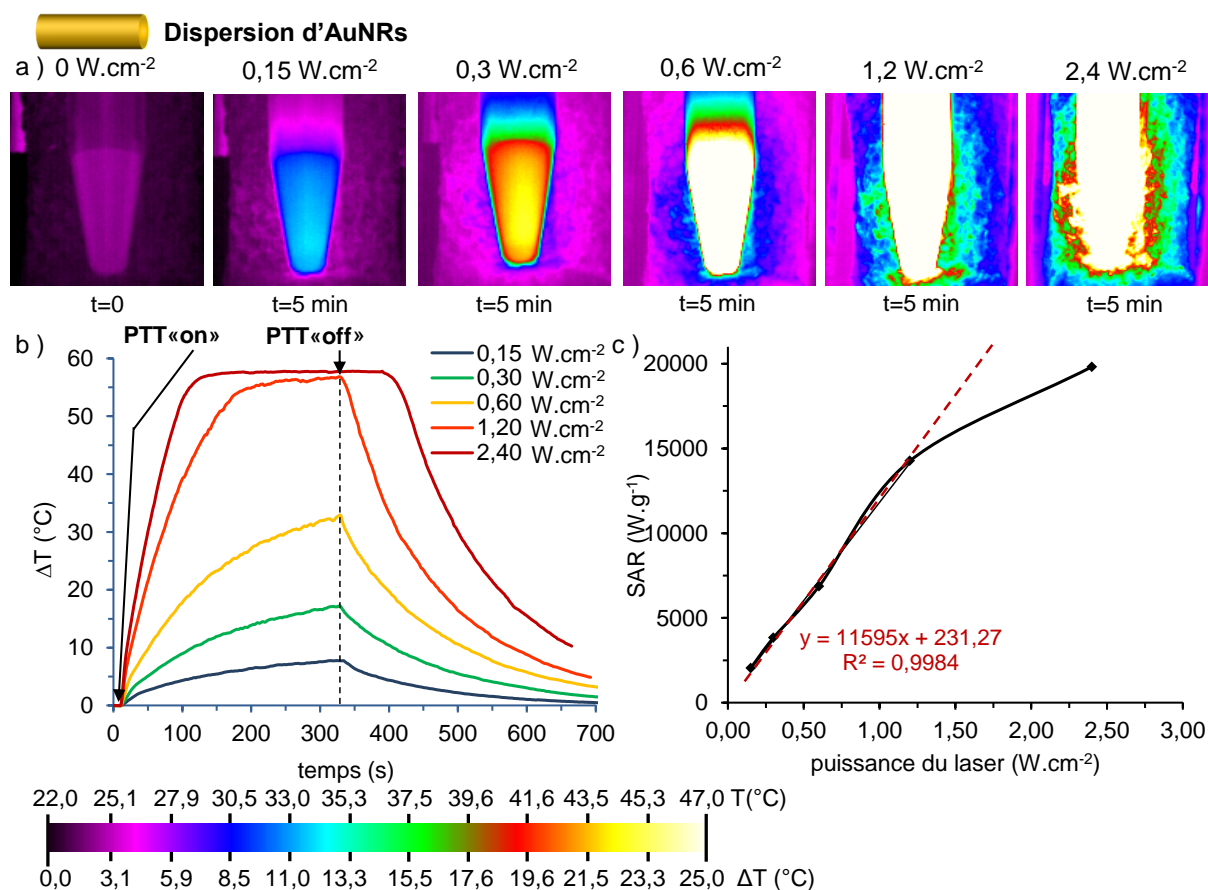


Figure 78. Influence de la puissance du laser-NIR sur le pouvoir chauffant (SAR) des AuNRs. (a) Images thermiques d'une dispersion d'AuNRs ([Au] = 8,4.10⁻⁴ mol.L⁻¹) enregistrées avec une caméra infrarouge (FLIR SC7000) avant (t₀) et après irradiation (t = 5min) avec un laser-NIR 808 nm à différentes puissances, de 0,15 à 2,4 W.cm⁻², pendant 5 min. (b) Évolution de la température des

dispersions en fonction du temps sous irradiation laser-NIR. (c) Évolution du SAR en fonction de la puissance du laser.

D. Influence de la concentration en AuNRs

Pour évaluer l'influence de la concentration en or de la dispersion d'AuNRs, plusieurs lots d'AuNRs de concentration $[Au] = 42 ; 84 ; 168 \text{ et } 840 \mu\text{M}$, sont irradiés avec la même puissance du laser et la même durée ($0,3 \text{ W.cm}^{-2}$, 5 min). Durant l'exposition au laser-NIR, une élévation de température est observée pour toutes les dispersions d'AuNRs et elle est directement proportionnelle à la concentration en or. Ainsi l'élévation de température la plus faible enregistrée ($\Delta T = 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$) est obtenue pour la concentration en or et la puissance du laser les plus faibles ($[Au] = 42 \mu\text{M}$, et $P = 0,15 \text{ W.cm}^{-2}$). De même, la température la plus forte enregistrée est de $82,8 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta T = 57,8 \text{ }^\circ\text{C}$), et correspond à la puissance laser et à la concentration en or les plus élevées ($[Au] = 840 \mu\text{M}$; $P = 2,40 \text{ W.cm}^{-2}$). Comme décrit précédemment, cette température semble être la température maximale que l'on puisse atteindre, dû probablement à l'ébullition de l'eau dans la dispersion.

Par ailleurs, la valeur de SAR est inversement proportionnelle à la concentration en AuNRs en dispersion dans l'eau (Figure 79a et 8b). À $0,15 \text{ W.cm}^{-2}$, les valeurs de SAR des différents lots d'AuNRs sont très proches, indépendamment de la concentration en or (SAR = 8,60 ; 3,57 ; 3,07 et $2,04 \text{ W.cm}^{-2}$ respectivement pour $[Au] = 42 ; 84 ; 168 \text{ et } 840 \mu\text{M}$). Dans ces conditions, la variation entre le SAR le plus faible et le plus fort est de $\Delta\text{SAR} = 6,7 \text{ W.cm}^{-2}$. Par contre, lorsque les échantillons sont irradiés à une puissance 16 fois supérieure ($2,40 \text{ W.cm}^{-2}$), la valeur de SAR augmente si la concentration en AuNRs de la dispersion diminue. Pour cette puissance, les valeurs de SAR sont 96,27 ; 73,25 ; 43,21 et $19,82 \text{ W.cm}^{-2}$ pour $[Au] = 42 ; 84 ; 168 \text{ et } 840 \mu\text{M}$ respectivement. Dans ces conditions, la variation entre le SAR le plus faible et le plus fort est de $\Delta\text{SAR} = 76,5 \text{ W.cm}^{-2}$.

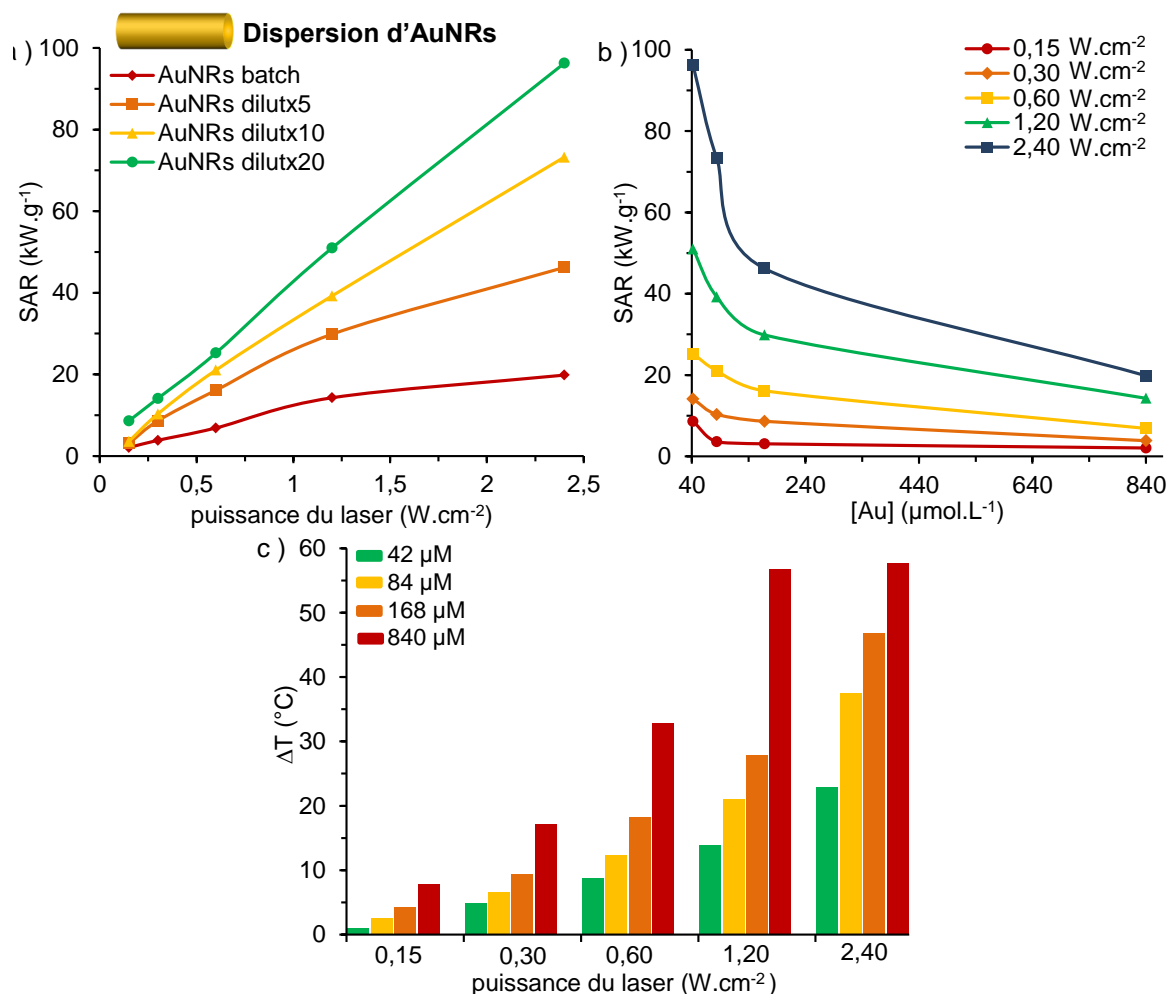


Figure 79. Influence de la concentration en or d'une dispersion en AuNRs sur le pouvoir chauffant SAR. Évolution du SAR en fonction (a) de la puissance du laser et (b) de la concentration en or [Au]. (c) Élévation moyenne de la température enregistrée pour des dispersions aqueuses d'AuNRs à différentes concentrations en or ([Au] = 42 ; 84 ; 168 et 840 μM) soumises à 5 min d'irradiation avec un laser-NIR 808 nm et à des puissances différentes. (P = 0,15 ; 0,30 ; 0,60 ; 1,20 et 2,40 W.cm⁻²).

2. Les nanogels plasmoniques – PlasmNanoGels

Les nanogels hybrides plasmoniques sont des nanogels contenant des nanoparticules d'or dans leur matrice de polymères. Ici, nous présentons la synthèse et la caractérisation des nanogels hybrides contenant des nanobâtonnets d'or (AuNRs). Ces particules présentes à l'intérieur ou à la surface des nanogels leur confèrent des propriétés plasmoniques leur permettant de produire de la chaleur sous irradiation d'une lumière proche infrarouge.

2.1 Matériel

Des nanogels à base de (macro)-monomères dérivés d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs) synthétisés précédemment (Cf. chapitre II). De l'acide méthacrylique (MAA – Sigma-Aldrich) pour fonctionnaliser les nanogels avec des groupements carboxyliques ($-\text{COOH}/-\text{COO}^-$). Du méthacrylate de glycidyle (GMA, $M_n = 142,2 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich), du 1,4-dithiothréitol (DTT, $M_n = 154,2 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich), de l'hydroxyde de sodium en pastilles (NaOH, $M_n = 40,0 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich). Tous les produits sont utilisés sans purification ultérieure.

2.2 Synthèse des nanogels plasmoniques – PlasmNanoGels

Pour synthétiser les nanogels plasmoniques (PlasmNanoGels) à base de (macro)-monomères d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs) et de nanobâtonnets d'or (AuNRs), nous avons choisi deux stratégies :

- (1) La synthèse des nanogels fonctionnalisés avec des groupements carboxyliques ($-\text{COOH} / -\text{COO}^-$), notés PEG-co-MAA
- (2) La synthèse des nanogels fonctionnalisés avec des groupements thiols ($-\text{SH}$), notés PEG-co-SH

Dans les deux cas, les nanogels hybrides sont d'abord synthétisés par copolymérisation radicalaire par précipitation dans l'eau en suivant le protocole détaillé au chapitre II. Puis les AuNRs sont ajoutés post-synthèse et liés à la matrice de polymères, soit par des groupements carboxyliques, soit par des groupements thiols.

Protocole : Dans les deux cas, nous avons tout simplement mis dans un flacon 1 mL de la dispersion de nanogels souhaitée (PEG-co-MAA ou PEG-co-SH) et 2 mL de la dispersion d'AuNRs ($[\text{Au}] = 5,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) ; puis le mélange est laissé sous agitation à 25 °C pendant 24 heures.

Préalablement au mélange, pour les nanogels PEG-co-MAA ayant des fonctions carboxyliques, nous avons placé les nanogels dans un milieu pH 7,5 (solution tampon d’HEPES à 0,1 M), afin de former les fonctions carboxylates $-\text{COO}^-$ et favoriser les interactions électrostatiques entre les nanogels chargés négativement et les AuNRs chargés positivement. Pour les nanogels PEG-co-SH, le mélange est effectué dans de l’eau ultrapure Milli-Q. À la fin de l’étape d’assemblage, les PlasmNanoGels sont purifiés par 3 cycles de centrifugation à 25 °C, à une vitesse de 10 000 tr.min⁻¹ pendant 30 min, avec une minicentrifugeuse MiniSpin® (Eppendorf). La concentration en or dans les PlasmNanoGels a été déterminée par ICP-AES, en suivant le même protocole que pour le dosage des AuNRs en dispersion (Tableau 13).

Ces deux méthodes, semblables à celle utilisée pour l’élaboration des nanogels magnétiques, permettent de contrôler les propriétés physico-chimiques des nanogels et des AuNRs en les synthétisant séparément, puis de choisir la quantité d’or à incorporer dans la matrice. Les groupements carboxyliques et thiols vont interagir avec la surface des AuNRs par un déplacement des molécules de CTAB enrobant les AuNRs (technique de déplacement de ligands). À pH 7,5, les groupements carboxyliques, chargés (-) peuvent former un assemblage électrostatique avec les AuNRs (chargés (+) via les molécules de CTAB), et les groupements thiols peuvent former un assemblage plus fort avec la surface des AuNRs par formation des liaisons Au-S et un déplacement des molécules de CTAB.^{28,30} La Figure 80 illustre les étapes de synthèse des nanogels PlasmNanoGels.

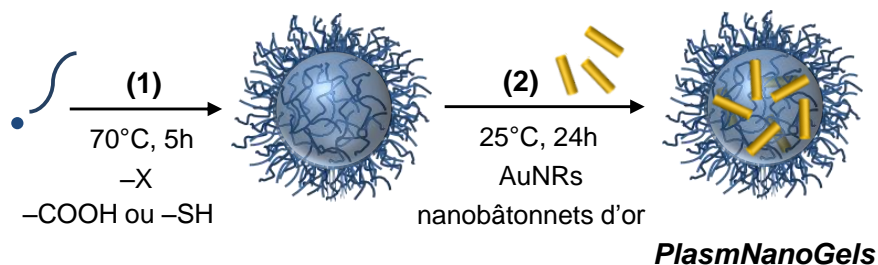


Figure 80. Illustration de la synthèse des nanogels plasmoniques (PlasmNanoGels). L’assemblage est effectué, soit par complexation des groupements carboxyliques ($-\text{COOH}/-\text{COO}^-$), soit par la formation de liaisons covalentes des groupements thiols ($-\text{SH}$) avec la surface des nanobâtonnets d’or.

Plusieurs lots de PlasmNanoGels ont été préparés en faisant varier, soit la nature du groupement ($-\text{SH}$ ou $-\text{COOH}$), soit la quantité d’AuNRs ajoutée initialement. La composition finale des différents échantillons, ainsi que les quantités initiales des dispersions de nanogels et d’AuNRs utilisées dans le mélange sont regroupées dans le Tableau 13. Le ratio massique en or correspond à $Au\%m = m_{Au} / (m_{Au} + m_{nanogels})$.

Tableau 13. Tableau récapitulatif de la composition de PlasmNanoGels

	Composition initiale				Composition finale ^b	
	V _{nanogels} (mL)	V _{AuNRs} (mL)	[Au] (mol.L ⁻¹)	Au% m initial	[Au] (mol.L ⁻¹)	Au% m final
PEG-co-SH-AuNRs3,1% m	1,00	2,00	1,1.10 ⁻³	3,08	7,2.10 ⁻⁴	2,85
PEG-co-MAA-AuNRs3,1% m	1,00	2,00	1,1.10 ⁻³	3,08	8,4.10 ⁻⁴	2,40
PEG-co-MAA-AuNRs1,6% m	1,00	1,00	5,4.10 ⁻⁴	1,56	4,0.10 ⁻⁴	1,16
PEG-co-MAA-AuNRs0,5% m	1,50	0,50	2,7.10 ⁻⁴	0,53	2,0.10 ⁻⁴	0,57
PEG-co-MAA-AuNRs0,2% m	1,75	0,25	1,4.10 ⁻⁴	0,23	8,8.10 ⁻⁵	0,26
PEG-co-MAA-AuNRs0,1% m	1,88	0,13	7,0.10 ⁻⁵	0,11	5,1.10 ⁻⁵	0,15

^b La composition finale de l'assemblage est mesurée par ICP-AES.

La quantité de PlasmNanogels présente dans la dispersion ($m_{\text{polymère}+\text{AuNRs}}$) est estimée par analyse gravimétrique en mesurant l'extrait sec comme décrit au chapitre II. Ici, les concentrations massiques des lots PEG-co-MAA-AuNRs3,1% m et PEG-co-SH-AuNRs3,1% m sont estimées à $[\text{PlasmNanogels}] = 6,7 \text{ mg nanogels.mL}^{-1}$ et $4,9 \text{ mg nanogels.mL}^{-1}$ respectivement.

2.3 Morphologie, taille et charge des PlasmNanoGels

À partir de la concentration massique en PlasmNanoGels obtenue par extrait sec, et du dosage d'or mesuré par ICP-AES, on estime qu'1 mL de dispersion de PEG-co-MAA-AuNRs contient $6,7 \text{ mg nanogel.mL}^{-1}$ et $1,65.10^{-4} \text{ g or.mL}^{-1}$; il est donc possible de calculer le ratio massique X en AuNRs, tel que $X = m_{\text{AuNRs}} / (m_{\text{polymères}} + m_{\text{AuNRs}})$. Les nanogels seront notés PlasmNanoGels-X% m. Les nanogels plasmoniques obtenus à partir de l'assemblage des nanogels PEG-co-MAA et des nanobâtonnets d'or AuNRs ont une morphologie sphérique avec un diamètre moyen de 564 nm, comme observé sur les clichés TEM de la Figure 81a. Tous les AuNRs sont chargés sur les nanogels, et seulement une quantité extrêmement faible d'AuNRs est observée à l'extérieur des nanogels sur les clichés TEM. Les AuNRs semblent distribués de manière homogène sur toute la surface des nanogels. Néanmoins, étant donné qu'il s'agit d'une projection 2D, il est difficile de localiser précisément les AuNRs dans la structure et de savoir s'ils sont à l'intérieur de la matrice de polymères ou à la surface.

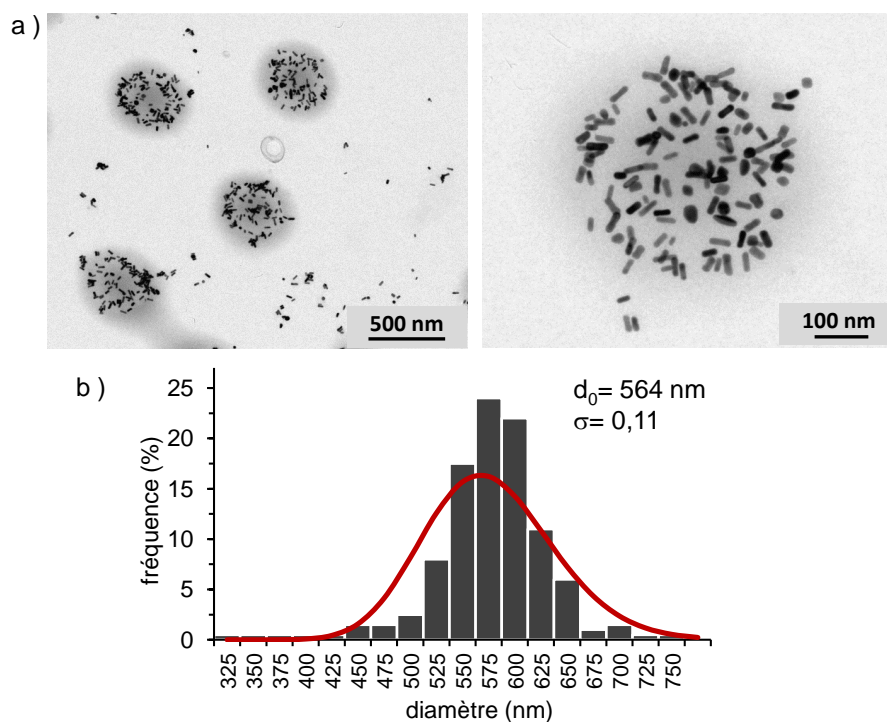


Figure 81. (a) Clichés TEM montrant des nanogels plasmoniques PEG-co-MAA-AuNRs-3,1% m. (b) Distribution en taille de ces nanogels, obtenue par analyse de plusieurs clichés TEM ($n = 200$ nanogels) et ajustée par une loi log-normale (courbe rouge).

Par ailleurs, le diamètre hydrodynamique (d_h), ainsi que la charge (potential zéta ζ) des PlasmNanoGels-X% m ont été mesurés par DLS. Dans un milieu physiologique (pH 7,5, solution tampon HEPES à 0,1 M) et à 25 °C, les PlasmNanoGels sont dans un état gonflé. Tout d’abord, le d_h diminue de 643 à 616 nm, lorsque le ratio massique X en AuNRs augmente de 0 à 0,5%. Ceci est dû probablement à des interactions électrostatiques entre les AuNRs chargés positivement, et les groupements $-\text{COO}^-$ des chaînes de polymère chargées négativement. Sans ajout d’AuNRs, les chaînes de polymère sont chargées négativement, elles vont donc se déplier et s’éloigner les unes des autres par répulsions électrostatiques et stériques, provoquant l’augmentation de la taille des nanogels. Lors de l’incorporation d’AuNRs dans la matrice de polymères, les AuNRs chargés (+) vont interagir avec les chaînes de polymères, chargées (-), provoquant ainsi la contraction des polymères sur les AuNRs, l’écrantage des charges des groupements carboxyliques, et donc la diminution de la taille des nanogels. Ceci est confirmé par la variation du potential zéta ζ de -12,7 à -9,4 mV respectivement pour $X = 0$ et 0,5% m. Par ailleurs, tous les PlasmNanoGels-X% m étudiés ci-dessus sont stables à pH 7,5 indépendamment de la quantité d’AuNRs incorporés.

Les principales caractéristiques des PlasmNanoGels-X% m étudiés dans cette partie sont regroupées dans le Tableau 14.

Tableau 14. Principales caractéristiques des PlasmNanoGels-X% m chargés avec différents ratios massiques X en AuNRs (X = 0 à 3,1% m) à pH 7,5*

	PEG-co-MAA-AuNRs-X% m - pH 7,5					
X (%m AuNRs)	0	0,1	0,2	0,5	1,6	3,1
[Au] (mol.L⁻¹)	0	5,1.10 ⁻⁵	8,8.10 ⁻⁵	2,0.10 ⁻⁴	4,0.10 ⁻⁴	8,4.10 ⁻⁴
d_h à 25°C (nm)	643	628	628	616	653	558
(PDI)	(0,087)	(0,108)	(0,100)	(0,151)	(0,166)	(0,114)
d_h à 50°C (nm)	542	493	484	491	505	496
(PDI)	(0,078)	(0,041)	(0,044)	(0,056)	(0,020)	(0,216)
Q	1,66	2,07	2,18	1,97	2,16	1,42
ζ (mv)	-12,67	-11,33	-11,63	-11,63	-11,30	-9,40

*Le diamètre hydrodynamique (d_h) et l'indice de polydispersité (PDI) ont été mesurés à 25 et 50 °C ; le taux de gonflement (Q), le potentiel zéta (ζ) et l'intervalle de Température de Transition de Phase volumique (VPTT) ont été mesurés par DLS.

2.4 Effet de la lumière

2.4.1 Propriétés optiques

Nous avons étudié les propriétés optiques des AuNRs après leur encapsulation dans les nanogels. La Figure 82a montre que les propriétés d'absorption des AuNRs n'ont pas changé de façon significative après leur incorporation dans les nanogels ; les bandes plasmoniques longitudinales et transversales sont encore visibles dans le spectre d'absorption des nanogels. Un léger déplacement des bandes plasmoniques longitudinales vers le bleu est observé, de 753 vers 724 nm. Ceci est dû probablement à un changement de la constante diélectrique du milieu entourant les AuNRs³⁸.

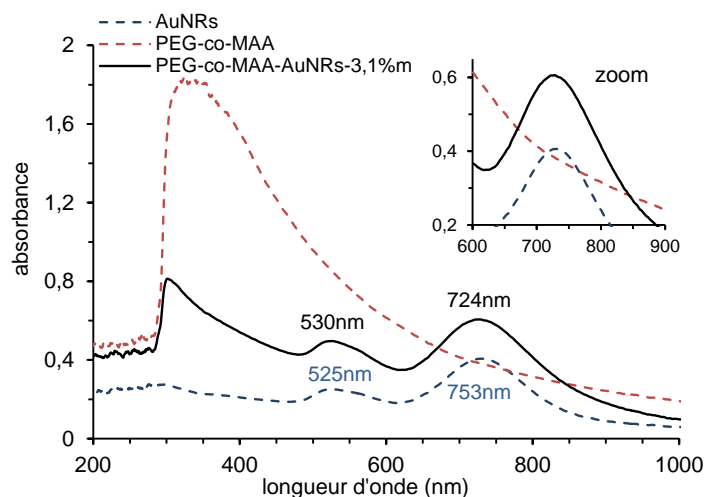


Figure 82. Spectre d'absorption UV-infrarouge des PlasmNanoGels. (a) Comparaison de spectres UV-infrarouge des AuNRs seuls en solution (bleu), des nanogels PEG-co-MAA seuls (rouge) et des PlasmNanoGels-3,1% m (noir).

2.4.2 Propriétés de photothermie

Nous avons étudié le pouvoir chauffant des PlasmNanoGels-3,1% en fonction de la concentration en nanohybrides, et donc en fonction de la concentration en or. La Figure 83a montre les images thermiques, avant et après irradiation laser, d'une dispersion de PlasmNanoGels-3,1% m à différentes concentrations et enregistrées avec une caméra infrarouge.

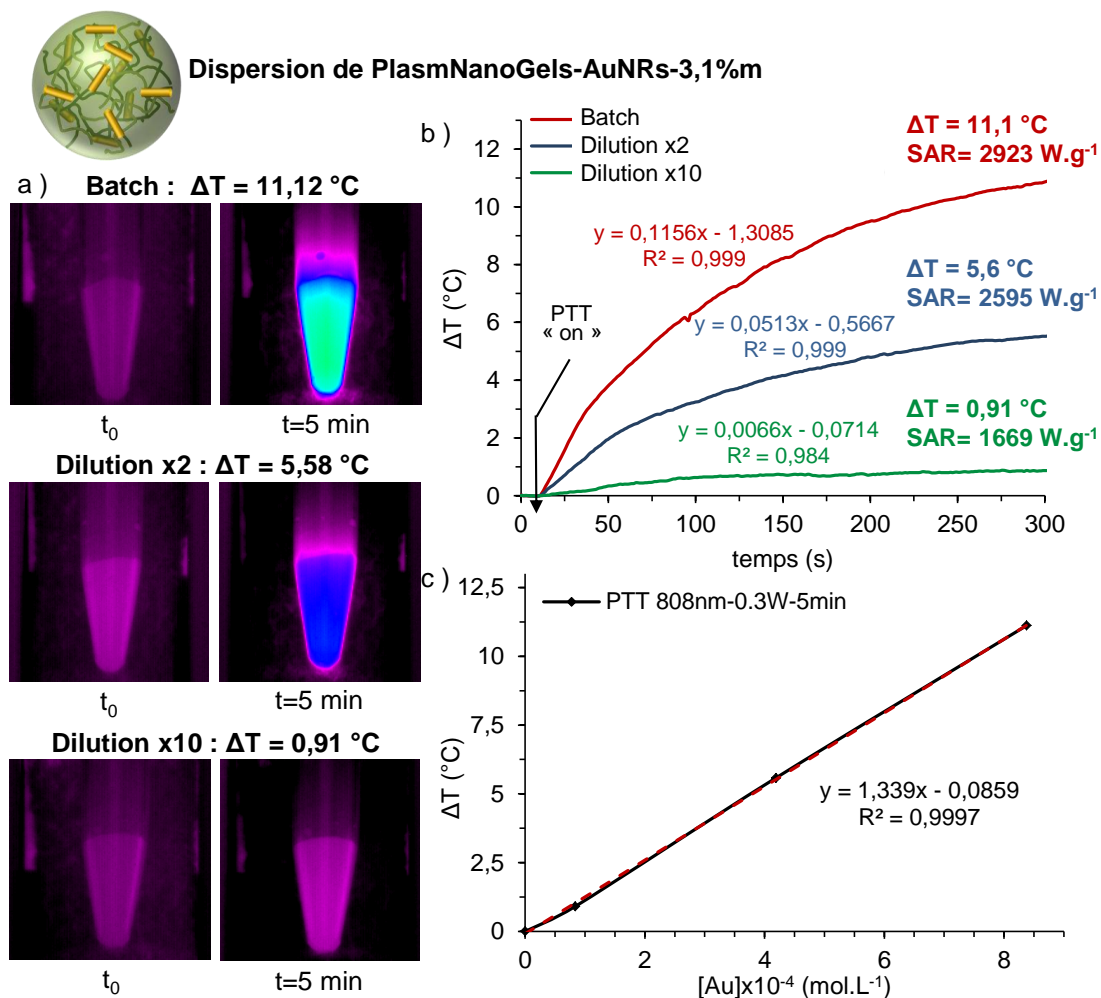


Figure 83. Pouvoir chauffant des PlasmNanoGels-3,1% m. (a) Images thermiques d'une dispersion de PlasmNanoGels-3,1% m à différentes concentrations (dilutions obtenues à partir d'une solution batch) et enregistrées avec une caméra infrarouge (avec $[\text{Au}] = 8,4 \cdot 10^{-4}$ pour le batch) avant (t_0) et après irradiation ($t = 5\text{ min}$) avec un laser-NIR 808 nm à $0,3\text{ W.cm}^{-2}$, pendant 5 min. Évolution de la température des dispersions sous irradiation laser-NIR en fonction (b) du temps et (c) de la concentration en or $[\text{Au}]$.

La chaleur produite est proportionnelle à la concentration en or $\Delta T = 0,91$; 5,6 et $11,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour une faible durée d'irradiation (5 min) avec $[\text{Au}] = 8,38 \cdot 10^{-5}$; $4,19 \cdot 10^{-4}$ et $8,4 \cdot 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ respectivement. Cette augmentation de la température correspond respectivement à SAR = 1669 ; 2595 et 2923 W.g^{-1} (Figure 83b et 12c). La fenêtre thermique thérapeutique pour réaliser l'ablation des tumeurs cancéreuses correspond à l'intervalle de températures entre 45 et $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ ⁷. Ainsi, l'utilisation de l'échantillon PlasmNanoGels-3,1% m ayant une concentration en or de $[\text{Au}] = 8,4 \cdot 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ peut être envisagée pour une thérapie photothermique.

3. Les nanogels magnéto-plasmoniques

MagPlasmNanoGels

Dans cette partie, nous proposons l'élaboration d'une nouvelle classe de nanogels hybrides combinant les propriétés des nanoparticules magnétiques NPMs (guidage magnétique, hyperthermie magnétique) avec celles des nanobâtonnets d'or AuNRs (propriétés optiques, photothermie). L'objectif est de pouvoir contrôler par deux stimuli externes (AMF et PTT) la libération d'une ou plusieurs molécules, augmenter la température pour détruire les tumeurs et observer les synergies entre l'hyperthermie magnétique et la photothérapie. Ainsi, nous présentons la synthèse et la caractérisation des nanogels dits magnéto-plasmoniques (MagPlasmNanoGels), contenant en même temps des NPMs et des AuNRs. Deux morphologies ont été développées pour la synthèse des MagPlasmNanoGels : (1) des nanogels avec une structure simple et chargés en NPMs et AuNRs ; (2) des nanogels avec une structure cœur@coquille contenant les NPMs dans le cœur et les AuNRs dans la coquille, et vice-versa. Les NPMs et les AuNRs sont les mêmes que ceux utilisés pour la synthèse des nanogels magnétiques et des nanogels plasmoniques. Les principales caractéristiques de ces particules sont regroupées dans le Tableau 15.

Tableau 15. Principales caractéristiques des nanoparticules d'oxyde de fer (NPMs) et des nanobâtonnets d'or (AuNRs) utilisés dans la synthèse des nanogels magnéto-plasmoniques.

	NPMs	AuNRs
Composition chimique	oxydes de fer en maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	or métallique Au^0
Forme *	sphère	cylindre – bâtonnet
Taille * (écart-type)	diamètre $d = 11,5 \text{ nm}$ (0,33)	longueur $a = 39,5 \text{ nm}$ (0,18) largeur $b = 11,8 \text{ nm}$ (0,17) AR = 3,3
Potentiel zéta (ζ)	25,3 mV	45,3 mV
Surface *	$S = 415 \text{ nm}^2$	$S = 1683 \text{ nm}^2$
Volume *	$V = 796 \text{ nm}^3$	$V = 4320 \text{ nm}^3$
Propriétés	superparamagnétiques	plasmoniques
Stimuli	champ magnétique alternatif (AMF)	irradiation proche infrarouge (PTT)
Génération de chaleur	hyperthermie magnétique	photothermie

*La forme, la taille, la surface et le volume des nanoparticules sont obtenus à partir du traitement des images TEM avec le logiciel ImageJ.

3.1 Matériel

Des nanogels à base de (macro)-monomères dérivés d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs) synthétisés précédemment (Cf. chapitre II). De l'acide méthacrylique (MAA – Sigma-Aldrich) pour fonctionnaliser les nanogels avec des groupements carboxyliques ($-\text{COOH}/-\text{COO}^-$). Du méthacrylate glycidyle (GMA, $M_n = 142,2 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich), du 1,4-dithiothréitol (DTT, $M_n = 154,2 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich), de l'hydroxyde de sodium en pastilles (NaOH, $M_n = 40,0 \text{ g.mol}^{-1}$ – Sigma-Aldrich) pour fonctionnaliser les nanogels avec des groupements thiols ($-\text{SH}$). Les deux groupements sont utilisés pour les nanogels ayant une structure simple et une structure en cœur@coquille. Tous les produits ont été utilisés sans purification ultérieure.

3.2 Synthèse des MagPlasmNanoGels à structure simple

Les MagPlasmNanoGels à structure simple sont composés d'une matrice de polymères réticulés à base de (macro)-monomères d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs). Cette matrice est fonctionnalisée avec des groupements carboxyliques ($-\text{COOH}/-\text{COO}^-$), permettant de complexer à la fois des NPMs et des AuNRs à l'intérieur et/ou à la surface des nanogels.

Protocole : Tout d'abord, les nanogels hybrides sont synthétisés par copolymérisation radicalaire par précipitation dans l'eau en suivant le protocole détaillé au chapitre II. Puis les NPMs et les AuNRs sont ajoutés post-synthèse et liés à la matrice de polymères, à partir des solutions mères de concentration $[\text{Fe}]_{\text{mère}} = 1,14 \text{ mol.L}^{-1}$ et $[\text{Au}]_{\text{mère}} = 5,4.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ respectivement. Pour effectuer l'assemblage de ces nanoparticules inorganiques avec les nanogels, trois protocoles ont été envisagés. L'ajout simultané des AuNRs et des NPMs, ainsi que l'ajout successif des NPMs, puis des AuNRs n'ont conduit à aucun résultat concluant. Néanmoins, des nanogels hybrides magnéto-plasmoniques peuvent être préparés en inversant l'ordre d'ajout des nanoparticules, c'est-à-dire en ajoutant d'abord les AuNRs, puis les NPMs. Ce protocole est également découpé en deux étapes. La 1^{ère} étape consiste à synthétiser des nanogels plasmoniques comme décrit précédemment. Étant donné que ces nanogels sont synthétisés dans une solution tampon d'HEPES (0,1M ; pH 7,5), trois cycles de centrifugation sont effectués (10 000 rpm, 30 min) pour enlever la solution tampon d'HEPES (surnageant) et la remplacer par de l'eau distillée. La 2^{ème} étape consiste à ajouter les NPMs en suivant les mêmes étapes de synthèse que pour les nanogels magnétiques (Cf. chapitre III).

La Figure 84 illustre les étapes de synthèse des nanogels MagPlasmNanoGels à structure simple.

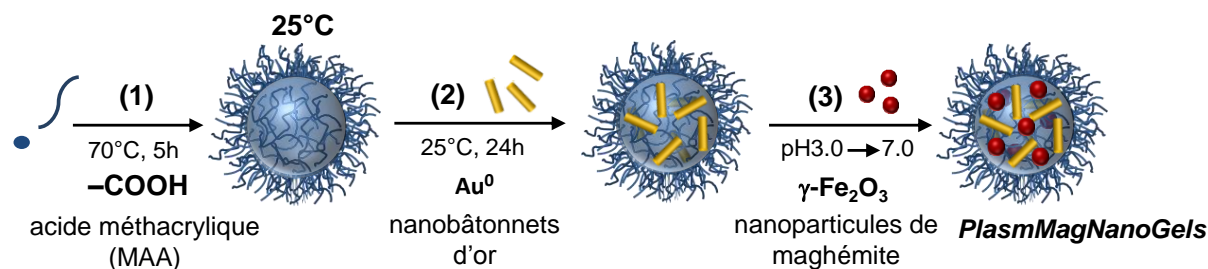


Figure 84. Illustration de la synthèse des MagPlasmNanoGels à structure simple par assemblage des nanogels et des nanoparticules inorganiques (NPMs et AuNRs).

En suivant ce protocole, trois lots des MagPlasmNanoGels ont été synthétisés. Les conditions de synthèse sont les mêmes pour les trois lots (pH, quantité initiale d'AuNRs, temps d'agitation); la seule variable est la quantité de NPMs ajoutée. Les MagPlasmNanoGels à structure simple seront notés PEG-co-MAA-NPMsX%-AuNRsY%, avec X et Y respectivement les ratios massiques en or (Au%) et en fer (Fe%) tels que :

$$\text{Au \%} = m_{\text{Au}} / (m_{\text{Au}} + m_{\text{Fe}} + m_{\text{nanogels}}) \quad \text{et} \quad \text{Fe \%} = m_{\text{Fe}} / (m_{\text{Au}} + m_{\text{Fe}} + m_{\text{nanogels}}).$$

Pour simplifier l'écriture, ces nanogels seront notés FeX%-AuY%. Les quantités de nanogels et de nanoparticules inorganiques utilisées dans les assemblages sont regroupées dans le Tableau 16.

Tableau 16. Tableau récapitulatif de la synthèse de MagPlasmNanoGels à structure simple

	Composition initiale							Composition finale ^b			
	V_{nanogels} (mL)	V_{AuNRs} (mL)	[Au] (mol.L^{-1})	Au% initial	V_{NPMs} (μL)	[Fe] (mol.L^{-1})	Fe% initial	[Au] (mol.L^{-1})	Au% final	[Fe] (mol.L^{-1})	Fe% final
Fe0%-Au3,1%	1,0	2,0	$1,1 \cdot 10^{-3}$	3,18	0	0	0	$8,40 \cdot 10^{-4}$	2,41	0	0
Fe4,4%-Au3,1%	1,0	2,0	$1,1 \cdot 10^{-3}$	3,04	5,0	$5,70 \cdot 10^{-3}$	4,40	$2,73 \cdot 10^{-4}$	0,79	$1,22 \cdot 10^{-3}$	1,00
Fe15,5%-Au3,1%	1,0	2,0	$1,1 \cdot 10^{-3}$	2,69	20,0	$2,28 \cdot 10^{-2}$	15,54	$1,08 \cdot 10^{-4}$	0,31	$1,79 \cdot 10^{-3}$	1,47
Fe26,9%-Au3,1%	1,0	2,0	$1,1 \cdot 10^{-3}$	2,32	40,0	$4,56 \cdot 10^{-2}$	26,90	$5,15 \cdot 10^{-5}$	0,15	$2,73 \cdot 10^{-3}$	2,22

^b La composition finale de l'assemblage est mesurée par ICP-AES.

3.3 Synthèse des MagPlasmNanoGels à structure cœur@coquille

La deuxième morphologie étudiée pour la synthèse des nanogels magnéto-plasmoniques est la structure cœur@coquille. Le cœur et la coquille des nanogels sont tous les deux constitués de polymères à base d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (ratio molaire MEO₂MA : OEGMA₅₀₀ égale à 90 : 10) et fonctionnalisés, soit avec de l'acide méthacrylique (MAA), favorisant la complexation avec les NPMs^{39,40}; soit avec des thiols (SH), favorisant la formation de liaisons covalentes avec les AuNRs⁴¹. La Figure 85 décrit la

synthèse des MagPlasmNanoGels à structure cœur@coquille, avec un cœur magnétique et une coquille plasmonique. Les quatre étapes sont les suivantes :

Étape n°1 : Formation du cœur : par copolymérisation radicalaire par précipitation dans l'eau en suivant le protocole décrit au chapitre II. La fonctionnalisation du cœur avec des groupements carboxyliques est effectuée par ajout d'acide méthacrylique (MAA) avant de démarrer la polymérisation.

Étape n°2 : Ajout de NPMs : par complexation des groupements carboxyliques ($-\text{COOH}/-\text{COO}^-$) des polymères à la surface des NPMs. Le protocole est le même que celui décrit pour la synthèse des nanogels magnétiques au chapitre III.

Étape n°3 : Formation de la coquille : par copolymérisation radicalaire par précipitation des germes (*seed by seed precipitation polymerization*) dans l'eau en suivant le protocole décrit au chapitre II. Lors de cette étape, les cœurs servent comme sites de nucléation pour démarrer la copolymérisation de la coquille. La fonctionnalisation de la coquille avec des groupements thiols est réalisée par ajout de glycidyle méthacrylate (GMA), puis par une réaction de type chimie click thiol-époxy entre le GMA et du 1,4-dithiothreitol (DTT).

Étape n°4 : Ajout des AuNRs : par formation de liaisons covalentes entre les groupements thiols ($-\text{SH}$) et la surface des AuNRs. À la fin de l'étape d'assemblage, les MagPlasmNanoGels à structure simple et en cœur@coquille sont purifiés par 3 cycles de centrifugation à 25 °C, à une vitesse de 10 000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 30 min, avec une minicentrifugeuse MiniSpin® (Eppendorf). La concentration en or et en fer dans les MagPlasmNanoGels a été déterminée par ICP-AES (Tableau 17).

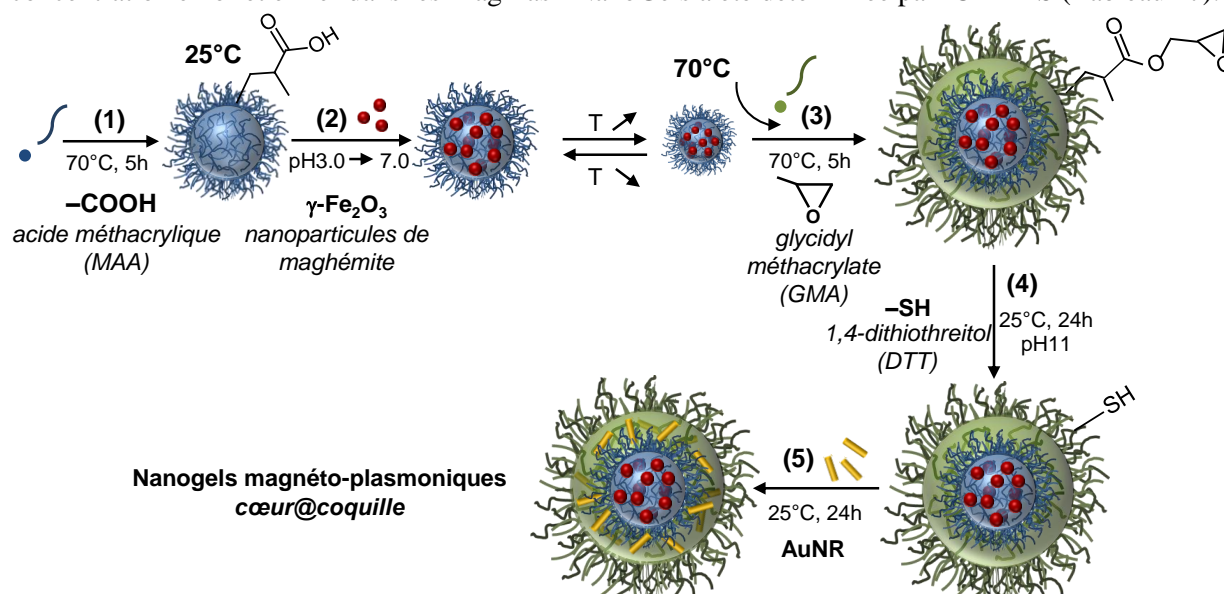


Figure 85. Illustration de la synthèse des PlasmMagNanoGels à structure cœur-NPMs@coquille-AuNRs. Les nanoparticules ont été ajoutées post-synthèse et sont liées à la matrice de polymères par des groupements carboxyliques pour les NPMs ou des thiols pour les AuNRs.

En suivant le protocole décrit ci-dessus, des nanogels cœur-magnétique@coquille-plasmonique ont été élaborés. Cette méthode permet de fonctionnaliser différemment le cœur et la coquille avec des fonctions $-\text{COOH}$ et $-\text{SH}$, et donc de compartimenter les deux types de

nanoparticules. De plus, nous avons fait varier la taille du cœur en ajoutant du tensioactif, du dodécylsulfate de sodium (SDS), comme détaillé dans le chapitre II. Ceci nous a permis de synthétiser 5 lots de nanogels avec des cœurs de diamètre différent. Pour l'élaboration de la coquille, le ratio massique $m_{\text{cœur}} : m_{\text{coquille}}$ est de 1 : 1 pour tous les nanogels. Tous ces nanogels ont été préparés avec les mêmes quantités initiales de NPMs et d'AuNRs. Ainsi, les nanogels magnéto-plasmoniques avec un cœur contenant des NPMs et une coquille contenant des AuNRs seront notés FeX%@AuY%, avec X% et Y% les ratios massiques respectivement en NPMs et AuNRs. Par ailleurs, pour synthétiser des nanogels cœur-plasmonique@coquille-magnétique, notés AuX%@FeY%, il est possible d'inverser les étapes de synthèse.

Tableau 17. Tableau récapitulatif de la synthèse de MagPlasmNanoGels à structure cœur@coquille*

Notation simplifiée	Composition finale ^b			
	[Au] (mol.L ⁻¹)	Au%m final	[Fe] (mol.L ⁻¹)	Fe%m final
Au0,71%@Fe3,9%	2,51.10 ⁻⁴	7,05.10 ⁻¹	4,89.10 ⁻³	3,89
Fe37,8%@Au62,2%	2,21.10 ⁻³	6,22.10 ⁺¹	4,73.10 ⁻³	37,75

^b La composition finale de l'assemblage est mesurée par ICP-AES.

Dans la littérature, il existe plusieurs exemples de systèmes hybrides contenant des NPMs et des AuNRs ^{42,43}. Cependant à notre connaissance, c'est la première fois que l'on prépare des nanogels magnéto-plasmoniques avec un structure cœur-magnétique@coquille-plasmonique (et vice-versa), permettant de compartimenter deux types de nanoparticules inorganiques au sein d'un même nanogel.

3.4 Morphologie, taille et charge des MagPlasmNanoGels

Les trois structures de nanogels magnéto-plasmoniques ont été observées par plusieurs techniques de microscopie électronique : microscopie électronique à transmission (TEM), microscopie électronique à transmission à balayage en champ noir annulaire à grand angle (HAADF-STEM) et STEM couplé à une analyse de spectroscopie aux rayons X à dispersion d'énergie (EDX-STEM) comme illustré sur la Figure 87. Tous les nanogels hybrides sont sphériques et contiennent à la fois des nanoparticules magnétiques et des nanobâtonnets d'or. Presque toutes les nanoparticules inorganiques sont chargées dans les nanogels, et seulement une faible quantité est observée à l'extérieur des nanogels sur la grille d'analyse. De plus, les NPMs et les AuNRs ayant une morphologie et un contraste électronique très différents, il est

facile de les distinguer sur les images TEM et HAADF-STEM. En outre, l'intensité dispersée par un atome en HAADF augmente avec le numéro atomique Z ^{7,44} avec $Z_{\text{Au}} = 79$ et $Z_{\text{Fe}} = 26$, les AuNRs apparaissent donc plus brillants que les NPMs dans les nanogels. La présence d'AuNRs et de NPMs a également été vérifiée par dosage de la concentration en fer et en or des échantillons par ICP-AES (Cf. Tableau 17).

Concernant les nanogels à structure simple et fonctionnalisés uniquement avec des groupements $-\text{COOH}/-\text{COO}^-$, les NPMs et les AuNRs sont distribués dans toute la matrice de polymères. Sur ces images 2D, il est difficile de savoir si les particules sont à l'intérieur ou à la surface des nanogels. Tous les MagPlasmNanoGels à structure simple ont été préparés à partir du même lot de nanogels plasmoniques, et par ajout d'une quantité de NPMs variable. Ainsi, ils devraient tous contenir la même quantité d'AuNRs finale. Néanmoins, nous avons constaté que lorsque la quantité de NPMs ajoutée augmente, la quantité d'AuNRs restant incorporée dans les nanogels diminue. Ce phénomène est clairement visible sur les images TEM des nanogels FeX%-Au3,1% contenant un ratio massique initial en Au constant (3,1%) et un ratio massique initial en Fe croissant, avec X = 4,4 ; 15,5 et 26,9% respectivement pour les images (a1), (a2) et (a3) de la Figure 86. Le désassemblage des AuNRs au sein des nanogels est dû probablement à une plus forte affinité de la matrice de polymères pour $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ que pour Au^0 . À 25 °C et pH 5,5, le d_h des PlasmMagNanoGels à structure simple augmente de 423 à 515 nm lorsque la quantité ajoutée de NPMs augmente de X = 4,4 à 26,9% m. Cette tendance avait déjà été constatée pour les MagNanoGels contenant uniquement des NPMs. En ce qui concerne les nanogels cœur-NPMs@coquille-AuNRs, l'ajout de tensioactif lors de la synthèse du cœur permet bien de diminuer la taille globale des nanogels : pour SDS = 0 ; 1,7 ; 4,4 ; 8,8 et 19,1 mg, le d_h des nanogels est respectivement 475 ; 350 ; 319 ; 261 et 252 nm (Cf. chapitre II). Pour les nanogels cœur-AuNRs@coquille-NPMs, le d_h mesuré par DLS (2213 nm) est très élevé par rapport à celui observé sur les clichés TEM (270 nm). Les nanogels sont donc très agrégés dans la dispersion.

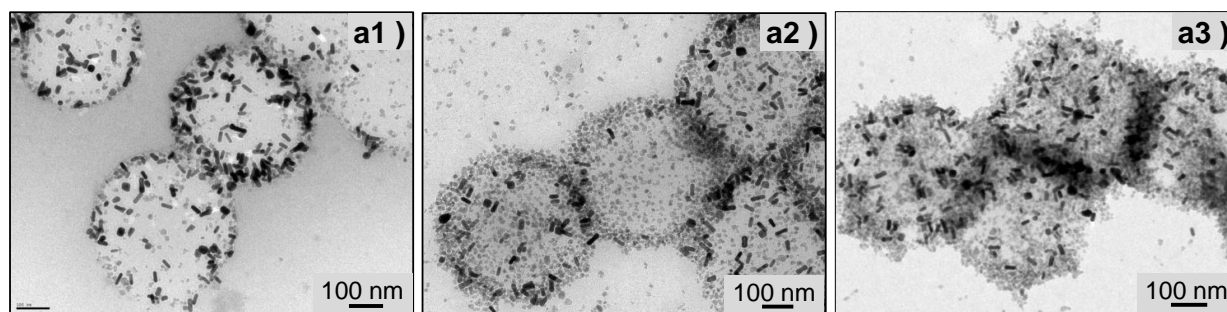


Figure 86. Clichés TEM des nanogels magnéto-plasmoniques à structure simple, FeX%-AuY% avec un ratio massique en NPMs X = 4,4 ; 15,5 et 26,9% et un ratio massique en AuNRs Y = 3,1%.

En ce qui concerne les nanogels à structure cœur-magnétique@coquille-plasmonique, il est possible d'incorporer en même temps des grandes quantités d'AuNRs et de NPMs. Il semblerait que les AuNRs se trouvent préférentiellement à la surface des nanogels, ce qui serait en accord avec la structure cœur-NPMs@coquille-AuNRs souhaitée (Tableau 16). D'autre part, l'image de la Figure 87c correspond à des nanogels cœur-plasmonique@coquille-magnétique. Les NPMs sont présentes dans tout le nanogel, néanmoins, elles semblent localisées de manière préférentielle à la surface des nanogels, formant une coquille très dense en particules, d'environ 45 nm d'épaisseur, laquelle correspond bien à la structure cœur-AuNRs@coquille-NPMs attendue. Même si sur l'image, très peu d'AuNRs sous forme de bâtonnets sont observés dans le cœur des nanogels, la présence d'or a été confirmée par dosage en ICP-AES (Tableau 17).

En outre, la cartographie chimique par EDS-STEM de ces nanogels montre bien la présence des nanoparticules d'or de taille inférieure à 10 nm et distribuées sur toute la matrice de polymères. Des particules d'or sont également présentes à l'extérieur des nanogels. Une explication possible est que les nanobâtonnets d'or, ayant une longueur et une largeur de 39,5 et 11,8 nm respectivement, se dégradent lors de la polymérisation de la coquille. En effet, pour pouvoir former la coquille autour des cœurs par copolymérisation radicalaire par précipitation des germes, il faut chauffer la dispersion des cœurs-AuNRs pendant 5 h à 70 °C ; et il est bien connu que la forme en bâtonnet des AuNRs est un état métastable et peut être transformée progressivement en sphère ou désintégrée par chauffage⁴⁵⁻⁵⁰. L'image HAADF-STEM et l'analyse de cartographie chimique EDS-STEM de la Figure 87c suggèrent une transformation presque totale des nanobâtonnets vers des sphères. Dans la littérature, cette transformation est attribuée à la désorption des ions Ag⁺ et des ligands Ag-Br-CTAB de la surface des nanoparticules d'or⁴⁵.

En conclusion, ces résultats mettent en évidence la possibilité de synthétiser de nouveaux nanogels hybrides magnéto-plasmoniques et de pouvoir faire varier la structure interne de ceux-ci, à partir de l'assemblage de nano-objets de même composition chimique (nanogels-OEGMAs, NPMs, AuNRs), en faisant seulement varier l'ordre d'ajout des nanoparticules inorganiques et la formation d'une coquille supplémentaire en polymère (Figure 87). Néanmoins, ces nanogels sont très peu stables en dispersion dans l'eau. De plus, la stabilité des MagPlasmNanoGels diminue lorsque la quantité de nanoparticules inorganiques incorporées dans la matrice de polymères augmente. Ceci est en accord avec la stabilité d'autres microgels hybrides décrits dans la littérature⁵¹⁻⁵⁴. Il serait intéressant dans une prochaine étude d'améliorer leur stabilité en dispersion pour pouvoir les utiliser pour des applications biomédicales (stabilisation électrostatique et/ou stérique)⁵⁵⁻⁵⁷.

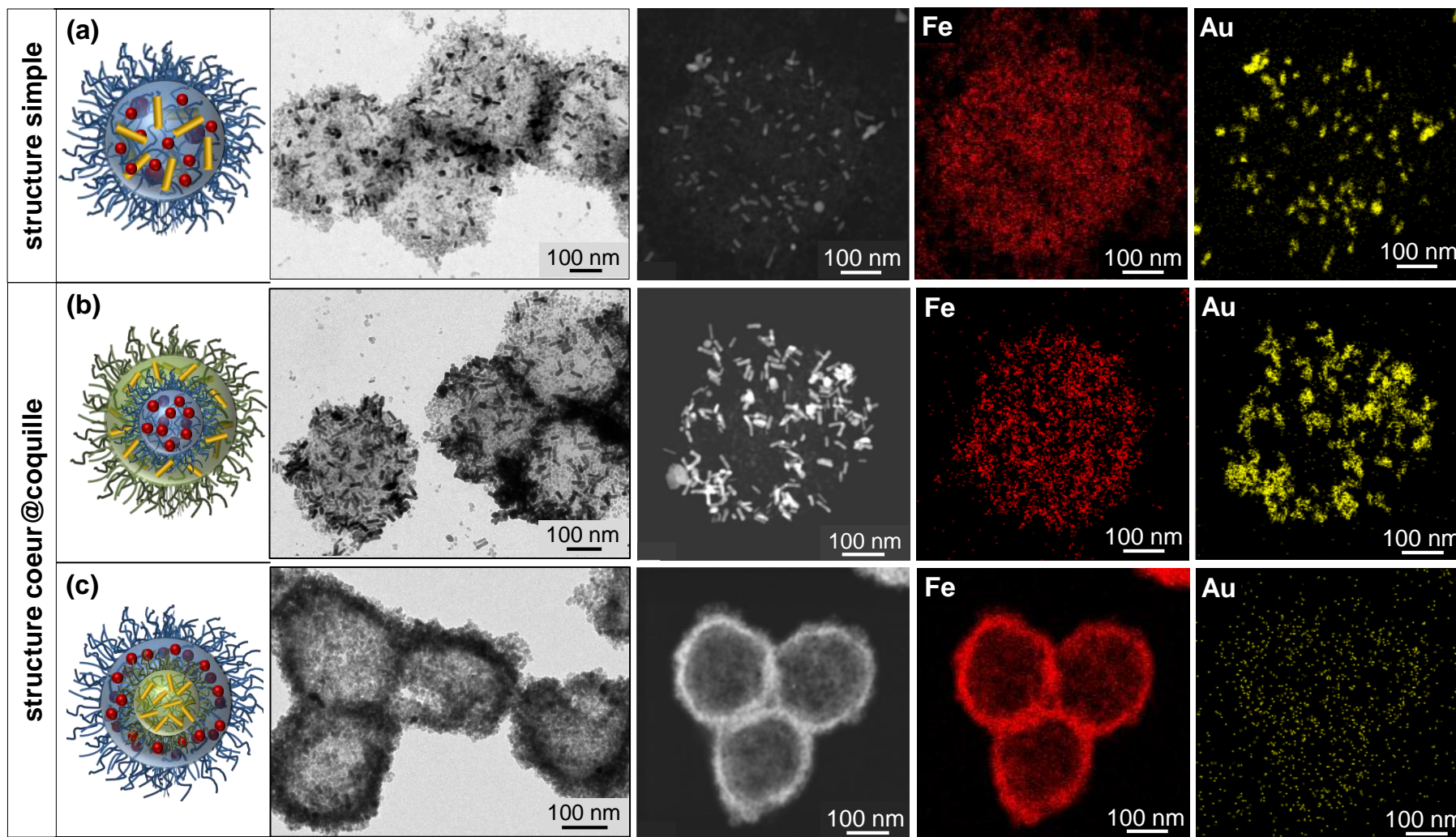


Figure 87. Nanogels magnéto-plasmoniques à (a) structure simple Fe_{26,9%}-Au_{3,1%} et (b) en cœur@coquille Fe_{37,9%}@Au_{62,2%} et (c) Au_{0,71%}@Fe_{3,9%}. De gauche à droite : illustration, clichés TEM, STEM-HAADF (blanc) et cartographie chimique EDS-STEM du fer (rouge) et de l'or (jaune).

4. Vers des nanogels pour la thérapie

Une thérapie prometteuse pour soigner le cancer est basée sur la capacité de certaines particules à générer de la chaleur sous un stimulus externe ; cette thérapie est connue sous le nom de thérapie. En effet, une élévation de température entre 45 et 48 °C permettrait de détruire les cellules tumorales. Actuellement, les nanoparticules d'oxyde de fer (NPMs), en présence d'un champ magnétique alternatif, et les nanoparticules d'or (AuNRs), en présence d'une irradiation laser-NIR, sont les principaux candidats pour le développement d'une telle thérapie⁷. Si la chaleur est générée par des NPMs et des AuNRs, on parle respectivement d'hyperthermie magnétique et de photothermie. Plusieurs travaux concernant l'élaboration de nanomatériaux hybrides, constitués à la fois de particules magnétiques et plasmoniques ont été récemment publiés. La plupart de ces études sur des nanosystèmes magnéto-plasmoniques utilisent les oxydes de fer en tant qu'agent de contraste pour l'IRM, pour le guidage et le ciblage magnétique ; et l'or pour ses propriétés optiques pour l'imagerie et le chauffage par photothermie⁵⁸⁻⁶⁴.

Récemment, des études ont démontré des synergies résultant de l'association de ces deux matériaux, tels que des nanofleurs d'oxyde de fer avec une coquille en or⁷ et des nanoparticules d'oxyde de fer enrobées d'une couche d'or $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ ⁶⁵. Cependant, à ce jour, des nano-objets hybrides magnéto-plasmoniques efficaces à la fois pour une thérapie bimodale (hyperthermie magnétique et photothermie) et un traitement thérapeutique pour la libération contrôlée de molécules sont rares. Ainsi, l'élaboration de nanosystèmes hybrides combinant efficacement ces deux thérapies demeure un défi majeur.

4.1.1 Propriétés magnétiques et optiques

Comme observé sur la Figure 88a, les PlasmMagNanoGels peuvent être attirés par un aimant permanent, malgré la faible quantité en NPMs. En réponse au champ magnétique, les MagNanoGels vont se déplacer et se concentrer sur la paroi du flacon près de l'aimant. Cette propriété a été utilisée pour la purification des nanogels lors de la synthèse. De plus, cette propriété pourrait également être employée pour le guidage magnétique des nanogels près de la tumeur cancéreuse à traiter.

Par ailleurs, les propriétés optiques des AuNRs sont préservées après leur incorporation dans les MagPlasmNanoGels à structure simple (avec LSPR = 739 et 538 nm respectivement pour la bande longitudinale et transversale), et en cœurNPMs@coquilleAuNRs, avec LSPR = 756 et 538 nm respectivement pour la bande longitudinale et transversale. Pour les nanogels cœurAuNRs@coquilleNPMs la bande LSPR-longitudinale est presque inexistante et la LSPR-transversale a été décalée vers le bleu à 517 nm (Figure 88b).

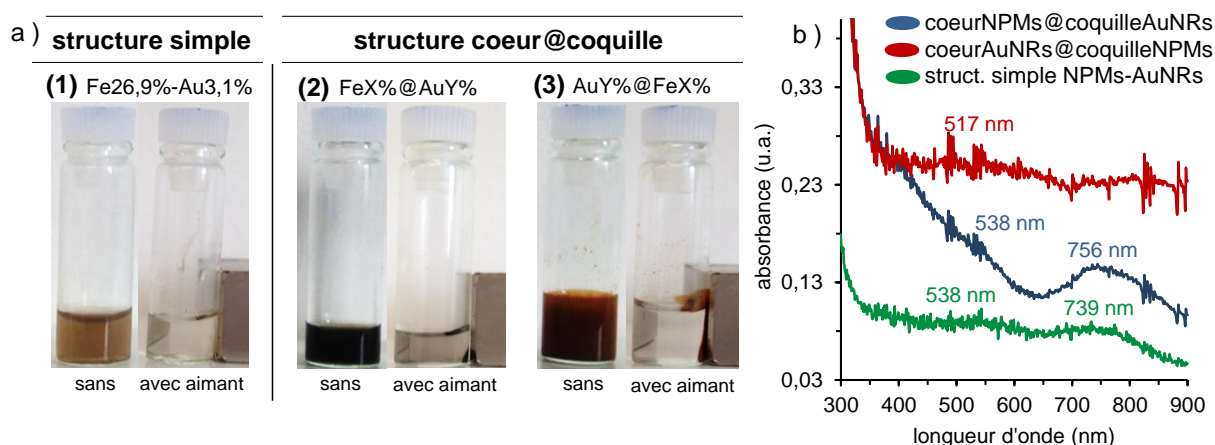


Figure 88. (a) Comportement magnétique des MagPlasmNanoGels à structure simple et en cœur@coquille en présence d'un aimant permanent (Nd-Fe-B, 1,22-1,26 T) pendant un jour. (b) Spectre d'absorption UV-IR des MagPlasmNanoGels.

4.1.2 Propriétés d'hyperthermie magnétique et photothermie

Protocole : Pour étudier les propriétés d'hyperthermie magnétique des nanogels magnéto-plasmoniques, 150 μ L d'une dispersion de MagPlasmNanoGels (à structure simple, cœurNPMs@coquilleAuNRs et cœurAuNRs@coquilleNPMs) sont placés dans un porte-échantillon en mousse à l'intérieur d'une bobine générant un champ magnétique alternatif (AMF). L'AMF est généré avec un système DM3 (NanoScale Biomagnetics), avec une fréquence de 471 kHz et une amplitude de 18 mT correspondant à $14,4 \text{ kA.m}^{-1}$, pendant 5 min. L'élévation de la température de l'échantillon est mesurée *in situ* et enregistrée avec une caméra infrarouge à imagerie thermique (FLIR SC700, FLIR Systems). Pour étudier les propriétés de photothermie, l'échantillon est placé dans le même porte-échantillon en mousse et irradié avec une lumière-NIR (NIR-L) à l'aide d'un laser 808 nm couplé avec une fibre optique (Laser Diode Driver System, BWT Beijing Ltd. ; DS3-11312-110-K808F15FA-6.000W ; AC 230 V ; 50 Hz). La distance entre l'échantillon et le laser est réglée à 3 cm (spot lumineux de 1 cm^2) et la puissance du laser est fixée à $0,3 \text{ W.cm}^{-2}$, pendant 5 min. L'évolution de la température est enregistrée en utilisant la même caméra IR. Enfin, pour étudier l'effet combiné d'hyperthermie magnétique et de photothermie, un AMF et une NIR-L sont appliqués simultanément et dans les mêmes conditions décrites précédemment (position par rapport à la bobine magnétique et au laser).

La Figure 89 montre les images thermiques des trois lots de dispersions de MagPlasmNanoGels à structure simple (a) et en cœur@coquille (b et c), avant et après application d'un stimulus (AMF, NIR-L, AMF+NIR-L) pendant 5 min. Pour tous les lots de nanogels, le même phénomène est observé : lors de l'application d'un AMF une très faible, voire presque inexistante, élévation de la température est constatée ($\Delta T \approx 1$ à $2,7$ °C), alors que sous l'irradiation d'une NIR-L, les MagPlasmNanoGels produisent une forte élévation de la température, dix fois supérieure à celle constatée sous AMF ($\Delta T \approx 10$ à 22 °C). Ces résultats montrent que les AuNRs sont des sources de chaleur plus performantes que les NPMs. En outre, lors de l'application simultanée d'un AMF et une NIR-L, un effet additif de l'accroissement de la température est constaté ($\Delta T \approx 11$ à 24 °C).

Nous avons souhaité préparer ces échantillons avec les mêmes concentrations en fer et en or. Néanmoins, la concentration finale est différente. Ceci est dû probablement à des pertes de nanoparticules inorganiques lors des étapes de purification. La chaleur produite par les échantillons dépend fortement de la concentration en fer et en or contenue dans les nanogels (Cf. Tableau 16). Par ailleurs, la chaleur produite par les différents lots de nanogels augmente lorsque la concentration en or augmente avec $\Delta T \approx 10$; 11 et 22 °C pour les nanogels Fe26,9%-Au3,1% (Figure 89a), Au0,71%@Fe3,9% (Figure 89c) et Fe37,9%@Au62,2% (Figure 89b). La structure avec les AuNRs dans la coquille chauffe mieux que la structure avec les AuNRs au cœur. Cependant, il faut rester prudent car la concentration en or de ces deux échantillons est différente.

Par ailleurs, précédemment, nous avons montré que la température générée par les AuNRs augmente avec la concentration en or. Ainsi, en comparant les nanogels à $[Au] \approx 5 \cdot 10^{-5}$ M (Figure 89a) avec ceux ayant une concentration dix fois supérieure (Figure 89c), on attendait une élévation de la température moindre pour les nanogels ayant la concentration en or la plus faible. Or, l'élévation de température sous irradiation NIR-L est presque la même pour ces deux échantillons ($\Delta T \approx 10$ °C). La diminution du pouvoir chauffant des AuNRs dans les nanogels en cœur-AuNRs@coquille-NPMs s'explique probablement par la transformation des nanobâtonnets d'or en sphère lors de la polymérisation de la coquille observée par EDS-STEM (Figure 87c). Pour ces trois échantillons l'effet additif n'est pas significatif, avec des ΔT de l'ordre de quelques °C si on compare les situations (AMF+NIR-L) ou NIR-L seul.

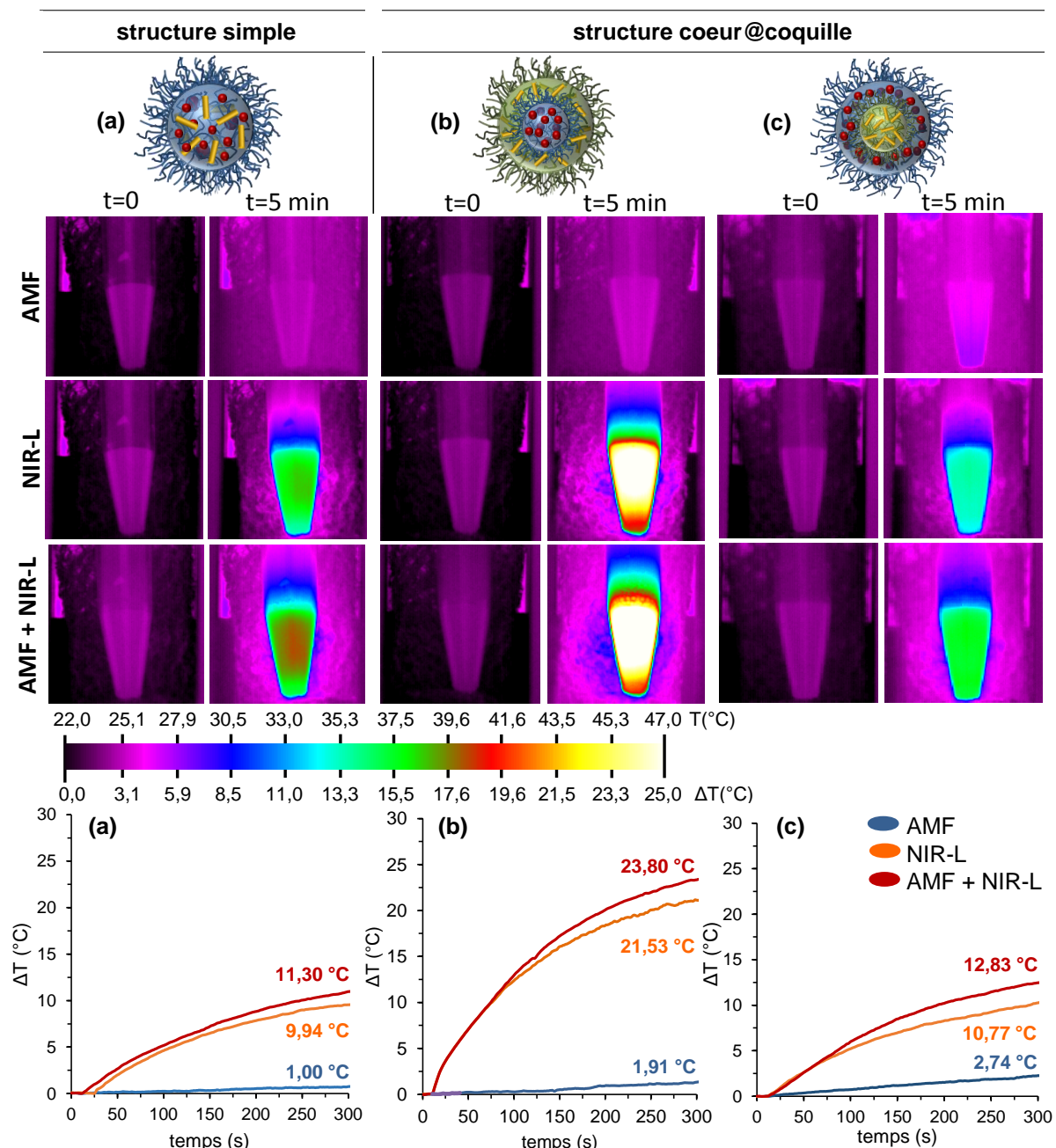


Figure 89. Pouvoir chauffant des MagPlasmNanoGels. Images thermiques des dispersions de nanogels (150 μ L) à (a) structure simple (Fe26,9%-Au3,1%), en (b) cœur-magnétique@coquille-plasmonique (Fe37,9%@Au62,2%) et en (c) cœur-plasmonique@coquille-magnétique (Au0,71%@Fe3,9%), enregistrées avec une caméra infrarouge, avant (t_0) et après 5 min sous un ou des stimuli : AMF (471 kHz ; 18 mT ; 14,4 kA.m⁻¹ ; 5 min), NIR-L (808 nm ; 0,3 w.cm⁻² ; 5 min) et (AMF+NIR-L). Évolution de la température des dispersions sous AMF, NIR-L et (AMF+NIR-L) en fonction du temps.

La Figure 90 permet de comparer la variation de la température des trois lots de MagPlasmNanoGels à morphologie différente et en fonction du stimulus appliqué. Les nanogels qui chauffent le plus sont les nanogels en cœur-NPMs@coquille-AuNRs. Ceci est dû probablement au fait que ces nanogels ont la concentration en or la plus élevée

([Au] = $2,21 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹). Pour l’instant, nous ne pouvons pas attribuer cette augmentation de température à la morphologie des nanogels. Cependant, cette structure nous permet d’introduire le plus grand nombre de NPMs et d’AuNRs au sein de la matrice de polymères ; et une plus forte concentration en [Fe] et [Au] les rend plus performantes.

Ces résultats sont encourageants et permettent d’envisager l’utilisation de ces nanosystèmes pour une nouvelle stratégie thérapeutique de thérapie combinée pour le traitement de cellules tumorales. Néanmoins, ces nanogels sont très peu stables. Ainsi, nous espérons que l’amélioration future de leur stabilité permettra de rendre encore plus performants ces systèmes en tant que sources de chaleur.

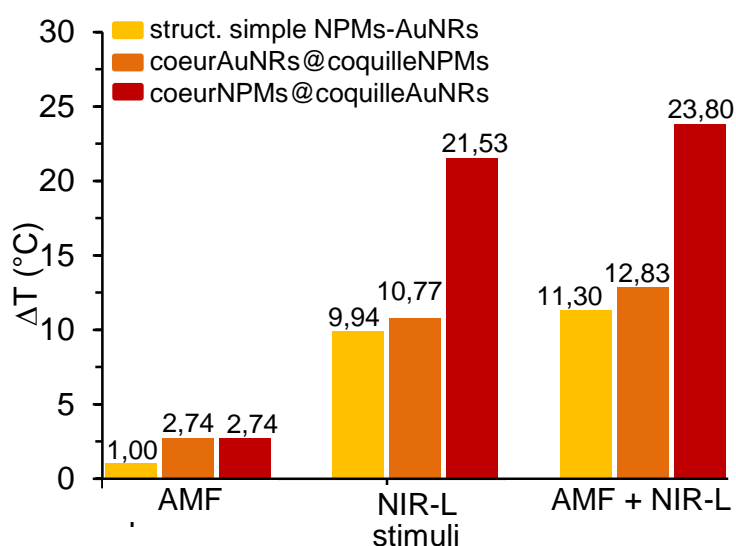


Figure 90. Variation moyenne de la température en fonction de trois stimuli appliqués : AMF (471 kHz ; 18 mT ; $14,4 \text{ kA.m}^{-1}$; 5 min), NIR-L (808 nm ; $0,3 \text{ W.cm}^{-2}$; 5 min) et AMF+NIR-L pour des MagPlasmNanoGels à structure simple (Fe26,9%-Au3,1%), en cœur-NPMs@coquille-AuNRs (Fe37,9%@Au62,2%) et en cœur-AuNRs@coquille-NPMs (Au0,71% @Fe3,9%).

Conclusions et Perspectives

Dans ce chapitre, nous avons synthétisé et caractérisé des nanobâtonnets d'or (AuNRs), des nanogels hybrides plasmoniques (PlasmMagNanoGels), contenant uniquement des AuNRs et de nanogels magnéto-plasmoniques (MagPlasmNanoGels), contenant à la fois des nanoparticules magnétiques (NPMs) et des AuNRs. Tous les nanogels sont constitués d'un réseau polymère thermosensible à base de (macro)-monomères biocompatibles dérivés d'oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs).

En ce qui concerne les PlasmNanoGels, nous avons démontré qu'après incorporation des AuNRs dans la matrice de polymères, les propriétés optiques (bandes plasmoniques longitudinales et transversales), ainsi que les propriétés de chauffage sous irradiation laser proche infrarouge (ou photothermie) inhérentes aux AuNRs sont préservées. La chaleur produite est proportionnelle à la concentration en or ($\Delta T = 0,91$; $5,6$ et $11,1$ °C pour $[Au] = 8,38.10^{-5}$; $4,19.10^{-4}$ et $8,4.10^{-4}$ mol.L⁻¹ respectivement), avec des valeurs de SAR très élevées (SAR = 1669 ; 2595 et 2923 W.g⁻¹). En outre, le caractère thermosensible inhérent à la matrice de polymères est conservé. De plus, ce comportement de gonflement–dégonflement est entièrement réversible et semble être indépendant de la quantité de AuNRs contenue dans les nanogels. La plage de la température de transition volumique des nanogels les moins chargés et les plus chargés en AuNRs sont respectivement $VPTT = 27,5 - 60$ °C et $40 - 60$ °C ; ainsi, l'intervalle de VPTT se déplace vers des plus hautes températures lorsque la charge en AuNRs augmente. Des cycles on/off d'irradiation laser-NIR suivis des mesures du d_h par DLS ont montré que la transition de phase des nanogels, induite sous irradiation laser est réversible et reproductible, indiquant que les AuNRs restent dans les nanogels pendant les cycles de chauffage. Ce stimulus externe peut être utilisé pour déclencher à distance ce phénomène. La diminution du volume des nanogels hybrides résulte du chauffage local des nanogels, suite à la conversion de l'énergie lumineuse en chaleur par les AuNRs. Les AuNRs contenus dans les nanogels se comportent en tant que sources de chaleur ponctuelles. Les PlasmNanoGels pourraient donc être utilisés en tant que RC-DDS pour la libération contrôlée de molécules par photothermie, mais également pour détruire des tumeurs cancéreuses par élévation de la température pour une thérapie photothermique.

En ce qui concerne les MagPlasmNanoGels, trois morphologies distinctes ont été synthétisés : des nanogels à structure simple contenant un mélange de NPMs et AuNRs dans la matrice de polymères (Fe26,9%*m*-Au3,1%*m*) ; des nanogels cœur-NPMs@coquille-AuNRs (Fe37,9%*m*@Au62,2%*m*) et des nanogels cœur-AuNRs@coquille-NPMs (Au0,71%*m*@Fe3,9%*m*). Ces nanogels sont multifonctionnels et possèdent à la fois les propriétés de thermosensibilité des polymères, les propriétés magnétiques et d'hyperthermie magnétique des NPMs, ainsi que les propriétés optiques et de photothermie des AuNRs. La transition de gonflement-dégonflement de ces nanogels peut être déclenchée à la fois sous un champ magnétique alternatif (AMF) et sous irradiation d'une lumière proche infrarouge (NIR-L). La stabilité de ces nanogels est inversement proportionnelle à la quantité de nanoparticules inorganiques incorporées dans la matrice de polymères ; ainsi, ces nanogels sont peu stables en dispersion et il faudrait améliorer leur stabilité colloïdale (stabilisation électrostatique ou stérique) pour pouvoir les utiliser dans des applications biomédicales. Par ailleurs, des études d'évolution de la température de ces nanogels en fonction de trois paramètres : AMF, NIR-L et (AMF+NIR-L), ont montré qu'il est possible de produire de la chaleur sous ces trois stimuli. En présence d'un AMF, l'augmentation de la température est faible (ΔT de 1 à 3°C) ; alors qu'en présence d'une NIR-L, une forte augmentation de la température est observée (ΔT de 10 à 22°C), montrant que les AuNRs sont de meilleurs sources de chaleur que les NPMs. Les nanogels cœur-magnétique@coquille-plasmonique sont les plus performants en termes de pouvoir chauffant, notamment car cette morphologie permet d'incorporer le plus grand nombre de NPMs et d'AuNRs au sein de la matrice de polymères.

Par ailleurs, les propriétés intrinsèques des NPMs contenues dans les nanogels, telles que la visualisation en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et le ciblage magnétique, ainsi que les propriétés de la matrice de polymères réticulés permettant d'encapsuler et libérer de grandes quantités de molécules, font des MagPlasmNanoGels des candidats idéaux pour une approche théranostique (diagnostic et traitement).

Références

- (1) Loo, C.; Lin, A.; Hirsch, L.; Lee, M.-H.; Barton, J.; Halas, N.; West, J.; Drezek, R. Nanoshell-Enabled Photonics-Based Imaging and Therapy of Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2004**, *3* (1), 33–40.
- (2) Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) Using Gold Nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* **2008**, *23* (3), 217.
- (3) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11* (0), 55–75.
- (4) Bardhan, R.; Lal, S.; Joshi, A.; Halas, N. J. Theranostic Nanoshells: From Probe Design to Imaging and Treatment of Cancer. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (10), 936–946.
- (5) Wang, X.; Li, G.; Ding, Y.; Sun, S. Understanding the Photothermal Effect of Gold Nanostars and Nanorods for Biomedical Applications. *RSC Adv.* **2014**, *4* (57), 30375–30383.
- (6) Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (48), 4880–4910.
- (7) Espinosa, A.; Bugnet, M.; Radtke, G.; Neveu, S.; Botton, G. A.; Wilhelm, C.; Abou-Hassan, A. Can Magneto-Plasmonic Nanohybrids Efficiently Combine Photothermia with Magnetic Hyperthermia? *Nanoscale* **2015**, *7* (45), 18872–18877.
- (8) Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (10), 1957–1962.
- (9) Scarabelli, L.; Sánchez-Iglesias, A.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6* (21), 4270–4279.
- (10) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.* **2001**, *13* (18), 1389–1393.
- (11) Edgar, J. A.; McDonagh, A. M.; Cortie, M. B. Formation of Gold Nanorods by a Stochastic “Popcorn” Mechanism. *ACS Nano* **2012**, *6* (2), 1116–1125.
- (12) Wang, Y.-N.; Wei, W.-T.; Yang, C.-W.; Huang, M. H. Seed-Mediated Growth of Ultralong Gold Nanorods and Nanowires with a Wide Range of Length Tunability. *Langmuir* **2013**, *29* (33), 10491–10497.
- (13) Orendorff, C. J.; Murphy, C. J. Quantitation of Metal Content in the Silver-Assisted Growth of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (9), 3990–3994.
- (14) Jackson, S. R.; McBride, J. R.; Rosenthal, S. J.; Wright, D. W. Where’s the Silver? Imaging Trace Silver Coverage on the Surface of Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (14), 5261–5263.
- (15) Grzelczak, M.; Sánchez-Iglesias, A.; Rodríguez-González, B.; Alvarez-Puebla, R.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M. Influence of Iodide Ions on the Growth of Gold Nanorods: Tuning Tip Curvature and Surface Plasmon Resonance. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18* (23), 3780–3786.
- (16) Giannici, F.; Placido, T.; Curri, M. L.; Striccoli, M.; Agostiano, A.; Comparelli, R. The Fate of Silver Ions in the Photochemical Synthesis of Gold Nanorods: An Extended X-Ray Absorption Fine Structure Analysis. *Dalton Trans.* **2009**, *0* (46), 10367–10374.
- (17) Hubert, F.; Testard, F.; Spalla, O. Cetyltrimethylammonium Bromide Silver Bromide Complex as the Capping Agent of Gold Nanorods. *Langmuir* **2008**, *24* (17), 9219–9222.

- (18) Su, G.; Yang, C.; Zhu, J.-J. Fabrication of Gold Nanorods with Tunable Longitudinal Surface Plasmon Resonance Peaks by Reductive Dopamine. *Langmuir* **2015**, *31* (2), 817–823.
- (19) Gao, J.; Bender, C. M.; Murphy, C. J. Dependence of the Gold Nanorod Aspect Ratio on the Nature of the Directing Surfactant in Aqueous Solution. *Langmuir* **2003**, *19* (21), 9065–9070.
- (20) Murphy, C. J.; Thompson, L. B.; Chernak, D. J.; Yang, J. A.; Sivapalan, S. T.; Boulos, S. P.; Huang, J.; Alkilany, A. M.; Sisco, P. N. Gold Nanorod Crystal Growth: From Seed-Mediated Synthesis to Nanoscale Sculpting. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16* (2), 128–134.
- (21) Gómez-Graña, S.; Hubert, F.; Testard, F.; Guerrero-Martínez, A.; Grillo, I.; Liz-Marzán, L. M.; Spalla, O. Surfactant (Bi)Layers on Gold Nanorods. *Langmuir* **2012**, *28* (2), 1453–1459.
- (22) Qian, H.; Zhu, Y.; Jin, R. Atomically Precise Gold Nanocrystal Molecules with Surface Plasmon Resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (3), 696–700.
- (23) Tong, L.; Lu, E.; Pichaandi, J.; Cao, P.; Nitz, M.; Winnik, M. A. Quantification of Surface Ligands on NaYF₄ Nanoparticles by Three Independent Analytical Techniques. *Chem. Mater.* **2015**, *27* (13), 4899–4910.
- (24) Burrows, N. D.; Lin, W.; Hinman, J. G.; Dennison, J. M.; Vartanian, A. M.; Abadeer, N. S.; Grzincic, E. M.; Jacob, L. M.; Li, J.; Murphy, C. J. Surface Chemistry of Gold Nanorods. *Langmuir* **2016**, *32* (39), 9905–9921.
- (25) Gole, A.; Murphy, C. J. Polyelectrolyte-Coated Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Immobilization. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (6), 1325–1330.
- (26) Soliman, M. G.; Pelaz, B.; Parak, W. J.; del Pino, P. Phase Transfer and Polymer Coating Methods toward Improving the Stability of Metallic Nanoparticles for Biological Applications. *Chem. Mater.* **2015**, *27* (3), 990–997.
- (27) Abadeer, N. S.; Brennan, M. R.; Wilson, W. L.; Murphy, C. J. Distance and Plasmon Wavelength Dependent Fluorescence of Molecules Bound to Silica-Coated Gold Nanorods. *ACS Nano* **2014**, *8* (8), 8392–8406.
- (28) Alkilany, A. M.; Yaseen, A. I. B.; Park, J.; Eller, J. R.; Murphy, C. J. Facile Phase Transfer of Gold Nanoparticles from Aqueous Solution to Organic Solvents with Thiolated Poly(Ethylene Glycol). *RSC Adv.* **2014**, *4* (95), 52676–52679.
- (29) Lista, M.; Liu, D. Z.; Mulvaney, P. Phase Transfer of Noble Metal Nanoparticles to Organic Solvents. *Langmuir* **2014**, *30* (8), 1932–1938.
- (30) Biju, V. Chemical Modifications and Bioconjugate Reactions of Nanomaterials for Sensing, Imaging, Drug Delivery and Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (3), 744–764.
- (31) Wijaya, A.; Hamad-Schifferli, K. Ligand Customization and DNA Functionalization of Gold Nanorods via Round-Trip Phase Transfer Ligand Exchange. *Langmuir* **2008**, *24* (18), 9966–9969.
- (32) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2740–2779.
- (33) S. Link; M. B. Mohamed, and; El-Sayed*, M. A. Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant
<http://pubs.acs.org.accesdistant.upmc.fr/doi/abs/10.1021/jp990183f> (accessed Oct 1, 2017).
- (34) Huang, X.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Photo-Thermal Therapy (PPTT). *Alex. J. Med.* **2011**, *47* (1), 1–9.
- (35) Svaasand, L. O.; Gomer, C. J.; Morinelli, E. On the Physical Rationale of Laser Induced Hyperthermia. *Lasers Med. Sci.* **1990**, *5* (2), 121–128.

- (36) Espinosa, A.; Silva, A. K. A.; Sánchez-Iglesias, A.; Grzelczak, M.; Péchoux, C.; Desboeufs, K.; Liz-Marzán, L. M.; Wilhelm, C. Cancer Cell Internalization of Gold Nanostars Impacts Their Photothermal Efficiency In Vitro and In Vivo: Toward a Plasmonic Thermal Fingerprint in Tumoral Environment. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5* (9), 1040–1048.
- (37) Freddi, S.; Sironi, L.; D’Antuono, R.; Morone, D.; Donà, A.; Cabrini, E.; D’Alfonso, L.; Collini, M.; Pallavicini, P.; Baldi, G.; Maggioni, D.; Chirico, G. A Molecular Thermometer for Nanoparticles for Optical Hyperthermia. *Nano Lett.* **2013**, *13* (5), 2004–2010.
- (38) Das, M.; Sanson, N.; Fava, D.; Kumacheva, E. Microgels Loaded with Gold Nanorods: Photothermally Triggered Volume Transitions under Physiological Conditions. *Langmuir* **2007**, *23* (1), 196–201.
- (39) Boullaras, M.; Gombart, E.; Tranchant, J.-F.; Billon, L.; Save, M. Design of Smart Oligo(Ethylene Glycol)-Based Biocompatible Hybrid Microgels Loaded with Magnetic Nanoparticles. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36* (1), 79–83.
- (40) Cazares-Cortes, E.; Espinosa, A.; Guigner, J.-M.; Michel, A.; Griffete, N.; Wilhelm, C.; Ménager, C. Doxorubicin Intracellular Remote Release from Biocompatible Oligo(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylate-Based Magnetic Nanogels Triggered by Magnetic Hyperthermia. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (31), 25775–25788.
- (41) Suzuki, D.; Kawaguchi, H. Modification of Gold Nanoparticle Composite Nanostructures Using Thermosensitive Core–Shell Particles as a Template. *Langmuir* **2005**, *21* (18), 8175–8179.
- (42) Chi, C.; Cai, T.; Hu, Z. Oligo(Ethylene Glycol)-Based Thermoresponsive Core–Shell Microgels. *Langmuir* **2009**, *25* (6), 3814–3819.
- (43) Riedinger, A.; Pernia Leal, M.; Deka, S. R.; George, C.; Franchini, I. R.; Falqui, A.; Cingolani, R.; Pellegrino, T. “Nanohybrids” Based on PH-Responsive Hydrogels and Inorganic Nanoparticles for Drug Delivery and Sensor Applications. *Nano Lett.* **2011**, *11* (8), 3136–3141.
- (44) Ghosh Chaudhuri, R.; Paria, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (4), 2373–2433.
- (45) Ng, K. C.; Cheng, W. Fine-Tuning Longitudinal Plasmon Resonances of Nanorods by Thermal Reshaping in Aqueous Media. *Nanotechnology* **2012**, *23* (10), 105602.
- (46) Opletal, G.; Grochola, G.; Chui, Y. H.; Snook, I. K.; Russo, S. P. Stability and Transformations of Heated Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (11), 4375–4380.
- (47) Attia, Y. A.; Altalhi, T. A.; Gobouri, A. A. Thermal Stability and Hot Carrier Dynamics of Gold Nanoparticles of Different Shapes. *Adv. Nanoparticles* **2015**, *04* (04), 85.
- (48) Link, S.; Burda, C.; Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. Laser-Induced Shape Changes of Colloidal Gold Nanorods Using Femtosecond and Nanosecond Laser Pulses. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (26), 6152–6163.
- (49) Stuart, B. C. Nanosecond-to-Femtosecond Laser-Induced Breakdown in Dielectrics. *Phys. Rev. B* **1996**, *53* (4), 1749–1761.
- (50) von der Linde, D.; Sokolowski-Tinten, K.; Bialkowski, J. Laser–solid Interaction in the Femtosecond Time Regime. *Appl. Surf. Sci.* **1997**, *109* (Supplement C), 1–10.
- (51) Pich, A.; Bhattacharya, S.; Lu, Y.; Boyko, V.; Adler, H.-J. P. Temperature-Sensitive Hybrid Microgels with Magnetic Properties. *Langmuir* **2004**, *20* (24), 10706–10711.
- (52) Bhattacharya, S.; Eckert, F.; Boyko, V.; Pich, A. Temperature-, PH-, and Magnetic-Field-Sensitive Hybrid Microgels. *Small* **2007**, *3* (4), 650–657.
- (53) Rubio-Retama, J.; Zafeiropoulos, N. E.; Serafinelli, C.; Rojas-Reyna, R.; Voit, B.; Lopez Cabarcos, E.; Stamm, M. Synthesis and Characterization of Thermosensitive PNIPAM

- Microgels Covered with Superparamagnetic γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. *Langmuir* **2007**, 23 (20), 10280–10285.
- (54) Pich, A.; Hain, J.; Lu, Y.; Boyko, V.; Prots, Y.; Adler, H.-J. Hybrid Microgels with ZnS Inclusions. *Macromolecules* **2005**, 38 (15), 6610–6619.
- (55) Cheraghipour, E.; Tamaddon, A. M.; Javadpour, S.; Bruce, I. J. PEG Conjugated Citrate-Capped Magnetite Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **2013**, 328, 91–95.
- (56) Hu, L.; Hach, D.; Chaumont, D.; Brachais, C.-H.; Couvercelle, J.-P. One Step Grafting of Monomethoxy Poly(Ethylene Glycol) during Synthesis of Maghemite Nanoparticles in Aqueous Medium. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, 330 (1), 1–7.
- (57) Sun, J.; Zhou, S.; Hou, P.; Yang, Y.; Weng, J.; Li, X.; Li, M. Synthesis and Characterization of Biocompatible Fe₃O₄ Nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, 80A (2), 333–341.
- (58) Larson, T. A.; Bankson, J.; Aaron, J.; Sokolov, K. Hybrid Plasmonic Magnetic Nanoparticles as Molecular Specific Agents for MRI/Optical Imaging and Photothermal Therapy of Cancer Cells. *Nanotechnology* **2007**, 18 (32), 325101.
- (59) Wu, C.-H.; Cook, J.; Emelianov, S.; Sokolov, K. Multimodal Magneto-Plasmonic Nanoclusters for Biomedical Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 24 (43), 6862–6871.
- (60) Urries, I.; Muñoz, C.; Gomez, L.; Marquina, C.; Sebastian, V.; Arruebo, M.; Santamaria, J. Magneto-Plasmonic Nanoparticles as Theranostic Platforms for Magnetic Resonance Imaging, Drug Delivery and NIR Hyperthermia Applications. *Nanoscale* **2014**, 6 (15), 9230–9240.
- (61) Coughlin, A. J.; Ananta, J. S.; Deng, N.; Larina, I. V.; Decuzzi, P.; West, J. L. Gadolinium-Conjugated Gold Nanoshells for Multimodal Diagnostic Imaging and Photothermal Cancer Therapy. *Small* **2014**, 10 (3), 556–565.
- (62) Sotiriou, G. A.; Starsich, F.; Dasargyri, A.; Wurnig, M. C.; Krumeich, F.; Boss, A.; Leroux, J.-C.; Pratsinis, S. E. Photothermal Killing of Cancer Cells by the Controlled Plasmonic Coupling of Silica-Coated Au/Fe₂O₃ Nanoaggregates. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 24 (19), 2818–2827.
- (63) Fan, Z.; Shelton, M.; Singh, A. K.; Senapati, D.; Khan, S. A.; Ray, P. C. Multifunctional Plasmonic Shell–Magnetic Core Nanoparticles for Targeted Diagnostics, Isolation, and Photothermal Destruction of Tumor Cells. *ACS Nano* **2012**, 6 (2), 1065–1073.
- (64) Masoumi, M.; Wang, Y.; Liu, M.; Tewolde, M.; Longtin, J. Multifunctional Magneto-Plasmonic Nanotransducers for Advanced Theranostics: Synthesis, Modeling and Experiment; International Society for Optics and Photonics, 2015; Vol. 9431, p 94311X.
- (65) Mohammad, F.; Balaji, G.; Weber, A.; Uppu, R. M.; Kumar, C. S. S. R. Influence of Gold Nanoshell on Hyperthermia of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114 (45), 19194–19201.

Conclusion générale et Perspectives

Le développement de nanosystèmes à libération contrôlée de molécules à distance (RC-DDS) et de chauffage pour des thérapies thermiques, est un domaine de recherche en plein essor qui pourrait améliorer les traitements de patients atteints de cancer, en diminuant notamment les effets secondaires des traitements classiques de chimiothérapie et radiothérapie. Dans ce cadre, nous avons synthétisé et caractérisé de nouveaux nanogels biocompatibles, pH- et thermosensibles, à base de monomères en oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs), d'acide méthacrylique (MAA). Ces nanogels encapsulant des nanoparticules d'oxyde de fer et/ou des nanobâtonnets d'or peuvent déclencher de manière contrôlée, par hyperthermie magnétique ou par photothermie, la libération d'une molécule anticancéreuse, la doxorubicine (DOX) ou être utilisés en thermo thérapie.

Les nanogels hybrides ont été synthétisés par copolymérisation radicalaire par précipitation dans l'eau ; les nanoparticules ont été ajoutées post-synthèse et liées à la matrice polymère par des groupements carboxyliques pour les NPMs ou par des groupements thiols pour les AuNRs. Deux morphologies ont été développées pour la synthèse des nanogels magnétiques (MagNanoGels), plasmoniques (PlasmNanoGels) et magnéto-plasmoniques (MagPlasmNanoGels) : (1) des nanogels avec une structure simple et chargés en NPs ; (2) des nanogels cœur@coquille contenant les NPMs dans le cœur et les AuNRs dans la coquille, et vice-versa. Ces nanogels ont un diamètre hydrodynamique entre 200 et 500 nm et une température de transition de phase volumique (VPTT) comprise entre 30 et 54 °C. L'étude des propriétés physico-chimiques des nanogels montre l'importance des groupements carboxyliques et des thiols pour encapsuler efficacement les nanoparticules dans les nanogels, tout en préservant leur stabilité colloïdale et les propriétés thermosensibles des polymères. En outre, cette étude souligne que le comportement de gonflement-dégonflement peut être induit par plusieurs stimuli: élévation de la température, diminution du pH, application d'un champ magnétique alternatif (AMF) et d'une lumière proche infrarouge (PTT). En ce qui concerne les MagNanoGels, une étude de la libération de DOX révèle qu'elle peut être déclenchée par divers stimuli. En solution, le relargage de DOX ($[Fe] = 8\text{mM}$; efficacité d'encapsulation : 62%, $72 \mu\text{mol.L}^{-1}$) est renforcé en augmentant la température du milieu (bain d'eau) et en diminuant le pH du milieu. En outre, le relargage de DOX est significativement amélioré par application d'un AMF (335 kHz; 17 mT) en conditions athermiques. Une étude *in vitro* sur

des cellules cancéreuses humaines PC-3 a confirmé que les nanogels encapsulant la DOX possèdent une meilleure internalisation cellulaire que la DOX libre, et nous avons prouvé qu'il est possible de déclencher à distance la libération intracellulaire de DOX en appliquant un AMF, augmentant ainsi la cytotoxicité de la DOX (la viabilité des cellules cancéreuses diminue de 74 à 56% sous AMF). Ces résultats démontrent que les MagNanoGels sont d'excellents nanovecteurs pour accroître l'internalisation cellulaire et la libération de molécules actives sous AMF dans des conditions athermiques.

En ce qui concerne les MagPlasmNanoGels, une étude de l'évolution de la température sous AMF, PTT ou sous (AMF+PTT) a montré que la chaleur générée sous AMF est très faible ($\Delta T_{\max} = 1$ à 3 °C en 5 min) alors qu'elle est très élevée sous PTT ($\Delta T_{\max} = 10$ à 21 °C en 5 min). Par ailleurs, des structures cœur@coquille originales ont été synthétisées et permettront par la suite d'envisager les MagPlasmNanoGels comme des nanovecteurs théranostiques. En effet, les NPMs pourront servir à localiser les nanogels en IRM et les AuNRs à traiter la tumeur par thérapie, faisant de ces nanogels des candidats idéaux pour une nouvelle approche théranostique (diagnostique et traitement).

ANNEXES

Annexe 1.	Techniques de caractérisation et appareils	216
Annexe 2.	Schéma du montage pour la synthèse de nanogels	223
Annexe 3.	Estimation du nombre de nanoparticules inorganiques à l'intérieur des nanogels hybrides	224
Annexe 4.	Structure cristallographique des AuNRs	225
Annexe 5.	Quantification de l'eau adsorbée à la surface des NPMs par ATG.....	226
Annexe 6.	Article : Cazares-Cortes E. <i>et al.</i> ACS Appl. Mater. Interfaces 2017.....	216

Annexe 1. Techniques de caractérisation et appareils

Diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*) : le diamètre hydrodynamique (d_h), l'indice de polydispersité (PDI) et le potentiel zêta (ζ) des nanoparticules inorganiques (NPMs, AuNRs) et des nanogels ont été mesurés avec un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) à 25 ° C avec un angle de 173 °. Les mesures ont été répétées trois fois. Pour les mesures de d_h effectuées à différentes températures, le changement de la viscosité de l'eau avec la température a été pris en compte. Les échantillons ont été équilibrés pendant 10 min à chaque température avant l'analyse. Les courbes diamètre-température ont été réalisées par chauffage (de 10 à 60 °C) et par refroidissement (de 60 à 10 °C), en mesurant le d_h tous les 2,5 °C. Chaque cycle a été effectué deux fois. Le d_h de nanogels hybrides (magnétiques, plasmoniques ou magnéto-plasmoniques) ont été mesurés avant et après l'application d'un stimuli (champ magnétique alternatif AMF ; irradiation proche infrarouge NIR-L) ont également été mesurés. Tous les calculs (d_h , PDI et ζ) ont été effectués en utilisant le logiciel Zetasizer.

Analyse du suivi individuel de particules (NTA, *Nanoparticle Tracking Analysis*) : La taille des nanogels en dispersion a également été mesurée avec un Nanosight LM10 (Malvern Instrument). Le principe de fonctionnement du Nanosight LM10 (Malvern Instrument) repose sur la technologie d'analyse du suivi individuel de particules. Cette technique combine les propriétés de diffusion de la lumière et du mouvement brownien des particules. Un faisceau laser (405 nm) traverse la chambre d'échantillon et les particules en suspension présentes sur la trajectoire de ce faisceau diffusent la lumière de telle sorte qu'elles peuvent être facilement visualisées avec un microscope (grossissement x20), équipé d'une caméra CCD. La caméra fonctionne à une fréquence de 30 images par seconde, et enregistre un fichier vidéo des particules soumises au mouvement brownien. Le logiciel (Nanosight NTA 3.1) repère les particules individuellement et en calcule le d_h , ainsi que la concentration en nombre des nanogels par mL à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein. Les résultats sont présentés par tranches, dites « déciles ». D10, D50 et D90, correspondent respectivement au d_h de 10, 50 et 90% des nanogels présents dans la dispersion. Cette technique permet aussi de calculer la concentration en nombre des particules dans la dispersion. La Figure 91 montre les différentes étapes de l'analyse. On observe une capture d'image de la vidéo du mouvement brownien des nanogels PEG-co-MAA (dilution x10 000) en suspension dans l'eau et diffusant

la lumière du faisceau laser (image de gauche). Sur l'image, chaque nanogel correspond à un point blanc entouré de plusieurs cercles blancs concentriques.

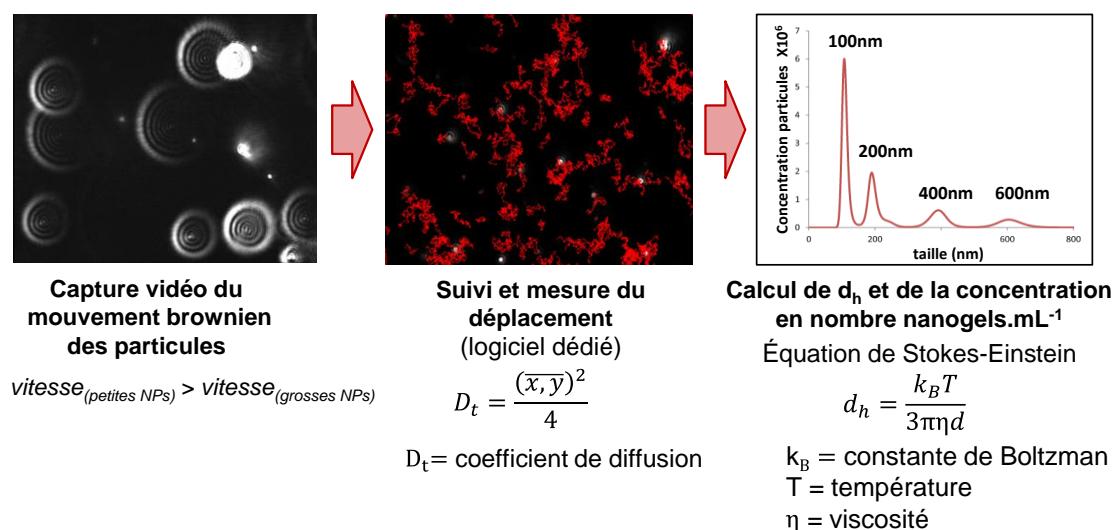


Figure 91. Protocole pour l'analyse du suivi individuel de particules (NTA) permettant la visualisation des nanogels, la mesure de leur distribution de taille, ainsi que le calcul de la concentration (en nombre nanogels.mL⁻¹).

Microscopie électronique en transmission (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) : les paramètres de distribution de taille (diamètre d , polydispersité σ) des nanoparticules inorganiques et des nanogels et des MagNanoGels ont également été caractérisés en utilisant un TEM de Jeol-100. Une gouttelette de dispersion aqueuse de nanogels dilués a été déposée sur une grille de cuivre revêtue de carbone et séchée à température ambiante pendant au moins 5 heures avant les observations TEM. Des analyses de distribution de taille ont été effectuées sur des images TEM en utilisant le logiciel ImageJ et ajustées aux lois log-normales (l'erreur standard est basée sur $n = 100$ particules).

Microscopie électronique en transmission cryogénique (Cryo-TEM) : Des images en cryo-TEM ont été prises avec un appareil LaB6 JEOL JEM 2100 (JEOL, Japon) fonctionnant à 200 kV avec un système à faible dose (*Minimum Dose System*, MDS). Les échantillons ont été maintenus à la température désirée (25 et 50 °C) pendant une heure. Ensuite, ils ont été étalés sur une grille quantifiée à trous et carbone (Micro Tools GmbH, Allemagne) et rapidement congelés en plongeant la grille dans de l'éthane liquide. Les images ont été enregistrées avec une caméra CCD Ultrascan 2k (Gatan, USA). Des analyses de distribution de taille ont été effectuées sur des images TEM et cryo-TEM en utilisant le logiciel ImageJ et ajustées aux lois log-normales (l'erreur standard est basée sur $n = 100$ particules). La cryo-TEM est une technique particulière de préparation d'échantillons utilisée

en TEM, elle consiste à congeler très rapidement les échantillons sous forme hydratés dans de l'éthane liquide, de manière à les figer dans leur état natif dans une glace. De la même façon que pour les images en TEM, l'analyse de la distribution en tailles des nanogels été effectuée sur des images TEM et cryo-TEM à l'aide du logiciel ImageJ et adaptées aux lois log-normales (les erreurs standard sont basées sur $n = 100$ particules).

Microscopie électronique à transmission à balayage en champ noir annulaire à grand angle (HAADF-STEM, high-angle anular dark-field imaging-scanning transmission electron microscopy) : Des images des nanogels hybrides magnéto-plasmoniques ont été prises avec un microscope JEOL 2100Plus, pointe LaB6, 200kV. Les images sont analysés avec le logiciel Aztec.

Analyse de spectroscopie aux rayons X à dispersion d'énergie couplé au STEM (EDX-STEM, Chemical mapping using energy dispersive X-ray spectrometry-STEM) : Les analyses de cartographie chimique des éléments fer et or contenus dans les nanogels hybrides magnéto-plasmoniques ont été effectuées avec un appareil EDX-STEM Oxford. Les images sont analysées avec le logiciel Aztec.

Microscopie confocale de fluorescence : L'internalisation de nanogels fluorescents, liés de manière covalente à la rhodamine B et encapsulant de la DOX, ainsi que l'internalisation de la DOX libre à l'intérieur de cellules cancéreuses a été analysée par microscopie confocale. Les cellules ont été observées avec un microscope à disque rotatif à dispositif Olympus JX81 / BX61 / appareil Yokogawa CSU (Andor Technology plc, Belfast, Irlande du Nord), équipé d'un objectif d'huile Plan-Apo x60. La rhodamine B a été excitée avec un laser à 561 nm et l'émission de fluorescence a été recueillie dans le canal rouge à 604 nm. La DOX a été excitée avec un laser à 488 nm et l'émission de fluorescence a été recueillie dans le canal vert à 561 nm. Pour quantifier la quantité de DOX dans les noyaux des cellules, une mesure du noyau cellulaire a été réalisée en dessinant des zones circulaires incluses dans la forme du noyau et en mesurant l'intensité de fluorescence moyenne dans ($n > 10$ cellules). L'intensité de la fluorescence est corrélée avec la quantité de DOX internalisée dans les noyaux. La libération de DOX intracellulaire sous l'application d'un AMF a également été surveillée par microscopie confocale.

Analyse gravimétrique et thermogravimétrique (TGA, ThermoGravimetric Analysis) : La masse de nanogels par unité de volume de solution (en mg.mL^{-1}) a été évaluée

par mesure gravimétrique : 1 mL de solution de nanogels a été placé dans un four à 70 °C jusqu'à évaporation de toute l'eau et pesée ultérieure du solide. De plus, la quantité de nanoparticules inorganiques (NMPs, AuNRs) encapsulée dans des nanogels a été déterminé par analyse thermogravimétrique à l'aide d'un appareil TGA SDT Q600, TA Instruments, en utilisant un creuset en aluminium. Les échantillons ont été analysés sous azote avec un débit de 100 ml N_{2(g)}.min⁻¹ et à une vitesse de chauffage de 10 °Cmin⁻¹ à partir de la température ambiante de 25 à 800 °C. Les valeurs théoriques des MNP introduites ont été comparées à la fraction expérimentale mesurée par analyse thermogravimétrique (TGA).

Calorimétrie différentielle à balayage (DSC, Differential Scanning Calorimetry) :

Les transitions thermiques des chaînes de polymère non réticulées ont été mesurées avec un appareil DSC Q20 (TA Instruments), étalonné préalablement avec de l'indium (T_f = 156 °C) et du zinc (T_f = 420 °C). La variation de masse mesurée traduit le changement du flux de chaleur entre un creuset de référence vide et un creuset contenant une masse d'échantillon. Pour cela, l'échantillon, préalablement séché à l'étuve à 70 °C pendant 24 h, est placé dans une capsule en aluminium, puis dans la cellule de mesure en platine. Un cycle « chauffage-refroidissement-chauffage » est effectué, avec une rampe de température de 20 à 200 °C, à une vitesse de 20 °C.min⁻¹ et sous atmosphère inerte (N₂ (g)). Le logiciel TA Universal Analysis permet de traiter les courbes de DSC et de déterminer la température de transition vitreuse (T_g), de cristallisation (T_c, processus exothermique) et de fusion (T_f, processus endothermique). La température est contrôlée tout le long des mesures dans les deux cellules.

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC, Size Exclusion Chromatography) :

Les masses molaires moyenne en nombre (\bar{M}_n), en poids (\bar{M}_w), le degré de polymérisation (\overline{DP}_n) et l'indice de polymolécularité (I_p) des polymères P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀-co-MAA) linéaire (non réticulé) constituant la réseau 3D réticulé des nanogels ont été mesurés avec un appareil 1260 Infinity (Agilent Technologies), équipée d'un réfractomètre différentiel Shodex RI-101 et un détecteur UV-Visible. Le solvant utilisé est élaboré à partir de 250 mL de THF et 25 gouttes de toluène. Avant d'être injectés dans l'appareil, tous les échantillons sont filtrés avec un filtre 0,45 µm possédant une membrane en polytetrafluoroéthylène (PTFE, Acrodisc CR 13 mm).

Analyse conductimétrique et potentiométrique : La concentration molaire en –COOH par nanogel, le degré d'ionisation (α) et leur constante d'acidité (pK_a) des fonctions -

COOH ont été calculés par analyse conductimétrique et potentiométrique comme décrit par T. Hoare et R. Pelton¹. Brièvement, une solution fraîchement préparée d'hydroxyde de sodium ([NaOH] = 6 mM) a été utilisée pour titrer les groupes -COOH contenus dans 10 ml de solution de NanoGels ([nanogel] = 1,0.10⁻³ g.mL⁻¹). Afin de protoner tous les groupes acides carboxyliques, la solution de pH de nanogels a été ajustée au-dessous de 2,5 en ajoutant quelques gouttes d'une solution de HCl à 0,1 M. La concentration molaire de -COOH par nanogels (en mmol COOH.g⁻¹ nanogels), et les pKa ont été calculés comme suit:

$$[COOH] = \frac{[NaOH]_{titrant} \times (V_{eq2} - V_{eq1})}{m_{nanogels}} \quad \text{Eq. 30}$$

$$\alpha_{(25^\circ C)} = \frac{[COO^- Na^+]}{[COO^- Na^+] + [COOH]} = \frac{V_{NaOH} - V_{eq1}}{V_{eq2} - V_{eq1}} \quad \text{Eq. 31}$$

$$pKa = pH - \log\left(\frac{\alpha_{(25^\circ C)}}{1 - \alpha_{(25^\circ C)}}\right) = pK_0 + \frac{1}{\ln(10)} \cdot \frac{dG_{el}}{RTd\alpha} \quad \text{Eq. 32}$$

V_{eq1} et V_{eq2} sont les volumes de NaOH ajoutés pour neutraliser respectivement l'excès de HCl et les groupes -COOH. V_{NaOH} est le volume ajouté pour un pH donné. pK₀ est la constante de dissociation intrinsèque indépendante d' α , R est la constante de gaz parfait, T est la température absolue et G_{el} est le terme d'énergie électrostatique de Gibbs. Le pK₀ peut être estimé en extrapolant la courbe α par rapport au pH à $\alpha = 0$ ².

Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR, *Fourier Transform Infra-Red*) : La composition chimique des nanogels a été vérifiée par spectroscopie FT-IR avec un spectromètre Bruker Tensor 27 et des pastilles en KBr. Les spectres IR sont obtenus à des intervalles de temps réguliers dans la région MIR (*Mid-InfraRed*) de 4000 à 400 cm⁻¹, avec une résolution de 4 cm⁻¹ et analysés à l'aide du logiciel OPUS.

Magnétomètre à échantillons vibrants (VSM, *Vibrating-sample magnetometer*) : Les propriétés magnétiques des NPMs et des nanogels magnétiques ont été mesurées à l'aide d'un VSM. La mesure est effectuée avec une solution aqueuse diluée de l'échantillon (fraction volumique de nanoparticules < 2%). La courbe de magnétisation M (H) d'une suspension de nanoparticules d'oxyde de fer monodispersées peut être décrite par une loi de Langevin³. En supposant une distribution log-normale P(d) et en adaptant la théorie à la courbe

d'aimantation expérimentale, nous pouvons calculer le diamètre magnétique (d_0) et l'indice de polydispersité (σ) des solutions MNP.

Dispositif d'interférence quantique supraconductrice (SQUID, *Superconducting Quantum Interference Device*): les propriétés magnétiques des MNP et MagNanoGels ont été étudiées à l'aide d'un magnétomètre SQUID. Cet appareil permet de mesurer des champs magnétiques très faibles. Les échantillons ont été analysés à 298 K en augmentant le champ magnétique de zéro à 50 kOe; en le diminuant à -50 kOe et en l'augmentant finalement à zéro. De même, il est possible d'effectuer des mesures de champ en fonction de la température sur une large gamme (jusqu'à quelques kelvins).

Mesures d'hyperthermie magnétique : Le pouvoir chauffant des nanosystèmes (SAR) et la cinétique de libération des molécules encapsulées dans les nanogels ont été réalisés avec un système MagneTherm™ (Nanotherics, UK) équipé d'un thermomètre à fibre fluoroptique. L'échantillon est chauffé à 23 ou à 37 °C, puis un champ magnétique alternatif est appliqué (335 kHz, 9 mT, 12,0 kA.m⁻¹, 30 min). Pour les études à plus haute fréquence et plus haut champ magnétique (470 kHz, 18 mT) et pour des études cellulaires, un deuxième dispositif permettant de générer un champ magnétique alternatif est utilisé (NanoScale Biomagnetics).

Diffraction des rayons X de poudre (PXRD, *Powder X-Ray Diffraction*): La structure cristalline des NPMs d'oxyde de fer de type maghémite, ainsi que celle des AuNRs en or métallique sont évaluées avec un diffractomètre Rigaku Ultima IV. Pour cela, l'échantillon est lyophilisé pendant une nuit. Puis, il est broyé et déposé sur un support en verre. Le diffractogramme en poudre des rayons X est mesuré de 10 à 80 ° (pour 2θ), à une vitesse 0,05 °C.min⁻¹, à 298 K et avec une radiation CuK α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$).

Spectrophotométrie UV-visible : L'encapsulation et la libération de doxorubicine (DOX) sont quantifiées avec un spectrophotomètre Avantes UV-visible (fibre optique de 100 μm et une lampe deutérium-halogène) avec des longueurs d'onde de 200 à 800 nm. Deux courbes d'étalonnage de DOX ont été réalisées à partir de l'absorbance UV à $\lambda_{\text{max}} = 485 \text{ nm}$ dans deux solutions tampons différentes: pH 7,5 (Hepes 0,1 M) et pH 5,0 (acide citrique 0,05 M, phosphate de sodium 0,1 M).

Réfractomètre optique : L'indice de réfraction des dispersions de nanogels en fonction de la température, est mesuré de 15 à 60 °C et mesure de 5 °C, avec une longueur d'onde de mesure de 656 nm, avec un Réfractomètre optique ARAGOTM (Cordouan Technologies). Seulement 100 µL d'une dispersion de nanogels sont nécessaires pour effectuer cette mesure. Ce volume est délesté dans la cellule d'analyse, en évitant la formation de bulles d'air, puis la cellule est fermée et la température est réglée. Lorsque la cellule a atteint la température demandée, la mesure de l'indice de réfraction est effectuée. Cet appareil permet de mesurer l'indice de réfraction des solutions opaques sans avoir besoin de diluer l'échantillon. De même, il est possible de mesurer l'indice de réfraction en fonction de la température avec une précision de $\pm 0,1$ °C. Les données sont traitées directement avec le logiciel ARISSETM v 2.1.

Annexe 2. Schéma du montage pour la synthèse de nanogels

Les nanogels ont été synthétisés par polymérisation radicalaire par précipitation en milieu aqueux en utilisant le montage suivant :

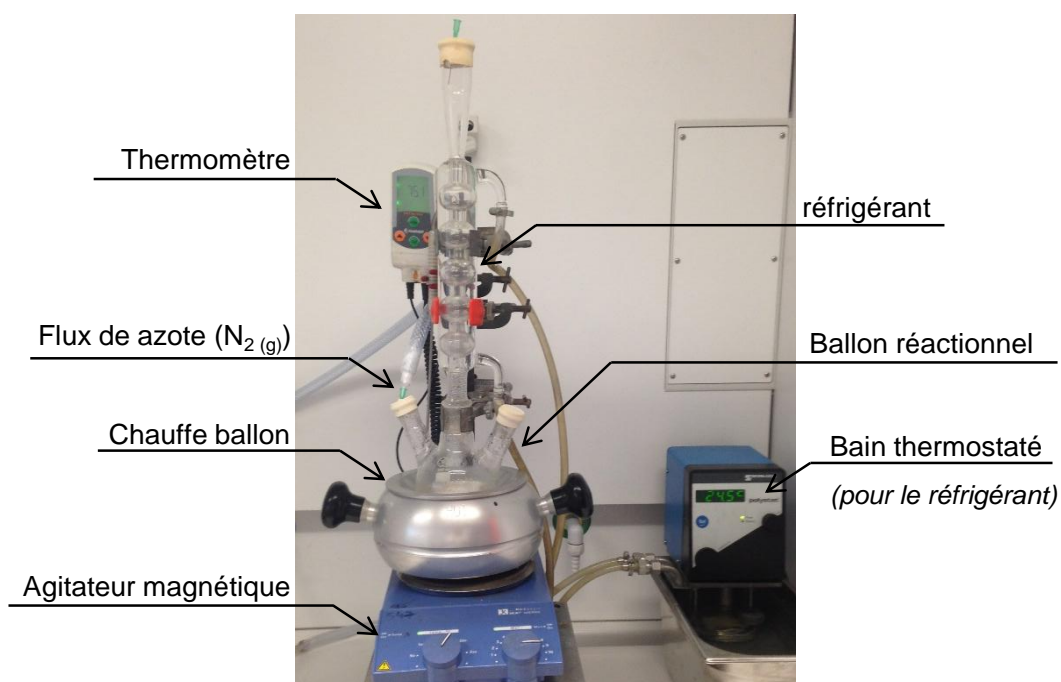


Figure 92. Montage de synthèse pour l'élaboration de nanogels par copolymérisation radicalaire par précipitation

Annexe 3. Estimation du nombre de nanoparticules inorganiques à l'intérieur des nanogels hybrides

L'estimation du nombre de nanoparticules inorganiques à l'intérieur des nanogels hybrides est effectuée à partir de l'analyse des images TEM

avec le logiciel ImageJ, en utilisant les plugings *MorphoLibJ* et *Analyze Particle*.

- 1) Soustraire le fond de l'image en allant dans *Process*, puis *Subtract background* (Plus le radius est petit, plus la soustraction sera importante).
- 2) Binariser l'image en allant à *image, type* et *32-bits*. Puis sur *image, adjust* et *Threshold*.
- 3) Ouvrir le plugging *MorphoLibJ*, puis cliquer sur *segmentation* et *morphological segmentation*.
- 4) Ouvrir le plugging *Analyze Particle* en allant dans *Analyze*, puis *analyze particles*. Dans *Set measurements*, choisir les informations souhaitées (taille, circularité des particles) et lancer le plugin *Analyze Particles*.
- 5) Le nombre total de NPMs sur l'image est ainsi obtenu. Ce nombre est divisé par le nombre de nanogels sur l'image, pour avoir le nombre X de NPMs par MagNanoGel et par image TEM. La valeur finale est obtenue en faisant une moyenne des valeurs obtenues pour chaque image.

Annexe 4. Structure cristallographique des AuNRs

La structure cristallographique des AuNRs a été étudiée par diffraction des rayons X de poudre (PXRD) avec un diffractomètre Rigaku Ultima IV. Le diffractogramme XRD d'un échantillon d'AuNRs lyophilisé, broyé et déposé sur un support en verre est mesuré de 10 à 80 ° (pour 2θ), à une vitesse $0,05\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, à 298 K et une radiation $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406\text{ \AA}$).

La Figure 93 montre les diffractogramme XRD expérimental (courbe noire) et théorique (courbe rouge, modélisée par le logiciel PDXL v.2 avec la méthode de Rietveld) des AuNRs. Les pics, indexés avec les indices de Miller (h, k, l) et les phases ont été indentifiés avec le logiciel PDXL v.2 et la base de données ouverte Cristallographie (COD). Les quatre pics indexés (111), (200), (220) et (311) correspondent bien aux données du fichier JCPDS-PDF n°01-071-4615 de l'or métallique. Par conséquent, les nanobâtonnets synthétisés ont une structure cristalline de type cubique à faces centrées (cfc).

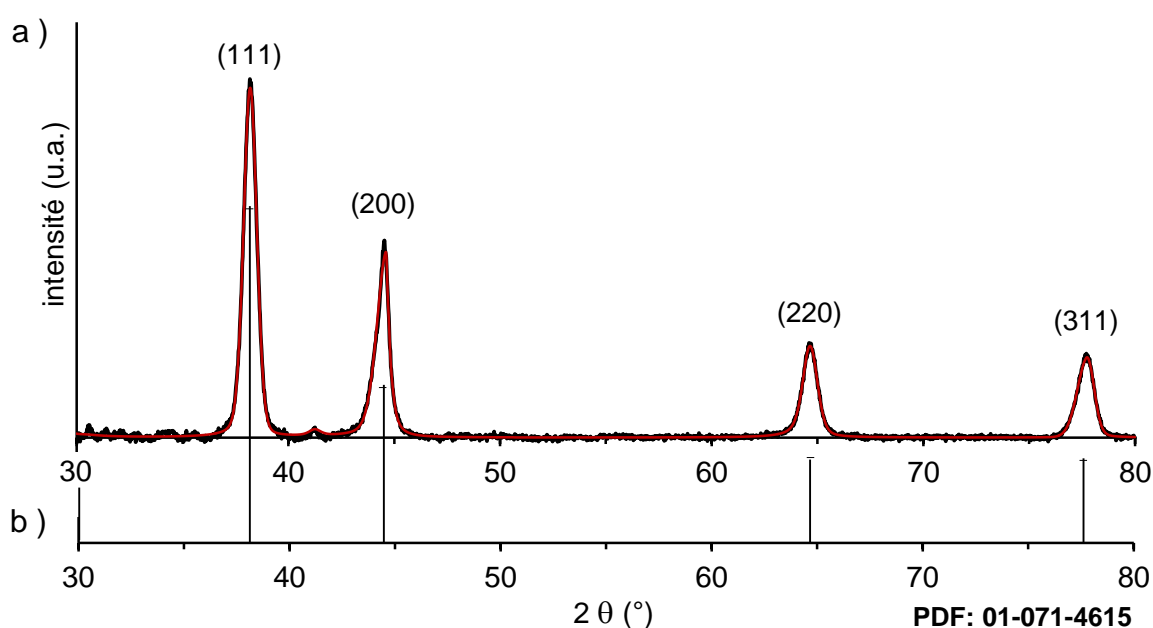


Figure 93. Diffractogramme de rayons X de poudre des nanobâtonnets d'or synthétisés. (a) Les données expérimentales (en noir) et la forme des pics modélisée avec le logiciel PDXL v.2 (en rouge) permettant de calculer les indices de Miller (h, k, l) et les phases. (b) Le fichier JCPDS-PDF de la structure cristalline de l'or métallique (Réf. 01-071-4615).

Annexe 5. Quantification de l'eau adsorbée à la surface des NPMs par ATG

L'analyse thermogravimétrique (TGA, de l'anglais ThermoGravimetric Analysis) de NPMs permet de quantifier l'eau absorbée à la surface des nanoparticules⁴. Pour cela, un volume de ferrofluide acide est séché dans une étuve à 70 °C pendant une nuit, puis placé dans une capsule en aluminium. La poudre est analysée avec un appareil SDT Q600 (TA Instruments) sous flux un d'azote N_{2(g)} à 100 mL.min⁻¹, avec une vitesse de chauffage de 10 °C.min⁻¹ de 25 à 800 °C.

Sur la Figure 95, la perte de masse est attribuée principalement à des couches d'eau adsorbées à la surface des nanoparticules de maghémite. L'eau physisorbée, c'est-à-dire les molécules d'eau liée à la surface de la maghémite par des forces de type électrostatique (Cf. Van der Waals) se désorbe jusqu'à 400 °C, avec une perte de masse de 6,7%. Au-dessus de 400 °C et jusqu'à 800 °C, l'eau chimisorbée est éliminée (perte de masse faible de 0,67%). Ainsi, les groupements hydroxyle à la surface de la maghémite vont se détacher pour reformer une molécule d'eau. La quantité totale d'eau absorbée (physiquement et chimiquement) à la surface des NPMs est de 7,4%. Entre 400 et 550 °C, la transformation de phase de la maghémite (γ -Fe₂O₃) en hématite (α -Fe₂O₃) est observée par élimination des molécules d'eau due à la réorganisation de la maille cristalline (encart Figure 95). La conversion complète en hématite est observée lorsque l'échantillon est chauffé au-delà de 600 °C (modification de la courbe TGA). La transformation (1) est effectuée à des températures plus faibles, probablement au fait que la magnétite et la maghémite ont des structures cristallines proches (structure cubique, du groupe spinelle) Cependant, la transformation (2) nécessite une température encore plus élevée vu que la structure cristalline de maghémite et l'hématite (structure rhomboédrique, du groupe corindon-hématite) sont complètement différentes. Ces transformations de phase sont irréversibles à température ambiante (Figure 94). Ces résultats concernant la transformation de phase des oxydes de fer sont en accord avec la littérature^{5,6}.

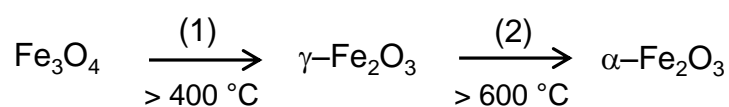


Figure 94. Transformation de phase des oxydes de fer par élévation de la température (oxydation).

La courbe TGA montre également la présence d'eau à des températures très élevées (au-delà de 700 °C) démontrant la capacité des molécules d'eau à former des liaisons fortes à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer.

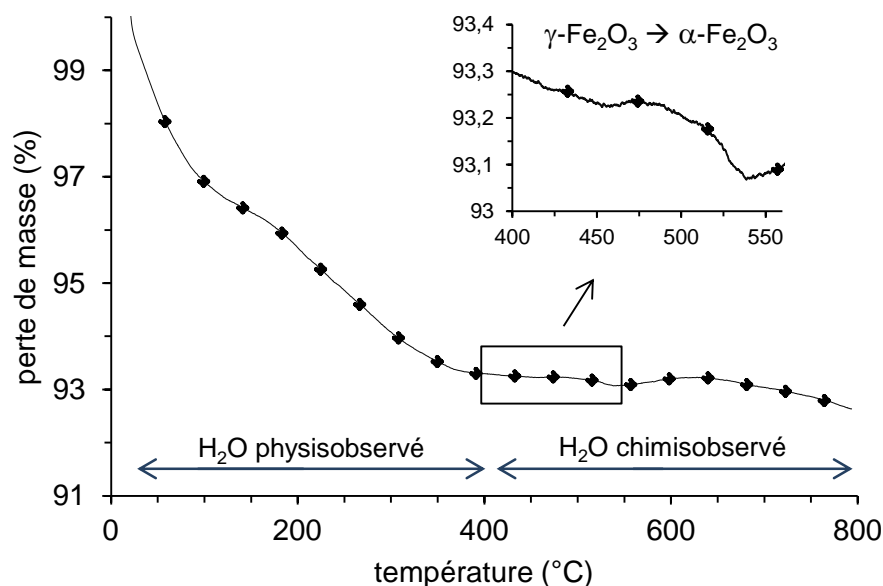


Figure 95. Analyse thermogravimétrique (N_2 (g); $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) des nanoparticules magnétiques (NPMs).

Références Annexes

- (1) Hoare, T.; Pelton, R. Functional Group Distributions in Carboxylic Acid Containing Poly(*N*-Isopropylacrylamide) Microgels. *Langmuir* **2004**, *20* (6), 2123–2133.
- (2) Hoare, T.; Pelton, R. Titrametric Characterization of PH-Induced Phase Transitions in Functionalized Microgels. *Langmuir* **2006**, *22* (17), 7342–7350.
- (3) Bacri, J.-C.; Perzynski, R.; Salin, D.; Cabuil, V.; Massart, R. Magnetic Colloidal Properties of Ionic Ferrofluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **1986**, *62* (1), 36–46.
- (4) Mornet, S. Synthèse et Modification Chimique de La Surface de Nanoparticules de Maghémite à Des Fins d'applications Biomédicales, Thèse. Université de Bordeaux 1, 2002.
- (5) Dar, M. I.; Shivashankar, S. A. Single Crystalline Magnetite, Maghemite, and Hematite Nanoparticles with Rich Coercivity. *RSC Adv.* **2013**, *4* (8), 4105–4113.
- (6) Jubb, A. M.; Allen, H. C. Vibrational Spectroscopic Characterization of Hematite, Maghemite, and Magnetite Thin Films Produced by Vapor Deposition. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2* (10), 2804–2812.

Annexe 6. Article : Cazares-Cortes E. *et al.* ACS Appl. Mater. Interfaces 2017

Doxorubicin Intracellular Remote Release from Biocompatible OEGMA-based Magnetic Nanogels Triggered by Magnetic Hyperthermia

Esther Cazares-Cortes^a, Ana Espinosa^b, Jean-Michel Guigner^c, Aude Michel^a, Nébéwia Griffete^a, Claire Wilhelm^{b} and Christine Ménager^{a*}*

^a Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, UMR 8234, Laboratory PHENIX, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

^b Univ. Paris Diderot, CNRS, UMR 7057, Laboratory MSC, 75205 Paris cedex 13, France

^c Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, UMR 7590, Laboratory IMPMC, IRD, MNHN, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

ACS Appl. Mater. Interfaces, 2017, 9 (31), pp 25775–25788.

DOI: 10.1021/acsami.7b06553

Publication Date (Web): July 19, 2017

* Corresponding authors. E-mail: claire.wilhelm@univ-paris-diderot.fr, christine.menager@upmc.fr.

KEYWORDS: oligo(ethylene glycol) methacrylates nanogels, magnetic nanoparticles, magnetic hyperthermia, remote drug release, cancer therapy

ABSTRACT: Hybrid nanogels, composed of thermoresponsive polymers and superparamagnetic nanoparticles (MNPs) are attractive nanocarriers for biomedical applications, being able – as polymer matrix – to uptake and release high quantities of chemotherapeutic agents and – as magnetic nanoparticles – to heat when exposed to an alternative magnetic field (AMF), better known as magnetic hyperthermia. Herein, biocompatible, pH-, magnetic- and thermo-responsive nanogels, based on oligo (ethylene glycol) methacrylate monomers (OEGMAs) and methacrylic acid co-monomer (MAA) were prepared by conventional precipitation radical co-polymerization in water, post-assembled by complexation with iron oxide magnetic nanoparticles (MNPs) of maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) and loaded with an anticancer drug (doxorubicin – DOX), for remotely controlled drug release by “hot-spot”, as an athermal magnetic hyperthermia strategy against cancer.

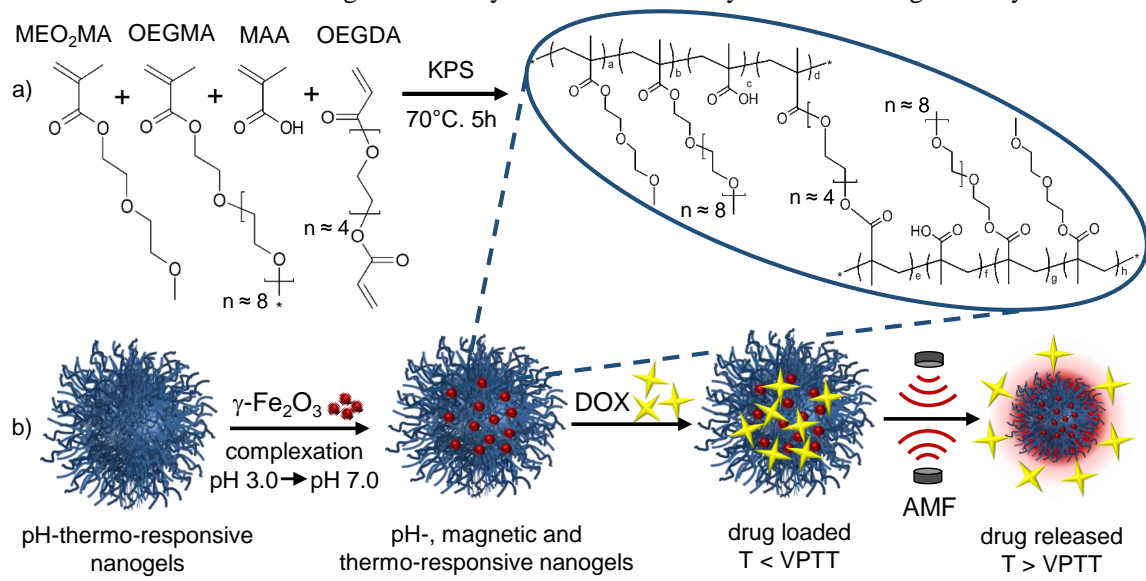
These nanogels, noted MagNanoGels, with a hydrodynamic diameter from 328 to 460 nm, as a function of MNPs content, have a swelling-deswelling behavior at their volume phase temperature transition (VPTT) around 47 °C in a physiological medium (pH 7.5), which is above the human body temperature (37 °C). Applying an alternative magnetic field increases twice the release of DOX, while no macroscopic heating was recorded. This enhanced drug release is due to a shrinking of the polymer network by local heating, as illustrated by the MagNanoGels size decrease under AMF. In cancer cells, not only the DOX-MagNanoGels internalize DOX more efficiently than free DOX, but also DOX intracellular release can be remotely triggered under AMF, in athermal conditions, thus enhancing DOX cytotoxicity.

1. INTRODUCTION

Polymer-based platforms have been widely studied as drug delivery systems (DDS) for cancer therapy, because they can encapsulate high amounts of chemotherapeutic drugs and allow the vectorization of the drug to a given location (tumor). Moreover, depending on the chosen chemical design, the release of the drug can be stimulated by intracellular environmental stimuli such as temperature, pH, redox and/or by an external stimuli: near infrared light (NIR), ultrasounds (US) and alternative magnetic field (AMF).¹⁻⁴ Recently, the preparation of smart nanocarriers combining two or more stimuli have attracted scientific attention.⁵⁻⁷ In particular the combination of pH with another internal / external stimulus is very interesting for cancer therapy because of the acidic microenvironment of cancerous cells (pH 4.5 – 6.5) compared to physiological microenvironment of normal cells (pH 7.5). Moreover, using an external stimulus may provide control over time and allow regulating the amount of drug release, enhancing therapeutic effectiveness and reducing systemic toxicity. This can be useful in nanomedicine, as the payload can be released on demand. To achieve this goal, researchers have designed hybrid nanodevices containing an organic component such a stimuli responsive and / or biodegradable polymer; and inorganic component such as gold, maghemite, silica nanoparticles (NPs) to form remotely-controlled drug delivery systems (RC-DDS)⁸. These multifunctional hybrid nanodevices can be used, not only as drug carriers, but also as imaging and theranostic agents⁵. More specifically, several RC-DDS based on thermoresponsive polymers and superparamagnetic nanoparticles (MNPs) have been used for remotely trigger drug release by applying AMF: magnetic-thermo-responsive micro/nanogels⁹⁻¹¹, microbeads¹², nanobeads¹³, nanocubes¹⁴, polymersomes¹⁵, but most of the time a macroscopic heating of the medium is needed for drug delivery.

Recently, some research groups have demonstrated that polymeric-MNPs nanocarriers (Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles¹⁶, polymer coated MNPs¹⁷⁻¹⁹) can release their payload without macroscopic heating (athermal conditions). In this case, MNPs act as individual “hot spots” and generate a localized heating, i.e. at the nanoscopic scale around the MNPs for triggering the release of the drug, without raising the global temperature. These findings have opened the possibility for the design of new RC-DDS. Thus far, the most studied thermoresponsive polymer in these hybrid nanodevices is the poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM), but its potential toxicity might limit biomedical applications. Moreover, several studies already indicated that polymers based on oligo(ethylene glycol) methacrylates (OEGMAs) exhibit an excellent *in vitro* or *in vivo* biocompatibility, such as linear poly(ethylene glycol) polymers²⁰, which has already been validated by the Food Drug Administration. Hence, nanodevices based on OEGMAs monomers have been elaborated as excellent biocompatible and thermoresponsive nanomaterials²¹⁻²⁵.

Here, we synthesize biocompatible, pH-, magnetic- and thermo-responsive nanogels based on oligo(ethylene glycol) methacrylate (macro)-monomers (OEGMAs) and methacrylic acid co-monomer (MAA), loaded with different mass ratio of γ -Fe₂O₃ superparamagnetic nanoparticles (MNPs – from 9.0 to 66.7 wt%) and doxorubicin (DOX). We propose to trigger the drug release under an alternative magnetic field (AMF) via an athermal magnetic hyperthermia strategy (Scheme 1a-b). The swelling-deswelling behavior of these nanogels, noted MagNanoGels, to various stimuli (temperature, pH and magnetic field) was investigated. Then, in order to demonstrate that MagNanoGels can be used as remotely controlled drug delivery systems (RC-DDS), an important amount of doxorubicin (DOX) was encapsulated into nanogels and their response to pH and to AMF stimuli were analyzed *in vitro* (batch) and in intracellular (PC-3 cancer cells) conditions (scheme 1b).

Scheme 1: Illustration of MagNanoGels synthesis and remotely controlled drug delivery under AMF *

a) Conventional aqueous precipitation radical co-polymerization reaction of nanogels based on oligo(ethylene glycol) methacrylate monomers. b) Schematic illustration of the MagNanoGels synthesis, loading and release of doxorubicin (DOX) under alternative magnetic field (AMF).

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Materials

Iron (II) chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), iron (III) nitrate nonahydrate ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), ammonia solution (NH_3 , 20 %), nitric acid (HNO_3 , 52.5 %) and hydrochloric acid (HCl , 37 %), diethyl ether and technical acetone were purchased from VWR for the preparation of superparamagnetic nanoparticles of maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (OEGMA, $M_n = 500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), di(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (MEO_2MA , $M_n = 188.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), poly(ethylene glycol) diacrylate (OEGDA, $M_n = 250 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), methacrylic acid (MAA), potassium persulfate (KPS), potassium hydroxide (KOH, flakes), nitric acid (HNO_3 , 52.5 %) were purchased from Sigma-Aldrich for the synthesis of bare and magnetic nanogels. Hepes hemisodium salt (dry powder) and doxorubicin hydrochloride (DOX) were purchased from Sigma-Aldrich and used for *in vitro* and intracellular drug release studies. Acryloxyethyl thiocarbamoyl rhodamine B was purchased from Sigma-Aldrich. Human prostate cancer PC-3 cells (CRL-1435™) from ATCC®, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) from Sigma-Aldrich, foetal bovine serum (FBS) from Gibco, penicillin and Alamar Blue assay from Life Technologies were used for all the *in vitro* cell studies. All materials were used as received without any purification. Water was distilled and deionized.

2.2 Synthesis of pH- and Thermo-responsive NanoGels

Oligo(ethylene glycol) methacrylate based nanogels were prepared in a batch reactor by conventional precipitation radical co-polymerization in water and without using surfactants. Firstly, 50 mL distilled water were purged with nitrogen ($\text{N}_{2(g)}$) for at least 30 min at room temperature in order to remove oxygen. This purged water was used as solvent for the polymerization reaction. Then, MEO_2MA (0.62 g; 3.3 mmol) monomer; OEGMA (0.18 g; 0.36 mmol), MAA (0.019 g; 0.221 mol) co-monomers and OEGDA (0.035 g; 0.14 mmol) cross-linker were dissolved in 40 mL of distilled purged water and put into a round-bottom flask. This solution was heated at 70 °C, stirred at 400 rpm and purged with nitrogen for 1 h. For starting the polymerization reaction, KPS initiator solution (0.005 g, 0.0185 mmol dissolved in 10 mL of purged water) was introduced into the round-bottom flask. The solution became turbid after a few minutes. The

polymerization reaction was allowed to continue under $N_{2(g)}$ at 70 °C, under reflux, with stirring for 5 h. Finally, the round-bottom flask was quickly immersed into an ice bath to stop the reaction. The final nanogels were then purified by dialysis against distilled water in order to remove unreacted reagents and impurities (using a Spectra / Por membrane, 12–14 kDa molecular weight cut off from Spectrum Laboratories). The water bath was changed for fresh water two times a day until the conductivity of the water bath was close to that of distilled water (around $2 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). In order to simplify writing, P(MEO₂MA-co-OEGMA-co-MAA) nanogels will be noted NanoGels thereafter.

2.3 Synthesis of Fluorescent RHO-NanoGels

In order to monitor doxorubicin (DOX) loaded nanogels internalization and DOX release inside cells by confocal fluorescent microscopy, we synthesized fluorescent rhodamine covalently bonded nanogels. In this case, a solution containing a rhodamine derivative co-monomer (acryloxyethyl thiocarbonyl rhodamine B) was prepared (0.1 wt% relative to the other monomers, MEO₂MA / OEGMA / MAA). This solution was filtered through a porous membrane of 0.2 μm in order to remove any impurities and was introduced into the round-bottom synthesis flask. RHO-NanoGels were then synthesized following the procedure described above.

2.4 Synthesis of Magnetic Nanoparticles

Magnetic nanoparticles (MNPs) of maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) were synthesized by co-precipitation of metallic salts (FeCl_2 and FeCl_3) according to Massart's procedure²⁶. A stable magnetic aqueous solution (ferrofluid, pH around 2), containing polydisperse, positively charged magnetic nanoparticles was obtained. Then, in order to reduce polydispersity, MNPs (with NO_3^- as counter ion) were sized-sorted, as stated by S. Lefebvre *et al.*²⁷. This procedure is based on the destabilization of positively charged MNPs dispersion by increasing the ionic strength of the medium. For this purpose, a concentrated nitric acid solution (HNO_3 , 52.2 %) was added to the MNPs dispersion. When the destabilization was observed, the flocculate was separated from the supernatant by magnetic sedimentation and washed with acetone and ether. The precedent step was repeated until having a phase with the desired size and dispersity. Only the ferrofluid fraction containing the biggest MNPs was used afterwards (TEM values: $d = 11.5 \text{ nm}$ and $\sigma = 0.33$; VSM values: $d = 9.8 \text{ nm}$, $\sigma = 0.28$ and volume fraction $\phi = 1.98 \%$).

2.5 Encapsulation of Magnetic Nanoparticles into NanoGels

Magnetic nanogels, noted MagNanoGels-X wt% ($X = 9.0, 16.7, 28.6, 37.5, 50.0$ and 66.7 wt\% with $X = m_{\text{MNPs}} / [m_{\text{MNPs}} + m_{\text{nanogels}}]$) were prepared by loading preformed MNPs into thermoresponsive oligo(ethylene glycol) methacrylate based nanogels as described by Boularas *et al.*²⁸. Briefly, for encapsulating the MNPs into nanogels, the pH of 5 mL of NanoGels solution ($[\text{nanogel}] = 6.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ determined by gravimetric measurements) was adjusted below 3.0 by addition of few drops of a nitric acid solution (0.1 M HNO_3). Then, a volume of MNPs solution depending on X (variable according to the desired concentration of MNPs), was added drop-by-drop to aqueous nanogels solution under stirring at room temperature. After 3 h, the pH was increased until 7.0 by addition of few drops of potassium hydroxide solution (0.1 M KOH); the solution was stirred overnight. Finally, MagNanoGels were washed several times by magnetic separation using a strong neodymium magnet (Nd-Fe-B, 1.22-1.26 T) and redispersed in water.

2.6 Encapsulation of Doxorubicin into MagNanoGels

The encapsulation of doxorubicin (DOX) into MagNanoGels was carried out by diffusion of molecules through the polymer matrix. Briefly, 1 mL of MagNanoGels at pH 7.5 (0.1 M sodium hepes buffer solution; $[\text{Fe}] = 8.36 \text{ mM}$; $[\text{nanogels}] = 2.94 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was mixed with 72 μL of DOX solution

([DOX] = 1 mg.mL⁻¹) and stirred during 24 h. After the encapsulation period, the excess of DOX (free DOX in solution and DOX adsorbed at the nanogels surface) was removed by several washing steps (10 min of magnetic separation). 1 mL of fresh hepes buffer solution was then added on MagNanoGels and all supernatants were analyzed by UV-Vis spectrophotometry to deduce the DOX amount encapsulated and the loading efficiency (%) of magnetic nanogels.

$$DOX_{encapsulated} = \text{initial amount of DOX} - \text{excess amount of DOX} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{loading efficiency (\%)} = \frac{DOX \text{ amount encapsulated}}{\text{initial amount of DOX}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

2.7 *In vitro* Drug Release Triggered by Stimuli: Temperature, pH and Magnetic Hyperthermia

In vitro DOX release of MagNanoGels containing 37.5 wt% of MNPs was analyzed in different conditions to assess the influence of the pH, the temperature and the effect of an alternative magnetic field (AMF). We monitored DOX release in medium at pH 7.5 (0.1 M sodium hepes solution) and at pH 5.0 (0.05 M citric acid and 0.1 M sodium phosphate).

For magnetic hyperthermia drug release experiments: 1 mL of DOX-MagNanoGels solution ([Fe] = 0.5 mM; [nanogel] = 0.16 mg.mL⁻¹; [DOX] = 4.4 μM, loading efficiency = 63 %) in corresponding buffer solution (pH 7.5 or 5.0) was placed in an eppendorf inside the coil of the MagneTherm™ system and AMF was applied by pulses of 30 min (335 kHz, 9 mT, 12.0 kA.m⁻¹). The temperature of the sample was monitored with a fluoroptic fiber thermometer and recorded every 1 s. After each AMF pulse, the supernatant was collected by magnetic separation (5 min). The amount of DOX release in each supernatant was quantified by UV-Vis spectroscopy. After the analysis, 1 mL of fresh buffer solution at the corresponding pH was added to magnetic nanogels. The same protocol was used for DOX release experiments without AMF, but in this case, the sample was placed in a water bath at the desired temperature (4, 25, 37, 50 and 70 °C).

2.8 Cell Culture

Human prostate cancer PC-3 cells (ATCC® CRL-1435™) were grown in adhesion in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 1% penicillin and 10% foetal bovine serum (FBS). They were kept at 37 °C in humidified atmosphere at 5% CO₂ until confluence.

2.8.1 Incubation and Cell Labelling

PC-3 cancer cells were incubated at 37 °C with an aqueous dispersion of MagNanoGels-37.5 wt%, a dispersion of DOX-MagNanoGels-37.5 wt% or with a DOX free solution ([Fe] = 0.13 to 4.1 mM in 5%-citrate RPMI medium and [DOX] = 1.1 to 36.6 μM) for 2 hours. Control MNPs were incubated for the same period ([Fe] = 0.13 to 1.1 mM). After incubation, cells were washed twice with culture medium, and further incubated for 2 hours (chase period) in complete medium (DMEM supplemented with 10% FBS) before treatments.

2.8.2 Quantification of the Cellular Uptake

The proportion of internalized MNPs in cells was determined by the amount of iron content per single cell through magnetophoresis. Briefly, after cells incubation with MNPs, MagNanoGels-37.5 wt% or DOX-MagNanoGels-37.5 wt%, cells were detached and suspended in a chamber subjected to a calibrated magnetic field gradient (gradB = 145 mT.m⁻¹; B = 17 T.m⁻¹) created by a permanent magnet. Single labeled cells migration towards the magnet was video-monitored and cell diameters (d_{cell}) and velocities (v_{cell}) were measured. The magnetization per cell (M_{cell}) was then computed for 200 independent cells by balancing the magnetic force (M_{cell}gradB) with the viscous drag (3π η d_{cell}v_{cell}, η being the water viscosity). The mass of

iron per cell (m_{Fe}) is then proportional to M_{cell} . For the MNPs used here, a magnetic moment of 6.6×10^{-14} A.m² corresponds to 1 pg of iron.

2.8.3 Cytotoxicity Assay

Cell viability after application of different treatments (in presence of free DOX, MagNanoGels-37.5 wt% and DOX-MagNanoGels-37.5 wt% with and without AMF) was evaluated in the colorimetric Alamar Blue assay. Labelled and treated cells were incubated with 10% Alamar Blue in DMEM for 2 hours. The Alamar Blue reagent was then transferred to a 96-well plate for analysis with a microplate reader (BMG FluoStar Galaxy) at an excitation wavelength of 550 nm with fluorescence detection at 590 nm. Viability was determined by comparison with control cells.

2.8.4 Intracellular Treatment under AMF

For AMF application, cells were first seeded in 1 cm diameter culture well and cultured until confluency. Then, after the incubation and chase period, the cells were submitted for 2 hours to an alternative magnetic field (AMF) produced by a generator device (NanoScale Biomagnetics) with a frequency of 470 kHz and an amplitude of 18 mT. Temperature was probed with a fluoroptic fiber thermometer and recorded every 1 s.

2.9 Characterization Techniques

2.9.1 Size Measurements

Dynamic Light Scattering (DLS): hydrodynamic diameter (d_h), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ζ) of MNPs, NanoGels and MagNanoGels were measured with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) at 25 °C with an angle of 173°. The measurements were repeated three times. For d_h measurements performed at different temperatures, the change of the water viscosity with temperature was taken into account. Samples were equilibrated for 10 min at each temperature before analysis. The diameter-temperature curves were carried out by heating (from 10 to 60 °C) and by cooling (from 60 to 10 °C), the d_h was measured every 2.5 °C. Each cycle was performed two times. The d_h of MagNanoGels before and after applying an alternative magnetic field (AMF pulse: 335 kHz, 9 mT, 12.0 kA.m⁻¹, 30 min) were also measured. All calculations (d_h and PDI) were performed using the Zetasizer software.

Transmission Electron Microscopy (TEM) and Cryo-TEM: size distribution parameters (diameter d , polydispersity σ) of MNPs, NanoGels and MagNanoGels were also characterized using a Jeol-100 CX TEM. A droplet of aqueous diluted nanogels dispersion was deposited on a carbon coated copper grid and dried at room temperature for at least 5 hours before TEM observations. Cryo-TEM images were taken with LaB6 JEOL JEM 2100 (JEOL, Japan) operating at 200 kV with a low dose system (Minimum Dose System, MDS). The samples were maintained at the desired temperature (25 and 50 °C) during one hour. Then, they were spread on a quantifoil holey-carbon-coated grid (Micro Tools GmbH, Germany) and quickly frozen by plunging the grid into liquid ethane. Images were recorded with an Ultrascan 2k CCD camera (Gatan, USA). Size distribution analysis were carried out on TEM and cryo-TEM images using ImageJ software and fitted to log-normal laws (standard error are based on $n = 100$ particles).

2.9.2 Gravimetric and Thermogravimetric Analysis (TGA)

The mass of nanogels per unit of volume of solution (mg.mL⁻¹) was evaluated by gravimetric measurement: 1 mL of nanogels solution was placed in a stove at 70 °C until all water was evaporated and the solid content was weighed afterward. Furthermore, MNPs content encapsulated inside nanogels was determined by thermogravimetric analysis using a TGA SDT Q600, TA Instruments, using an aluminum melting-pot. Samples were analyzed under nitrogen with a flow rate of 100 mL N_{2(g)}.min⁻¹ and at a heating

rate of 10 °C.min⁻¹ from room temperature 25 to 800 °C. The theoretical values of introduced MNPs were compared to the experimental fraction measured by thermogravimetric analysis (TGA).

2.9.3 Conductimetric and Potentiometric Analysis

The molar content of COOH per nanogel, the degree of ionization of –COOH functions (α) and their acidity constant (pKa) were calculated by conductimetric and potentiometric analysis as described by T. Hoare and R. Pelton²⁹. Briefly, a freshly prepared solution of sodium hydroxide ([NaOH] = 6 mM) was used to titrate –COOH groups contained in 10 mL of NanoGels solution ([nanogel] = 1.0.10⁻³ g.mL⁻¹). In order to protonate all carboxylic acid groups, the pH of nanogels solution was previously adjusted below 2.5 by adding some drops of an HCl solution at 0.1 M. The molar content of COOH per nanogels (in mmol COOH.g⁻¹ nanogels), α and the pKa were calculated as follows:

$$[COOH] = \frac{[NaOH]_{titrant} \times (V_{eq2} - V_{eq1})}{m_{nanogels}} \quad \text{Eq. 33}$$

$$\alpha_{(25^\circ C)} = \frac{[COO^- Na^+]}{[COO^- Na^+] + [COOH]} = \frac{V_{NaOH} - V_{eq1}}{V_{eq2} - V_{eq1}} \quad \text{Eq. 4}$$

$$pKa = pH - \log\left(\frac{\alpha_{(25^\circ C)}}{1 - \alpha_{(25^\circ C)}}\right) = pK_0 + \frac{1}{\ln(10)} \cdot \frac{dG_{el}}{RTd\alpha} \quad \text{Eq. 5}$$

V_{eq1} and V_{eq2} are the volume of NaOH added to neutralize respectively the excess of HCl and the COOH groups. V_{NaOH} is the volume added for a given pH. pK_0 is the intrinsic dissociation constant independent of α , R is the gas constant, T is the absolute temperature and G_{el} is the electrostatic Gibbs energy term. The pK_0 can be estimated by extrapolating the α versus pH curve back to $\alpha=0$ ³⁰. Conductimetric and potentiometric curves are provided in the supporting information report (Figure S1 – S2). The conductivity titration curve has three distinct zones: zone I corresponds to the neutralization of excess H⁺ (from HCl) by OH⁻ ions (from NaOH). In zone II, the deprotonation of carboxylic acid groups by OH⁻ ions is observed and in zone III, there is an excess of OH⁻ ions, raising the conductivity of the solution.

2.9.4 Iron Titration

The total iron concentration [Fe] was determined by atomic absorption spectroscopy using a Perkin-Elmer Analyst 100 system after completely degradation of MNPs with 10 times their volume in HCl (35%).

2.9.5 Magnetic Measurements

Vibrating Sample Magnetometer (VSM): magnetic properties of MNPs were measured using a VSM. A diluted aqueous solution of MNPs was prepared (volume fraction of nanoparticles $\phi < 2\%$). The magnetization curve M(H) of a suspension of monodisperse iron oxide nanoparticles can be described by a Langevin's law³¹. Assuming a log-normal distribution P(d) and fitting the theoretical to the experimental magnetization curve, we can calculate the magnetic diameter (d_0) and the polydispersity index (σ) of MNPs solutions.

Superconducting Quantum Interference Device (SQUID): the magnetic properties of MNPs and MagNanoGels were studied using a SQUID magnetometer. Samples were analyzed at 298 K by increasing the magnetic field from zero to 50 kOe; decreasing it to -50 kOe and finally increasing it back to zero.

Magnetic Hyperthermia Experiments: The specific loss power (SLP) of MNPs and the drug release kinetics of DOX-MagNanoGels-37.5 wt% were carried out with a MagneThermTM system (Nanotherics, UK) equipped with a fluoroptic fiber thermometer. The sample was heated at 23 or at 37 °C before the application of an alternative magnetic field (335 kHz, 9 mT, 12.0 kA.m⁻¹, 30 min). For studies at a higher frequency and higher magnetic field (470 kHz, 18 mT) and for cell studies, an alternating magnetic generator device (NanoScale Biomagnetics) was used.

2.9.6 UV-Visible Spectrophotometry

DOX encapsulation and release were monitored by absorbance measurements using an Avantes UV-visible spectrophotometer (100 μm optical fiber; deuterium-halogen light source) with wavelengths from 200 to 800 nm. Two calibration curves of DOX were performed from the UV absorbance at $\lambda_{\text{max}} = 485$ nm in two different buffer solutions: at pH 7.5 (0.1 M sodium hepes) and at pH 5.0 (0.05 M citric acid; 0.1 M sodium phosphate). Molar absorption coefficients are $\epsilon_{\text{pH}7.5}$: $13.1 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ and $\epsilon_{\text{pH}5.0}$: $11.6 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ respectively.

2.9.7 Confocal Imaging

Fluorescent RHO-MagNanoGels were synthesized by covalently grafting with rhodamine B (RHO; $\lambda_{\text{Ex}} = 548$ nm; $\lambda_{\text{Em}} = 570$ nm). The internalization of RHO-MagNanoGels, DOX loaded RHO-MagNanoGels and free DOX inside PC-3 cancer cells was analyzed by confocal microscopy. Cells were observed with an Olympus JX81/ BX61 Device/Yokogawa CSU Device spinning disk microscope (Andor Technology plc, Belfast, Northern Ireland), equipped with a 60x Plan-Apo oil objective lens. The rhodamine B was excited with laser at 561 nm, and fluorescence emission collected in the red channel at 604 nm. Doxorubicin (DOX) was excited with laser at 488 nm, and fluorescence emission collected in the green channel at 561 nm. To quantify the amount of nuclear DOX, a measurement of the cell nucleus was carried out by drawing circular areas included in the nucleus shape and measuring the average fluorescence intensity within ($n > 10$ cells). The intensity of the fluorescence is correlated with the amount of DOX internalized in the nucleus. Intracellular DOX release under AMF experiments were also monitored by confocal microscopy.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Synthesis and Characterization of NanoGels

Nanogels based on oligo(ethylene glycol) methacrylate (macro)-monomers (MEO₂MA; OEGMA), functionalized with methacrylic acid (MAA) were synthesized by aqueous precipitation radical copolymerization. The number of carboxylic functions (-COOH) per nanogel was deduced from conductimetric and potentiometric titrations of methacrylic acid functions inside nanogels (Figure S1). According to the equation 3 (experimental section), there are 0.38 mmol of COOH per gram of NanoGels. The pH (Eq. 4 and Eq. 5) as a function of the degree of ionization (α) of MAA units at 25 °C was calculated and plotted (Figure S2). The intrinsic dissociation constant of NanoGels (pK_0) was estimated by extrapolating the α versus pH curve back to $\alpha=0$.^{30, 32} This value ($\text{pK}_0 = 4.5$) is close to the pK_0 of linear poly(methacrylic acid) ($\text{pK}_0 = 4.65$). Similar results were obtained by M. Boularas *et al.*³³ for nanogels based on the same monomers (MEO₂MA, OEGMA and MAA).

NanoGels exhibit well-defined and spherical morphology in TEM images (Figure S3), have an average hydrodynamic diameter (d_h) of 328 nm at 25 °C, are highly monodispersed and are negatively charged in distilled water (pH 5.5), showing a zeta potential of -35.4 mV. As shown in Figure 1a, these nanogels present a swelling-deswelling behavior when the temperature is increased. Indeed, the d_h decreases from 354 nm (at 10 °C) to 272 nm (at 60 °C) at pH 5.5; and from 650 nm (at 10 °C) to 422 nm (at 60 °C) at pH 7.5 (Figure 1a). Experimental d_h versus temperature curves were fitted by a nonlinear regression estimated by least square method, in order to assess the inflection point of fitted curves, corresponding to the volume phase-transition temperature (VPTT). The VPTT of NanoGels is 30 °C at pH 5.5 and 54 °C at pH 7.5. Below the VPTT, the nanogels aqueous solution is limpid, while for $T > \text{VPTT}$ a higher turbidity is observed. Indeed, below the VPTT, the polymer and water molecules form hydrogen bonds, leading to swelling of the nanogels. However, with increasing temperature at $T > \text{VPTT}$, the hydrogen bonds are destroyed and hydrophobic interactions of the polymer appear, collapsing nanogels' matrix and expelling the water.

Due to the presence of carboxylic groups ($-\text{COOH}$) from methacrylic acid co-monomer, NanoGels are pH-responsive. Figure 1b shows the corresponding pH-dependence of the hydrodynamic diameter of NanoGels. Their d_h increases when the pH increases, from 315 nm at pH 2.0 to 545 nm at pH 9.0. When the $\text{pH} < 6.5$, the ($-\text{COOH}$) groups are mostly undissociated, thus nanogels are weakly negatively charged and behave like uncharged particles. In that case, the d_h of nanogels is only determined by the temperature. On the contrary, when $\text{pH} > 6.5$ the ($-\text{COOH}$) groups start dissociating and forming carboxylate groups ($-\text{COO}^-$), therefore nanogels are charged and fully swollen due to electrostatic repulsions between polymer chains. Here, the swelling of the nanogels is dominated by ionic contributions, mainly strong electrostatic repulsions between close ionic groups.

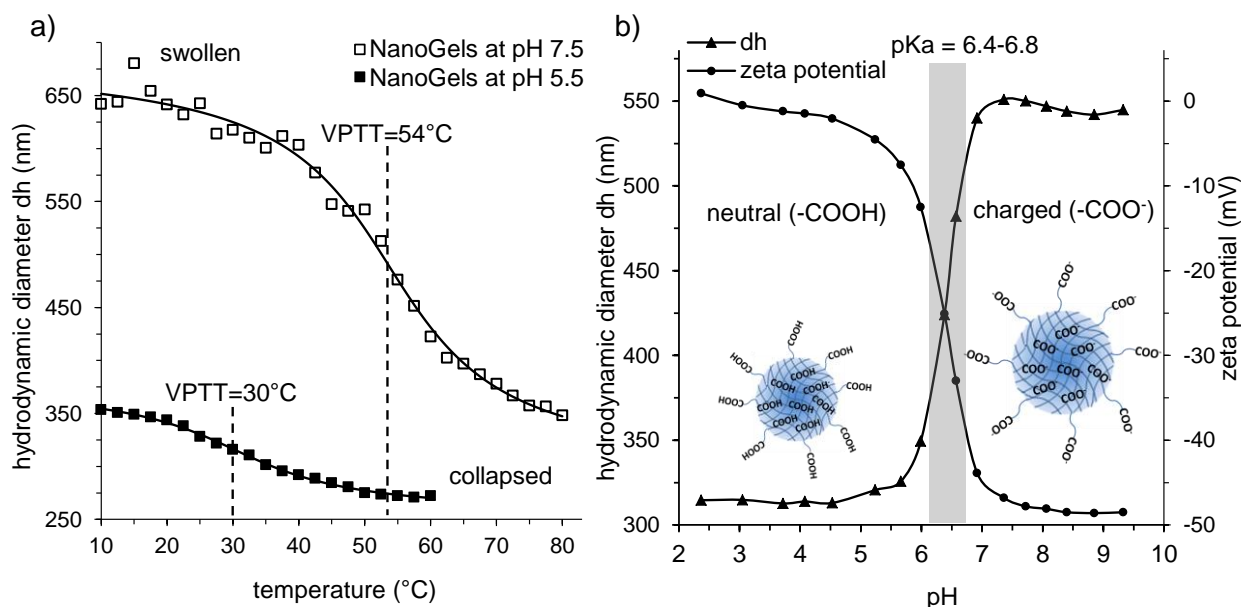


Figure 1. a) The hydrodynamic diameter (d_h) as a function of the temperature and b) the d_h and the zeta potential (ζ) of NanoGels as a function of the pH measured by DLS.

3.2 Synthesis and Characterization of MagNanoGels

To synthesize MagNanoGels, we adopted a similar strategy to the one employed by M. Boularas *et al.*²⁸ Some parameters were modified, like the reaction time and the purification method. This method, based on the assembly of preformed MNPs inside nanogels by complexation of carboxylic acid groups of the polymer matrix onto the surface of magnetic nanoparticles, provides monodisperse nanogels with high content of homogeneously distributed magnetic nanoparticles and ensures good properties of the two colloidal systems, the nanogels and the MNPs.

The iron oxide nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) were synthesized by co-precipitation of metallic salts FeCl_2 and FeCl_3 according to Massart's process²⁶. They have a "rock-like" shape, as observed in TEM images (Figure S4). They are positively charged ($\zeta = 25.3$ mV) and are stabilized by electrostatic repulsions in acidic medium. It has been demonstrated that their heating power can be improved by increasing particles diameters and reducing polydispersity³⁴. Therefore, the MNPs were size-sorted and only the fraction containing the larger particles was used to prepare MagNanoGels ($d = 11.5$ nm and $\sigma = 0.33$ obtained by TEM). The MNPs were incorporated into nanogels by changing gradually the pH of the solution from 3.0 to 7.0. At pH 3.0, the MNPs are positively charged and the nanogels are neutral; thus the MNPs can diffuse easily through the polymer matrix without flocculation. At pH 7.0, the MNPs bear no charge and carboxylate groups can bound to the surface of MNPs by a complexation reaction³⁵. Magnetic nanoparticles were incorporated into nanogels at various mass ratio ($X = 9.0, 16.7, 28.6, 37.5, 50.0$ and 66.7 wt%; with $X = m_{\text{MNPs}} / [m_{\text{MNPs}} + m_{\text{nanogels}}]$). Magnetic nanogels with $X > 50.0$ wt% could not be measured by

DLS because of their instability. In distilled water (pH 5.5) at 25 °C (swollen state), the d_h of MagNanoGels increases as the MNPs mass ratio increases, from 342 nm to 460 nm for nanogels containing 9.0 to 37.5 wt% of MNPs respectively (Table 1). At 50 °C (collapsed state), the d_h of nanogels containing MNPs is bigger than the d_h of bare nanogels (295 nm vs. 275 nm for magnetic and non-magnetic nanogels respectively), but it no longer depends on the MNPs mass ratio and remains around 300 nm. All nanogels are weakly negatively charged in distilled water (pH 5.5), because of some deprotonated carboxylic acid groups. The more MNPs are added, the more the charge of nanogels increases, from -35.4 to -24.7 mV for NanoGels and MagNanoGels-37.5 wt% respectively. Carboxylic acid groups are essential for the structure and physicochemical properties of the magnetic nanogels. It allows: (1) to load magnetic nanoparticles into nanogels by complexation of iron atoms onto the surface of the MNPs, (2) to increase the VPTT value of the oligo (ethylene glycol) copolymers in order to have a temperature up to 37 °C in physiological conditions by increasing the hydrophilicity of nanogels, (3) to have pH-sensitive nanogels and (4) to encapsulate a drug by electrostatic or hydrogen bonding interactions.

The swelling ratio (Q) of nanogels was calculated using the following equation:

$$Q = \frac{V_{\text{swollen nanogels}}}{V_{\text{deswollen nanogels}}} = \frac{V_{d_h \text{ at } 25^\circ\text{C}}}{V_{d_h \text{ at } 50^\circ\text{C}}} \quad \text{Eq. 34}$$

Q depends on the degree of crosslinking of polymer matrix and is directly related to the quantity of water that it can be loaded and released by nanogels. The swelling ratio remains the same for non-magnetic nanogels at pH 5.5 and pH 7.5 (Q = 1.7), but it decreases from Q = 3.7 to 1.6 for MagNanoGels-37.5 wt% when the pH increases from 5.5 to 7.5. All the parameters of magnetic nanogels containing various MNPs mass ratios are given in the Table 1.

Table 1. Characteristics of MagNanoGels-X wt% loaded with various MNPs mass ratio (from X = 0 to 37.5 wt%) at pH 5.5 and 7.5 *

X (%m)	pH 5,5					pH 7,5	
	0	9,0	16,7	28,6	37,5	0	37,5
d_h à 25°C (nm)	328	342	337	374	460	643	584
(PDI)	(0,021)	(0,086)	(0,107)	(0,132)	(0,364)	(0,087)	(0,371)
d_h à 50°C (nm)	275	295	295	310	298	542	495
(PDI)	(0,037)	(0,039)	(0,047)	(0,115)	(0,312)	(0,078)	(0,367)
Q	1,70	1,56	1,50	1,76	3,68	1,66	1,64
ζ (mv)	-35,43	-32,63	-29,80	-29,35	-24,67	-12,67	-10,62
VPTT (°C)	30,31	25,95	21,75	24,91	28,57	53,54	47,01

* The hydrodynamic diameter (d_h) and PDI at 25 and 50 °C; the swelling ratio (Q), the zeta-potential (ζ) and the Volume Phase Temperature Transition (VPTT) were measured by DLS.

Furthermore, as we can observe by TEM, MNPs seem to be homogeneously distributed (no aggregates) in nanogels, when the MNPs mass ratio is below 50 wt% (Figure 2a to d). However, this is a 2D projection, so it is difficult to localize the MNPs in the structure (shell versus core for example). The "honeycomb" structure is due to the drying of nanogels on the TEM grid. For higher content in MNPs (X > 50 w%), some aggregates appear on the surface of the nanogels (Figure 2e) and for X = 66.7 wt%, nanogels look like capsules with a more dense shell (Figure 2f).

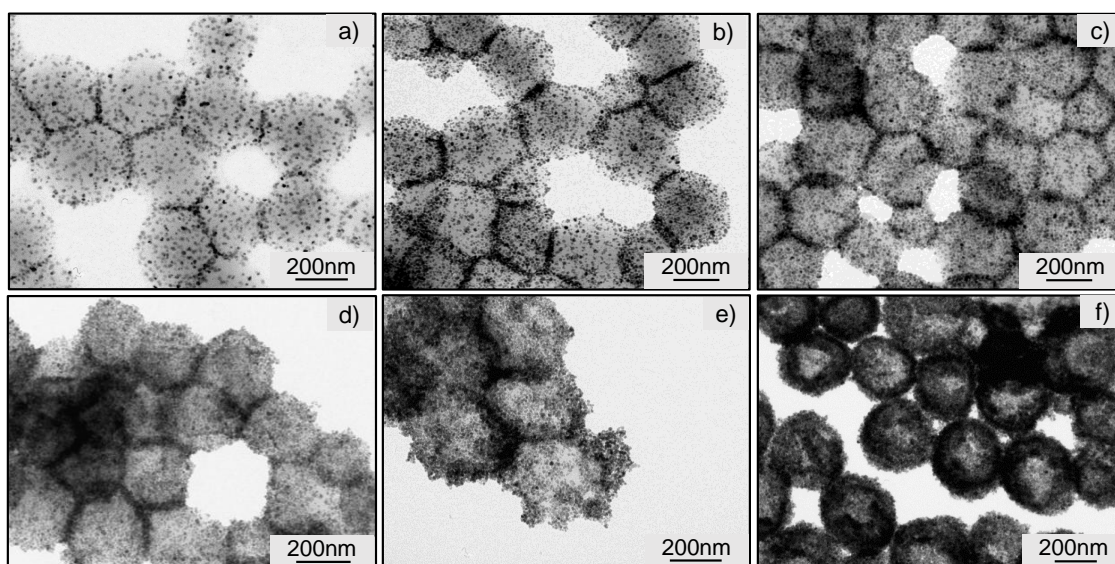


Figure 2. TEM images of MagNanoGels- X wt% loaded with $X = 9.0, 16.7, 28.6, 37.5, 50.0$ and 66.7 wt% of MNPs (from a to f respectively). MNPs are homogeneously distributed inside nanogels. When $X > 50$ wt% (e, f) nanogels are not stable in water.

The incorporation of MNPs into nanogels can be quantified by TGA as shown from the TGA curves of MNPs, NanoGels and MagNanoGels (Figure S5). As expected, the mass of NanoGels decreases sharply from 225 to 430 °C due to the thermal decomposition of polymer matrix. The TGA curve shows a total weight loss above 450 °C. When incorporating MNPs, the weight loss decreases from 87 to 70% depending on the MNPs loading percent. These results confirm the effective presence of MNPs in the MagNanoGels.

3.3 Thermo- and pH-sensitivity of NanoGels and MagNanoGels

MagNanoGels are multi-stimuli responsive nanocarriers, sensitive to pH (via carboxylic acid groups), temperature (via oligo(ethylene glycol) monomers) and magnetic fields (via MNPs).

The evolution of the d_h at different temperatures of MagNanoGels- X wt%, loaded with different MNPs content (MNPs mass ratio $X = 9.0, 16.7, 28.6$ and 37.5 wt%), was analyzed by DLS. These measurements reveal that the d_h of all magnetic nanogels decreases while temperature increases, proving their thermoresponsive swelling-deswelling behavior (Figure 3a). So for example, d_h decreases from 460 nm at 25 °C to 298 nm at 50 °C for magnetic nanogels containing 37.5 wt% of MNPs ($\Delta d = 30$ nm). This swelling-deswelling behavior is fully reversible and seems to be independent of the amount of MNPs contained into nanogels, at pH 5.0 the VPTT of all magnetic nanogels remains around 25 °C.

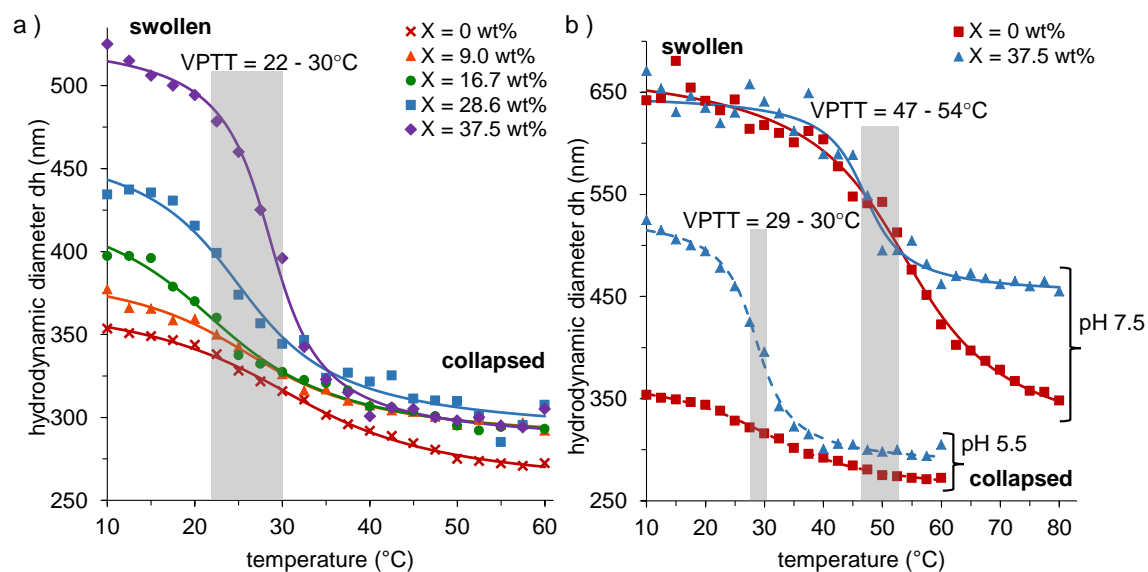


Figure 3. a) Diameter-temperature curves of MagNanoGels-X wt% in water (pH 5.5) and b) at different pH: in water (pH 5.5) and in a physiological medium (0.1 M hepes buffer saline solution, pH 7.5) measured by DLS.

The charge density of nanogels, which depends on the pH of the medium, also modifies their temperature-dependent swelling behavior with a shift of the VPTT towards higher temperatures when increasing the pH. Thus, the VPTT of MagNanoGels-37.5 wt% rises from 28.6 to 47.0 $^{\circ}\text{C}$, when changing the pH from 5.5 to 7.5 (Figure 3b). Since the VPTT of the nanogels is higher than 37 $^{\circ}\text{C}$ (human body temperature) under physiological conditions (pH 7.5), these nanogels could be used as “on-demand” drug release nanocarriers for biomedical applications.

3.4 Magnetic Properties of MNPs and MagNanoGels

The magnetization versus applied magnetic field curves, obtained by SQUID measurements, confirm the superparamagnetic properties of MNPs and MagNanoGels (Figure 4a). Indeed, they have zero coercivity and remanence (inset of Figure 4a). The saturation magnetization (M_s) value of MNPs and MagNanoGels-37.5 wt%, containing the same iron concentration ($[\text{Fe}] = 11.5 \text{ mM}$), are respectively 98 and 96 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ at 50 kOe. Thus, the M_s of MNPs remains the same after their incorporation into nanogels.

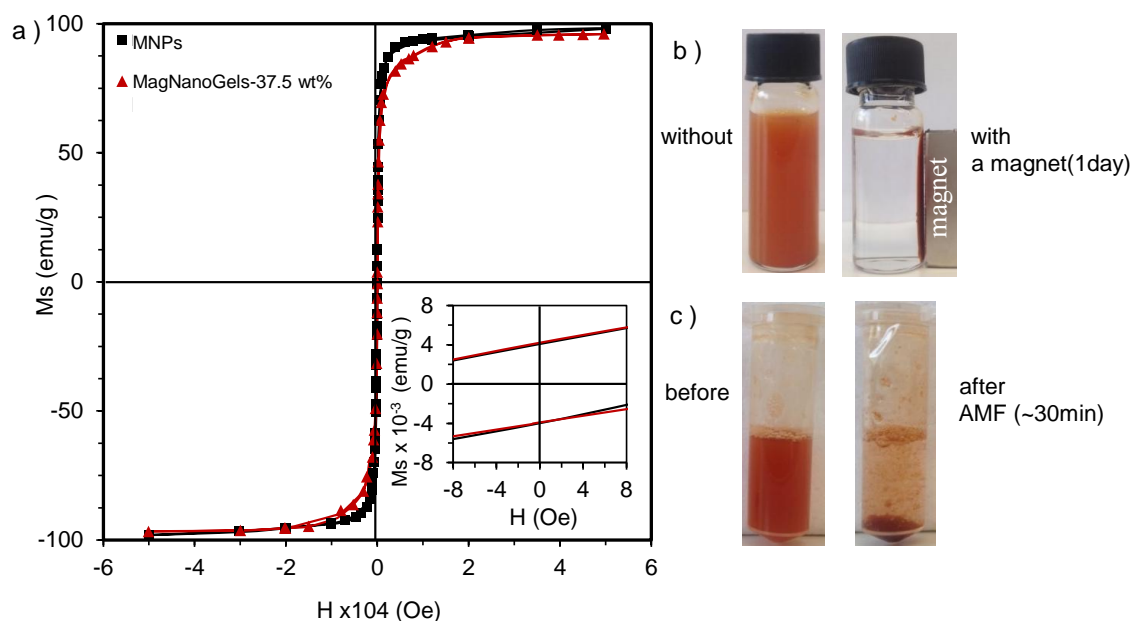


Figure 4. a) Magnetization curve of MNPs and MagNanoGels-37.5wt% at 298 K, measured by SQUID and magnetic behavior of these nanogels in the presence of b) a permanent magnet (Nd-Fe-B, 1.22-1.26 T) and c) an alternative magnetic field AMF (335 kHz, 9 mT, 12.0 kA.m⁻¹).

MagNanoGels are well dispersed in water if neither permanent nor alternative magnetic fields are applied. As shown in Figure 4b, nanogels can be collected using a permanent magnet. In response to the permanent magnetic field, nanogels move and form a pellet on the container wall near the magnet. This technique was used for the purification of magnetic nanogels after their synthesis. Otherwise, nanogels aggregate under an alternative magnetic field (AMF), but this aggregation is reversible (Figure 4c).

Furthermore, superparamagnetic nanoparticles generate heat under an alternative magnetic field (AMF).³⁴ This phenomenon is called “magnetic hyperthermia”. Heat dissipation is governed by Néel (rotation of the magnetic moment) and / or Brown (rotation of the particles) relaxations. It was demonstrated that, for maghemite nanoparticles produced by coprecipitation of iron salts such as the ones used here, with diameter below 16 nm, the heat dissipation is mainly controlled by Néel relaxation³⁴. In order to assess the efficacy of MNPs as magnetic hyperthermia source, the specific loss power (SLP, in W.g⁻¹ of MNPs or in W.g⁻¹ of iron) of MNPs and MagNanoGels-37.5 wt% were calculated according to the equation below:

$$SLP = \frac{C_p}{\rho \cdot \phi} \cdot \left[\frac{d\theta}{dt} \right]_T \quad \text{Eq. 35}$$

where C_p is the specific mass heat capacity of the solvent ($C_{p_{\text{water}}} = 4.184 \text{ J.K}^{-1}.\text{g}^{-1}$), ρ is the density of magnetic nanoparticles ($\rho_{\text{MNPs}} = 4.9$) and ϕ is the volume fraction of MNPs in the ferrofluid or inside the nanogels. The evolution of the temperature was monitored *in situ* using a non-metallic fluoroptic fiber thermometer when applying AMF (335 kHz, 9 mT, 12.0 kA.m⁻¹) during 2 min at 25 °C. At 335 kHz, the SLP of MNPs and MagNanoGels-37.5 wt% are similar ($SLP_{\text{MNPs}}=47 \text{ W.g}^{-1} \text{ Fe}$ and $SLP_{\text{nanogels}}=55 \text{ W.g}^{-1} \text{ Fe}$), therefore the MNPs preserve their heating power after being loaded into nanogels.

Moreover, as shown in Figure S6 a, the temperature of a highly concentrated MNPs solution ([Fe] = 1.14 M, $\phi = 1.8 \%$) increases drastically from 20 to 46 °C ($\Delta T = 26 \text{ °C}$) after being exposed to AMF (335 kHz, 9 mT, 12.0 kA.m⁻¹, 2 min). For a 10-fold less concentrated solution, the temperature increases from 20 to 24 °C ($\Delta T = 4 \text{ °C}$); and for a sample diluted 100 fold, the temperature remains nearly constant (20 °C). The same behavior is observed for MagNanoGels solutions (Figure S6b). Hereafter, the MagNanoGels

solutions were used very diluted in order to avoid global heating and to study the possibility of remotely controlled the swelling-deswelling transition of magnetic nanogels under AMF in athermal conditions.

For this purpose, the evolution of the hydrodynamic diameter of MagNanoGel-37.5 wt% ([nanogels] = 2.9 mg.mL⁻¹; ([Fe] = 8.4 mM), before and after applying AMF, were monitored by DLS. As expected, the global temperature of these MagNanoGel-37.5 wt% diluted solutions did not increase (athermal conditions). Otherwise, the d_h decreases from 301 to 273 nm ($\Delta d_h = 28$ nm) when applying AMF during 30 min. These results were confirmed by cryo-TEM observations. As shown in Figure 5a, before applying AMF, magnetic nanoparticles are uniformly distributed into polymer matrix and mainly between the polymeric chains of nanogel brush. After applying AMF, the average diameter of MagNanoGels decreases from 462 to 430 nm ($\Delta d = 32$ nm) and the MNPs became closer to the surface of nanogels forming a “corona”, in accordance to the swelling-deswelling behavior of polymer chains (Figure 5b). Indeed, before AMF, $T < VPTT$ and polymer chains are hydrophilic and well swollen in the solution.

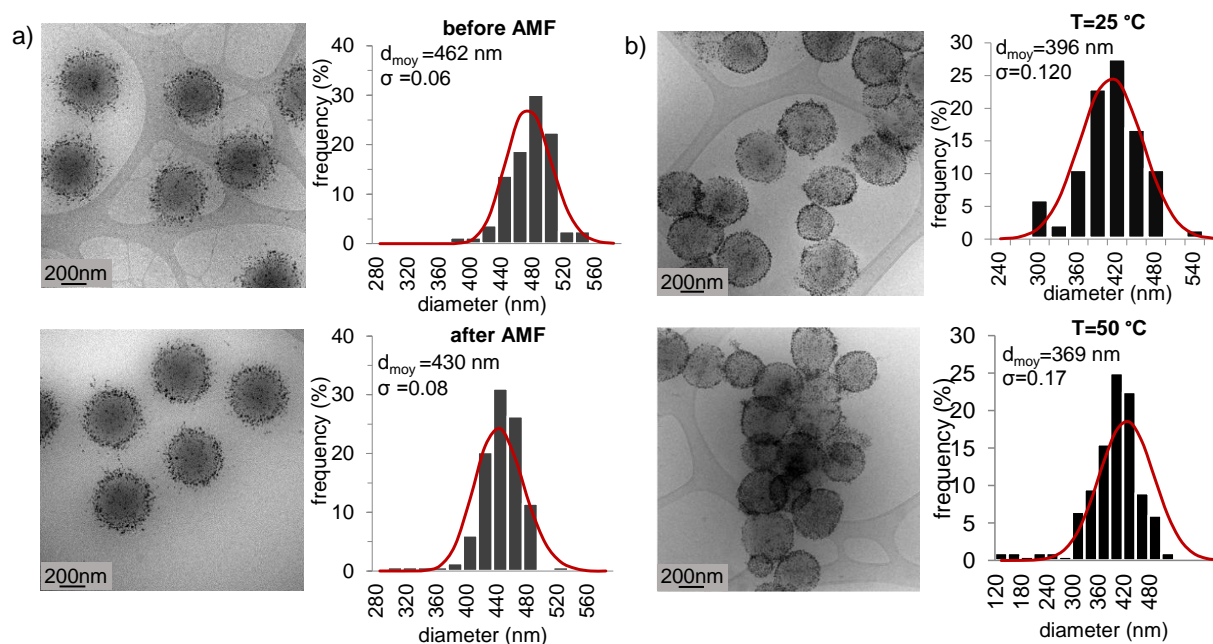


Figure 5. Evolution of the diameter of MagNanoGels-37.5 wt% a) by applying AMF at 335 kHz, 17 mT, 30 min (localized magnetic heating) and b) by placing the sample in an oven at 50 °C (macroscopic heating) and monitored by cryo-TEM ($\Delta d \approx 30$ nm). Standard error based on $n = 80$ particles.

These results suggest that under AMF and in athermal conditions, the polymer chains become hydrophobic and collapse, decreasing the polymer chains length and reducing the interparticles distance. This prove that under AMF, the MNPs inside nanogels act as “hot spots” and only generate a local heating at nanometric scale, and that this heat is sufficient to cause the deswelling of nanogels. For the MagNanoGels having the highest mass ratio of MNPs (66.7 wt%), the reduction of diameter is lower ($\Delta d \approx 15$ nm). These nanogels not only look like capsules with a more dense shell, but they also have a more rigid structure because of their high load in magnetic nanoparticles, which limits their deswelling (Figure S8).

Furthermore, it is interesting to compare cryo-TEM images wherein the temperature of magnetic nanogels was increased by placing the sample in an oven (macroscopic heating) and by applying AMF (localized magnetic heating) (Figure 5). Comparing different cryo-TEM images, it was noted that after macroscopic heating, MagNanoGels were more or less deformed, and that some of them shrank much more than others. On the contrary, after localized magnetic heating, nanogels shrank but kept their spherical shape. This can be explained by different heat diffusion mechanisms. During macroscopic heating, the heat diffuses from the outside to the inside of nanogels matrix, whereas during magnetic heating, each MNP acts

as a “hot spot” and the heat is distributed homogeneously throughout the polymer matrix, assuming that the MNPs are distributed inside the nanogels.

3.5 Drug Release from DOX-loaded, pH- and Thermo-responsive MagNanoGels

MagNanoGels can be used as drug delivery systems (DDS) given that their polymer matrix is able to uptake and release high quantities of drugs. Moreover, we have shown above that the swelling-deswelling transition of MagNanoGels can be triggered by various stimuli: temperature, pH and magnetic field. Therefore, the responses to these three stimuli for *in vitro* and intracellular remotely controlled release of drug were investigated.

3.5.1 Encapsulation of DOX into MagNanoGels

Doxorubicin (DOX) is one of the most commonly used drugs to treat several types of cancer. However, it is well known that free DOX could have adverse effects on human body, such as cardiotoxicity and nephrotoxicity and that the encapsulation of the drug in polymeric nanocarriers (polymersomes, dendrimers, molecularly imprinted polymers, nanogels) may be a way to reduce side effects^{36,37}. The encapsulation of DOX into MagNanoGels-37.5 wt% was carried out by diffusion of molecules through the polymer matrix at pH 7.5 (0.1 M sodium hepes buffer) and room temperature. Then the excess of drug was removed by repeated washing and magnetic separation steps, until there is no more drug left in the supernatant. The chemical stability of DOX in buffer's solutions has already been studied elsewhere³⁸. The best storage conditions for long-time DOX stability are acidic medium (pH < 4) and low temperature (4 – 6 °C), thus DOX hepes buffer solution was freshly prepared before each encapsulation experiment. After having analyzed all the supernatants by UV-Vis spectrophotometer, the amount of DOX encapsulated and the loading efficiency (%) of MagNanoGels were calculated using a calibration curve (Figure S9) and equations 1 and 2 (experimental section). All encapsulation experiments were carried out using 1 mL of hepes solution containing 2.94 mg.mL⁻¹ of MagNanoGels-37.5 wt% and 115.8 μM of DOX. In these conditions, nanogels could be loaded with 69.5 μM of DOX, which corresponds to 63 % of loading efficiency (average of 10 experiments).

3.5.2 DOX Release Triggered by Temperature

The release profiles of DOX from DOX-MagNanoGels-37.5 wt% at pH 7.5 have been studied at various temperatures (4, 23, 37, 50 and 70 °C) in order to show the thermosensitivity of magnetic nanogels for triggered drug release. To reach the desired temperature, the samples were placed in a water bath. Each release experiment was carried out in triplicate, and average values were calculated and used to plot cumulative DOX release profiles. As shown in Figure 6, the cumulative DOX release increases when the global temperature rises. After 4 h, MagNanoGels release 17 % (11.8 μM), 24 % (16.7 μM), 32 % (22.2 μM) and 36 % (25.0 μM) at respectively 23, 37, 50 and 70 °C. The release profile of DOX at 37 °C and pH 7.5 (yellow curve) was carried out in order to be placed in the same conditions of *in vitro* upcoming cancer cells studies. Furthermore, DOX-MagNanoGels can be well stored at low temperature; in fact DOX release was negligible when DOX-MagNanoGels solutions were stored at 4 °C (blue curve). After 1 month at 4 °C, less than 20 % (13.9 μM) of DOX was released.

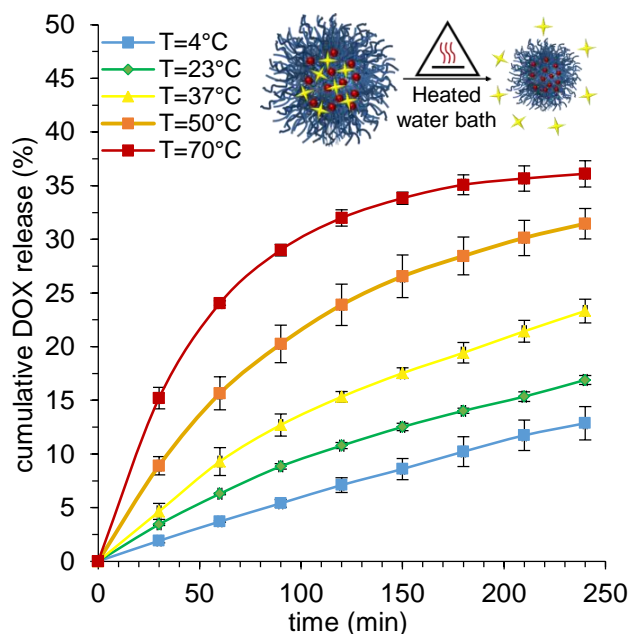


Figure 96: Cumulative DOX release profile (%) versus time of DOX-MagNanoGels-37.5 wt% ([Fe] = 8.4 mM) in buffer solution (pH 7.5, 0.1 M sodium hepes) at different temperatures. DOX release was calculated from UV-vis absorbance measurements, tracking the absorbance at 485 nm. Standard error based on $n = 3$ samples.

3.5.3 DOX Release Triggered by pH and Alternative Magnetic Field

We investigated the potential application of these magnetic nanogels for remotely controlled drug delivery by variations of the pH (internal stimuli) and by applying an alternative magnetic field (external stimuli).

After 4 h, at 37 °C and pH 7.5, only 24 % (16.7 μM) of DOX was released whereas at pH 5.0, the release of drug highly increased and reached 96 % (66.7 μM) (Figure 7). This pH-responsive behavior of MagNanoGels is very important for further cancer treatment, because DOX release can be limited in a normal physiological environment (pH 7.5). And, after cancer cell internalization, DOX release can be accelerated due to the acidic intracellular environments (lysosomes at pH 4.5). This pH-sensitivity can be explained by electrostatic interactions between DOX and MagNanoGels. At pH 7.5, DOX release is restricted by interactions between negatively charged nanogels (COO^-) and positively charged amino group (NH_3^+) of DOX. At pH 5.0, the carboxyl groups of MagNanoGels are mostly protonated (COOH), thus reducing interactions with the drug, but also reducing the d_h of nanogels, so expelling more drug. These results are in good agreement with recently reported results of pH-sensitive nanogels functionalized with carboxylic acid groups (from acrylic acid co-monomer)^{6,39}.

Otherwise, when applying an alternative magnetic field by pulses (335 kHz, 9 mT, 12.0 $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$, 30 min) DOX release was significantly enhanced at both pH conditions: after 4h at pH 7.5, MagNanoGels released two-fold more drug under AMF (47 % – 32.7 μM vs. 24 % – 16.7 μM); and at pH 5.0 all the DOX was expelled out of the MagNanoGels under AMF (100 % – 69.5 μM vs. 96 % – 66.7 μM) (Figure 7). If a higher AMF is applied (470 kHz; 18 mT; 14.4 $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$), DOX release slightly increases compared to a DOX release with AMF at 335 kHz (Figure S10). These results demonstrate that MagNanoGels can be used for remotely trigger of DOX under AMF and that localized heating generated by MNPs is sufficient to highly increase drug delivery without macroscopic heating.

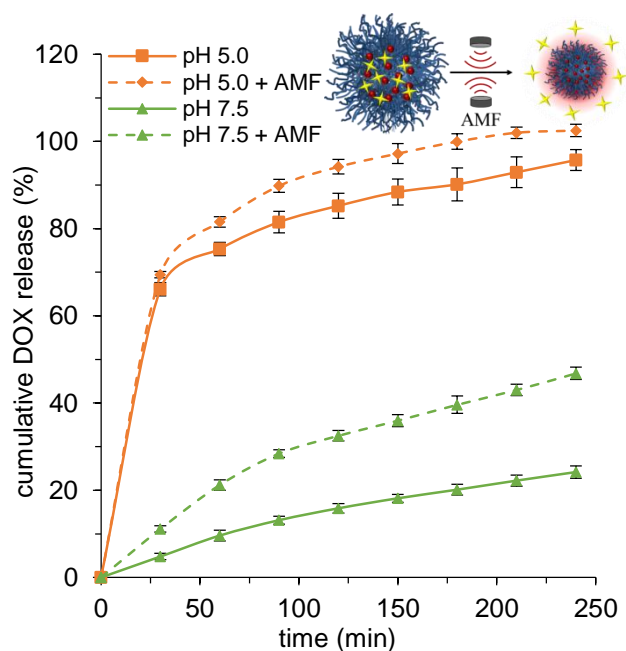


Figure 7. Cumulative DOX release profile (%) versus time of DOX loaded MagNanoGels-37.5 wt% ([Fe] = 8.35 mM) in physiological (pH 7.5; 0.1 M hepes sodium) and acidic (pH 5.0; 0.05 M citric acid and 0.1 M sodium phosphate) conditions at 37 °C without and with AMF (each AMF pulse: 335 kHz, 9 mT, 12.0 kA.m⁻¹, 30 min). DOX release was calculated from UV-vis absorbance measurements at 485 nm. Standard error is based on n = 3 samples.

During AMF experiments, the temperature of the sample was monitored with a non-metallic fluoroptic fiber thermometer and no macroscopic heating was detected (because of the low MNPs concentration). However, we have demonstrated that the d_h of MagNanoGels decreases under AMF due to a local heating of MNPs, not measurable by conventional thermometers. Thus, the heat generated under AMF is enough to provoke a shrinking of polymer network and enhances DOX release. This “hot spot” or “local magnetic hyperthermia” effect has already been observed for other DDS based on polymers (e.g. MNPs coated with polymers^{13,18}; MIP-nanoparticle¹⁶; polymersomes⁴⁰). Concerning nanogels, the most studied systems for remotely drug delivery by applying AMF are based on poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)^{9,41}. However, after purification the PNIPAM matrix may still contain some monomer of NIPAM, which is highly cytotoxic^{42,43}. Additionally, PNIPAM may also interact with proteins because of the presence of several amide functions in its chemical structure⁴⁴. For these reasons, it is very difficult to use them for biomedical applications, contrary to MagNanoGels based on biocompatible, water soluble, non-toxic poly(ethylene glycol) analogues⁴⁵.

Otherwise, quantifying the local temperature generated by MNPs under AMF is very important for biomedical applications. Some authors have used fluorophores as molecular thermometers for estimating the temperature at the nanometer scale^{17,46}. In our case, data from Figure 6 were used to plot the release of DOX in function of the temperature at pH 7.5 and at different times (Figure 8a). These curves were used as calibration curves for acquire a quantitative correlation between DOX release and the local temperature under AMF. When applying one or more AMF pulses, the global temperature of MagNanoGels solutions remains as initially set (37 °C) and the local temperature was estimated around 65 °C ($\Delta T = 28$ °C – Figure 8b).

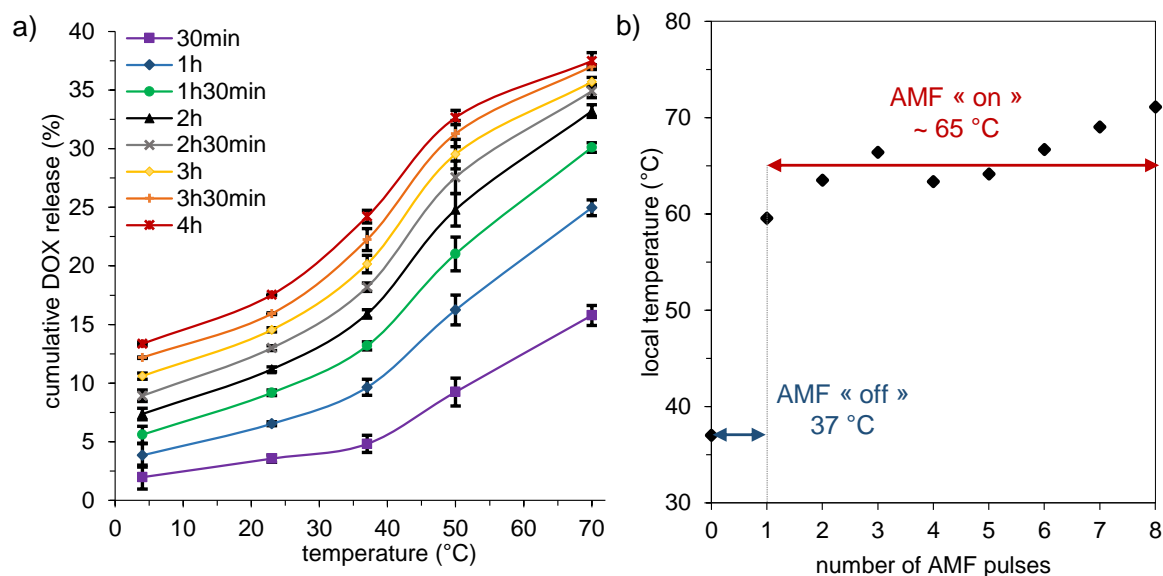


Figure 8. a) Cumulative DOX release profile (%) versus incubation temperature of DOX-MagNanoGels-37.5 wt% ($[\text{Fe}] = 8.35 \text{ mM}$) at pH 7.5 (0.1 M hepes buffer sodium) by controlling the temperature of the sample (water bath) at different times. b) Estimation of the local temperature variation near the surface of MNPs at pH 7.5 after applying different AMF pulses (335 kHz, 9 mT, 30 min).

3.6 Intracellular DOX Release

The cellular capture of MagNanoGels-37.5 wt%, DOX-MagNanoGels-37.5 wt% and free DOX, as well as the remote DOX intracellular release triggered by AMF were investigated in PC-3 cancer cells (Human Prostatic Cancer Cell lines), foreseeing future cancer therapy application.

3.6.1 Cellular Internalization and Cytotoxicity of MagNanoGels and DOX-MagNanoGels

After 2 hours incubation of the cells with the MagNanoGels, cellular iron load was measured by single-cell magnetophoresis. MagNanoGels and DOX-MagNanoGels were equally captured by PC-3 cancer cells, with an important iron load saturating with the extracellular concentration at about 15 pg of iron per cell (Figure 9a). The presence of DOX within the nanogels thus does not interfere with their cellular internalization. Remarkably, both DOX-MagNanoGels and MagNanoGels were internalized as efficiently as free nanoparticles (MNPs). Supplementary Figures S11 and S12 show the cellular localization of MagNanoGels and DOX-MagNanoGels respectively, right after incubation, 4 hours after and 24 hours after (only for DOX-MagNanoGels). For both, right after incubation, the MagNanoGels, labeled with rhodamine covalently bonded to the gels (RHO in red), were mostly found on the cell membranes (see the 3D reconstructed z-profile in Figure S11). By contrast, 4 hours after, they were clearly internalized and localized as small intracellular dots identified as endosomes (Figure S11). For DOX-MagNanoGels, the doxorubicin, encapsulated in MagNanoGels (DOX in green), and the rhodamine, covalently bonded to MagNanoGels (RHO in red), were clearly associated with the MagNanoGels (colocalized with RHO) right after incubation. It was partly delivered to the nuclei 4-hours and 24-hours after incubation, but with still a large proportion of green dots associated to the RHO-MagNanoGels (Figure S12).

The metabolic activity (Alamar Blue assay) of PC-3 cancer cells was measured 24 hours after the end of the 2 hours incubation with free DOX, MagNanoGels and DOX-MagNanoGels. For all experiments, cell samples were thermostated at 37 °C. First, MagNanoGels (without DOX) have high cell viability, proving that MagNanogels are not toxic at an iron concentration from 0.5 to 4.2 mM (Figure 9b). Second, viability was more impacted when cancer cells were incubated with DOX-MagNanoGels than with free DOX at a

concentration range of 4 – 32 μM . This demonstrates that MagNanoGels vectorize DOX intracellularly better than the molecule alone. It is confirmed by the confocal images of Figure 10, as detailed in the next paragraph.

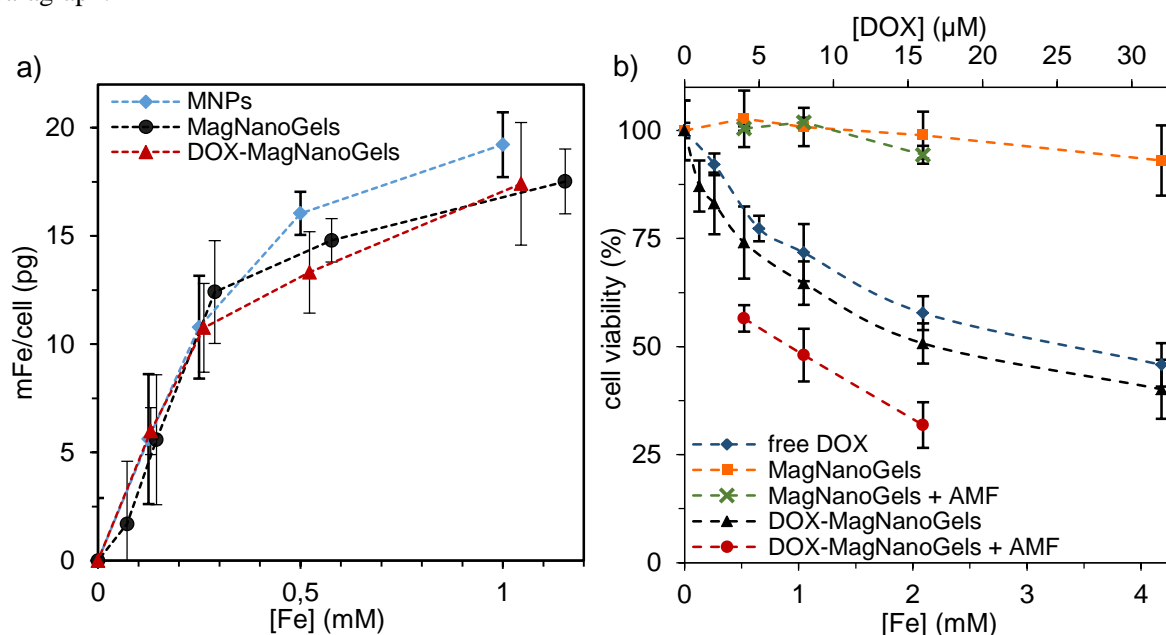


Figure 97. a) Iron load per cell after a 2-hours incubation with MagNanoGels and DOX- MagNanoGels from $[\text{Fe}] = 0.13$ to 1.2 mM, measured by single-cell magnetophoresis. b) Cell viability of PC-3 cells (normalized by control cells) incubated for 2 h with free DOX, MagNanoGels and DOX-MagNanoGels with and without AMF (AMF was applied 2 hours after the end of incubation, and for 2 hours, at 471 kHz, 18 mT; 14.4 $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$). The x-axis of iron concentration $[\text{Fe}]$ from 0.5 to 4.2 mM corresponds to an equivalent DOX concentration $[\text{DOX}]$ from 4 to 32 μM for the DOX-MagNanoGels. For MagNanoGels, only the iron concentration axis applies. For free DOX, only the DOX concentration axis applies.

3.6.2 Intracellular Remote DOX Release from MagNanoGels under AMF

Cell viability was finally assessed after 2 hours of AMF application (Figure 9b, condition DOX-MagNanoGels + AMF compared to DOX-MagNanoGels). The viability was significantly lowered after AMF stimulation. As a result, the half maximal inhibitory concentration – IC_{50} of free DOX, DOX-MagNanoGels without and with AMF were respectively 26 , 19 and 8 μM . Very importantly, during all AMF experiments, no macroscopic heating was measured. Besides, a control experiment was performed, where cells loaded with MagNanoGels without DOX were also submitted to the 2-hours AMF stimulation (Figure 9b, condition MagNanoGels + AMF). In this case, viability was not affected and was similar to the one of the control (100%). This proves that there is no cell death by simple heating, confirming the athermal conditions. Thus, cancer cell death is enhanced under AMF due to an increase of DOX release from the MagNanoGels, as on batch experiments; and the localized heating of MNPs contained into nanogels and generated under AMF is high enough to remotely trigger DOX release, but not sufficient to destroy by itself the cancer cells.

The intracellular DOX releases with and without AMF were then tracked by confocal microscopy (Figure 10). All images were taken 4 hours after the end of cells incubation (at $[\text{DOX}] = 4$ and 8 μM).

When cells were incubated with DOX-MagNanoGels (Figures 10a and 10b), some DOX localizes within the nucleus, but some remains in the cytoplasm, as small dots colocalized with the fluorescence of the RHO-MagNanoGels (linked covalently to RHO). The intracellular delivery of both DOX and RHO is higher at the incubation condition $[\text{DOX}] = 8$ μM than at $[\text{DOX}] = 4$ μM . Images of cells incubated with free DOX are also shown in Figure 10c. In this case, all the drug is found in the nucleus. Of note, the

amount of DOX provided by MagNanoGels to the cell nuclei seems slightly higher than that internalized by the free DOX.

The most striking observation concerns the nuclei DOX fluorescence in cancer cells incubated with DOX-MagNanogels and submitted to AMF (Figures 10a and 10b). It is clearly increased by the application of AMF. To quantify these effects, we next measured the average fluorescence intensity in a circular area contained within the nucleus and processed the pictures with ImageJ software (Figure 10d). First, it confirms that the fluorescence nuclear intensity of DOX is higher for the cells incubated with DOX-MagNanoGels than for those incubated with free DOX, in agreement with the higher cytotoxicity of DOX-MagNanoGels compared to free DOX. Second, it clearly demonstrates the enhanced DOX nuclear delivery triggered by AMF.

Taken together, these cell studies demonstrate that the MagNanoGels allow better delivery of DOX inside the cells, thus enhancing DOX cytotoxicity; and that AMF triggers a better release, enhancing even further cytotoxicity. These results support the possibility of initiating a chemotherapeutic treatment via an athermal magnetic hyperthermia strategy. This is particularly promising to limit the adverse effects of chemotherapy on surrounding normal tissues. Moreover, the MNPs, contained in the nanogels, would allow to visualize tumors by Magnetic Resonance Imaging (MRI), thus these magnetic nanogels could be used as a polymer-based theranostic platform for cancer therapy afterwards⁴⁷.

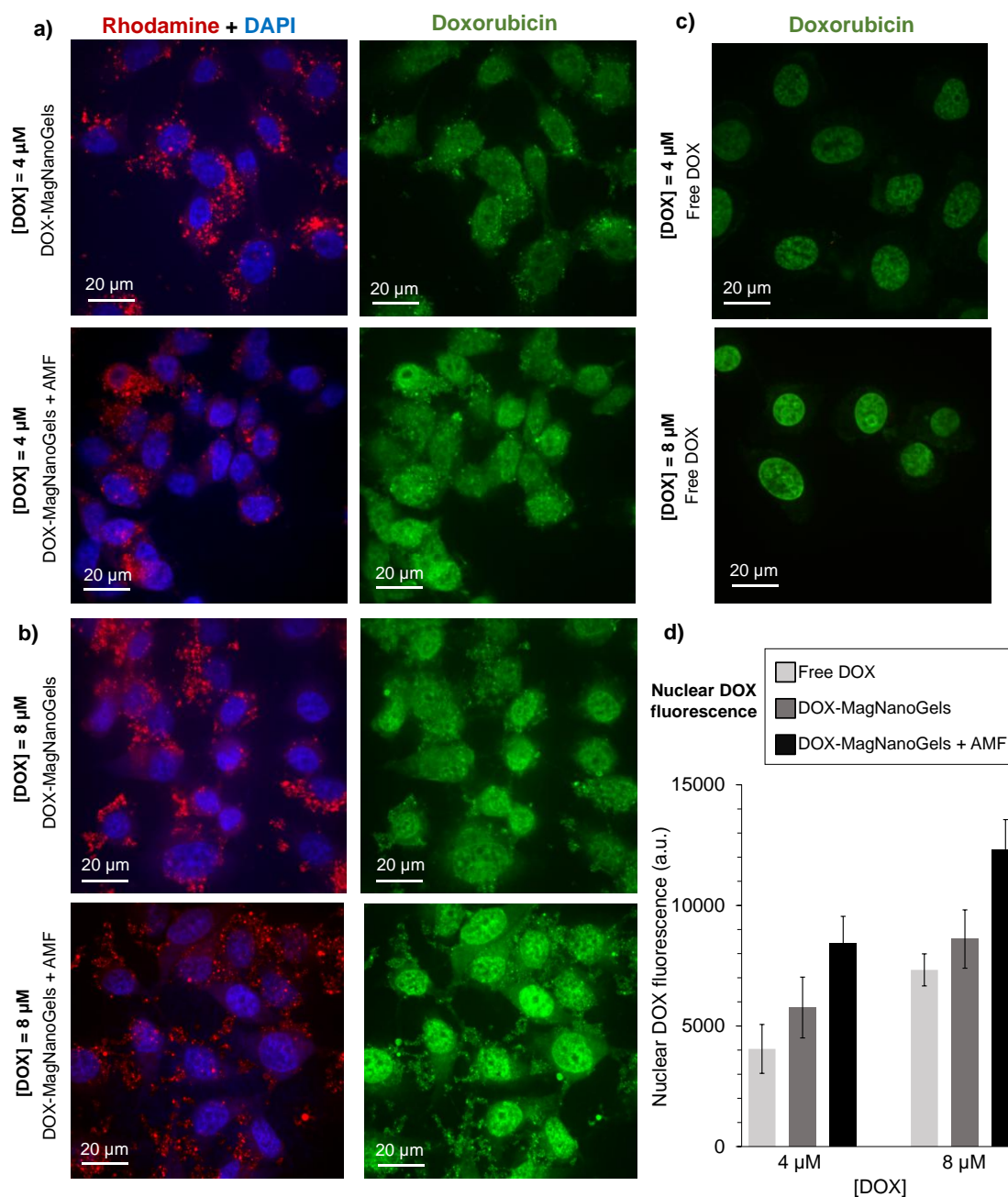


Figure 10. Confocal fluorescence imaging PC-3 cancer cells after 2 hours incubation of DOX-MagNanoGels (a, b). Incubation was performed at a) [DOX] = 4 μM or b) 8 μM. Cells were fixed 4 hours after the end of the incubation. During this 4-hours period, cells were submitted to a 2-hours cycle of AMF (condition + AMF, bottom image), or left at 37°C in the incubator (top image). For comparison, c) cells incubated for 2 hours with free DOX are also shown for the two incubation conditions: [DOX] = 4 μM and 8 μM. Fluorescence was collected in the blue channel (DAPI, excitation at 405 nm), in the red channel (Rhodamine – RHO, excitation at 561 nm) or in the green channel (Doxorubicin – DOX, excitation at 488 nm). d) For all conditions, fluorescence was quantified in the nuclear region for DOX fluorescence (green) and averaged measures are represented (n > 16, error bars represent the standard deviation).

CONCLUSIONS

In summary, biocompatible, multi-responsive magnetic nanogels were synthesized by aqueous precipitation radical co-polymerization and post-assembly with MNPs. MagNanoGels, containing 37.5 wt% of MNPs, have a high drug loading efficiency (60 %) and their swelling-deswelling transition, as well as drug release can be controlled either by internal (pH) and external (temperature, alternative magnetic field) stimuli. Indeed, the release of DOX can be enhanced by rising the temperature (17 vs. 36% at 23 and 70 °C respectively), decreasing the pH (24 vs. 96% at pH 7.5 and 5.0 respectively) and by applying AMF (24 vs. 47% without and with AMF respectively). We demonstrated that these nanogels are excellent nanocarriers for enhancing the internalization of DOX inside cancer cells and, most important, that it is possible to trigger intracellularly and remotely DOX release under AMF by “hot spot” effect, thus enhancing DOX efficiency in terms of cytotoxicity. Thus, cancer cell viability could be reduced from 51 to 32% by applying AMF to DOX-MagNanoGels inside the cells. Because AMF itself is non-toxic and can deeply penetrate into human tissues, such nanocarriers could be a promising drug delivery system strategy, which could be applied to other hydrophilic drugs. Furthermore, the presence of magnetic particles opens the possibility to combine the remotely trigger drug delivery ability with real-time imaging (MRI) and magnetic targeting for a theranostic cancer therapy strategy with a single nanocarrier.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsami.7b06553

1. NanoGels characterization: Potentiometric and conductimetric titrations of carboxylic acid units (-COOH) inside nanogels. TEM images and size distribution (DLS) of NanoGels. **2. Magnetic nanoparticles characterization:** TEM image, size distribution and magnetization curve of MNPs. **3. MagNanoGels characterization:** Thermogravimetric analysis. Temperature and diameter (TEM, cryo-TEM) measurements during AMF experiments. **4. Encapsulation and release of doxorubicin:** calibration curves of DOX absorption (485 nm) versus the DOX concentration of standard solutions. Cumulative DOX release profile (%) versus time at 25 °C, pH 7.5 without and with AMF at different frequencies (335 and 471 kHz). **5. Cells studies:** confocal microscopy images of intracellular internalization of free DOX and DOX-loaded RHO-MagNanoGels.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Email: christine.menager@upmc.fr / claire.wilhelm@univ-paris-diderot.fr

ORCID

Esther Cazares-Cortes: 0000-0002-2215-0291

Ana Espinosa : 0000-0002-5626-6129

Claire Wilhelm : 0000-0001-7024-9627

Christine Ménager : 0000-0002-4080-3508

Notes

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGMENT

TEM images were taken at IMPC (Institut des Matériaux de Paris-Centre), FR 2482. Cryo-TEM images were taken at IMPMC (Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie), at UPMC (Université Pierre et Marie Curie), Paris. We kindly thank Frédéric Gélébart for technical support with Magnetherm device and Delphine Talbot for TGA characterization.

ABBREVIATIONS

AMF, alternative magnetic field

Cryo-TEM, Cryogenic-Transmission Electronic Microscopy

CLSM, Confocal laser scanning microscopy

DDS, Drug Delivery System

DLS, dynamic light scattering

DOX, doxorubicin

IC₅₀, Half maximal inhibitory concentration

KPS, potassium persulfate

MAA, methacrylic acid

MEO₂MA, di(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (Mn = 188.22g.mol⁻¹)

MNPs, magnetic nanoparticles

NTA, nanoparticle tracking analysis

Oe, Oersted (unit of a magnetic field H)

OEGDA, poly(ethylene glycol) diacrylate (Mn = 250g.mol⁻¹)

OEGMA, poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (Mn = 500g.mol⁻¹)

PC-3, human prostate cancer cells

SLP, Specific Loss Power

SQUID, Superconducting Quantum Interference Device

TEM, Transmission Electronic Microscopy

TGA, ThermoGravimetric Analysis

VSM, Vibrating Sample Magnetometer

VPTT, Volume Phase Temperature Transition

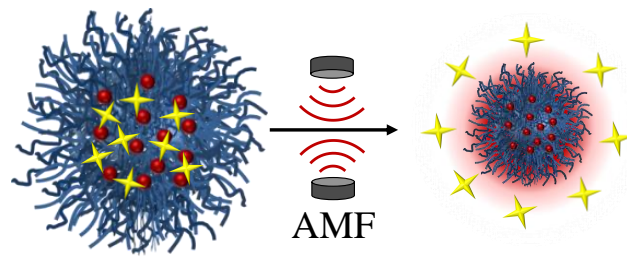
REFERENCES

- (1) Brazel, C. S. Magnetothermally-Responsive Nanomaterials: Combining Magnetic Nanostructures and Thermally-Sensitive Polymers for Triggered Drug Release. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (3), 644–656.
- (2) Luk, B. T.; Zhang, L. Current Advances in Polymer-Based Nanotheranostics for Cancer Treatment and Diagnosis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (24), 21859–21873.
- (3) Kaur, S.; Prasad, C.; Balakrishnan, B.; Banerjee, R. Trigger Responsive Polymeric Nanocarriers for Cancer Therapy. *Biomater Sci* **2015**, *3* (7), 955–987.
- (4) Bergueiro, J.; Calderón, M. Thermoresponsive Nanodevices in Biomedical Applications: Thermoresponsive Nanodevices in Biomedical Applications *Macromol. Biosci.* **2015**, *15* (2), 183–199.
- (5) Molina, M.; Asadian-Birjand, M.; Balach, J.; Bergueiro, J.; Miceli, E.; Calderón, M. Stimuli-Responsive Nanogel Composites and Their Application in Nanomedicine. *Chem Soc Rev* **2015**.
- (6) Yang, H.; Wang, Q.; Huang, S.; Xiao, A.; Li, F.; Gan, L.; Yang, X. Smart PH/Redox Dual-Responsive Nanogels for On-Demand Intracellular Anticancer Drug Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (12), 7729–7738.
- (7) Álvarez-Bautista, A.; Duarte, C. M. M.; Mendizábal, E.; Katime, I. Controlled Delivery of Drugs through Smart PH-Sensitive Nanohydrogels for Anti-Cancer Therapies: Synthesis, Drug Release and Cellular Studies. *Des. Monomers Polym.* **2016**, *19* (4), 319–329.
- (8) Li, Z.; Ye, E.; David; Lakshminarayanan, R.; Loh, X. J. Recent Advances of Using Hybrid Nanocarriers in Remotely Controlled Therapeutic Delivery. *Small* **2016**, *12* (35), 4782–4806.
- (9) Regmi, R.; Bhattarai, S. R.; Sudakar, C.; Wani, A. S.; Cunningham, R.; Vaishnava, P. P.; Naik, R.; Oupicky, D.; Lawes, G. Hyperthermia Controlled Rapid Drug Release from Thermosensitive Magnetic Microgels. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (29), 6158.
- (10) Hu, Y.; Liu, W.; Wu, F. Novel Multi-Responsive Polymer Magnetic Microgels with Folate or Methyltetrahydrofolate Ligand as Anticancer Drug Carriers. *RSC Adv.* **2017**, *7* (17), 10333–10344.
- (11) Indulekha, S.; Arunkumar, P.; Bahadur, D.; Srivastava, R. Dual Responsive Magnetic Composite Nanogels for Thermo-Chemotherapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *155*, 304–313.
- (12) Brulé, S.; Levy, M.; Wilhelm, C.; Letourneur, D.; Gazeau, F.; Ménager, C.; Le Visage, C. Doxorubicin Release Triggered by Alginate Embedded Magnetic Nanoheaters: A Combined Therapy. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (6), 787–790.
- (13) Deka, S. R.; Quarta, A.; Di Corato, R.; Riedinger, A.; Cingolani, R.; Pellegrino, T. Magnetic Nanobeads Decorated by Thermo-Responsive PNIPAM Shell as Medical Platforms for the Efficient Delivery of Doxorubicin to Tumour Cells. *Nanoscale* **2011**, *3* (2), 619–629.
- (14) Kakwere, H.; Leal, M. P.; Materia, M. E.; Curcio, A.; Guardia, P.; Niculaes, D.; Marotta, R.; Falqui, A.; Pellegrino, T. Functionalization of Strongly Interacting Magnetic Nanocubes with (Thermo)Responsive Coating and Their Application in Hyperthermia and Heat-Triggered Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (19), 10132–10145.
- (15) Sanson, C.; Diou, O.; Thévenot, J.; Ibarboure, E.; Soum, A.; Brûlet, A.; Miraux, S.; Thiaudière, E.; Tan, S.; Brisson, A.; Dupuis, V.; Sandre, O.; Lecommandoux, S. Doxorubicin Loaded Magnetic Polymersomes: Theranostic Nanocarriers for MR Imaging and Magneto-Chemotherapy. *ACS Nano* **2011**, *5* (2), 1122–1140.

- (16) Griffete, N.; Fresnais, J.; Espinosa, A.; Wilhelm, C.; Bée, A.; Ménager, C. Design of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Controlled Release of Doxorubicin under an Alternative Magnetic Field in Athermal Conditions. *Nanoscale* **2015**.
- (17) Riedinger, A.; Guardia, P.; Curcio, A.; Garcia, M. A.; Cingolani, R.; Manna, L.; Pellegrino, T. Subnanometer Local Temperature Probing and Remotely Controlled Drug Release Based on Azo-Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Lett.* **2013**, *13* (6), 2399–2406.
- (18) Guisasola, E.; Baeza, A.; Talelli, M.; Arcos, D.; Moros, M.; de la Fuente, J. M.; Vallet-Regí, M. Magnetic-Responsive Release Controlled by Hot Spot Effect. *Langmuir* **2015**, *31* (46), 12777–12782.
- (19) Hua, X.; Yang, Q.; Dong, Z.; Zhang, J.; Zhang, W.; Wang, Q.; Tan, S.; Smyth, H. D. C. Magnetically Triggered Drug Release from Nanoparticles and Its Applications in Anti-Tumor Treatment. *Drug Deliv.* **2017**, *24* (1), 511–518.
- (20) Lutz, J.-F.; Andrieu, J.; Üzgün, S.; Rudolph, C.; Agarwal, S. Biocompatible, Thermoresponsive, and Biodegradable: Simple Preparation of “All-in-One” Biorelevant Polymers. *Macromolecules* **2007**, *40* (24), 8540–8543.
- (21) Cai, T.; Marquez, M.; Hu, Z. Monodisperse Thermoresponsive Microgels of Poly(Ethylene Glycol) Analogue-Based Biopolymers. *Langmuir* **2007**, *23* (17), 8663–8666.
- (22) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470.
- (23) Hu, Z.; Cai, T.; Chi, C. Thermoresponsive Oligo(Ethylene Glycol)-Methacrylate- Based Polymers and Microgels. *Soft Matter* **2010**, *6* (10), 2115–2123.
- (24) Lutz, J.-F. Thermo-Switchable Materials Prepared Using the OEGMA-Platform. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (19), 2237–2243.
- (25) Yang, H.; Wang, Q.; Chen, W.; Zhao, Y.; Yong, T.; Gan, L.; Xu, H.; Yang, X. Hydrophilicity/Hydrophobicity Reversible and Redox-Sensitive Nanogels for Anticancer Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (5), 1636–1647.
- (26) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17* (2), 1247–1248.
- (27) Lefebvre, S.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Neveu, S.; Massart, R. Monodisperse Magnetic Nanoparticles: Preparation and Dispersion in Water and Oils. *J. Mater. Res.* **1998**, *13* (10), 2975–2981.
- (28) Boullaras, M.; Gombart, E.; Tranchant, J.-F.; Billon, L.; Save, M. Design of Smart Oligo(Ethylene Glycol)-Based Biocompatible Hybrid Microgels Loaded with Magnetic Nanoparticles. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36* (1), 79–83.
- (29) Hoare, T.; Pelton, R. Functional Group Distributions in Carboxylic Acid Containing Poly(*N*-Isopropylacrylamide) Microgels. *Langmuir* **2004**, *20* (6), 2123–2133.
- (30) Hoare, T.; Pelton, R. Titrametric Characterization of PH-Induced Phase Transitions in Functionalized Microgels. *Langmuir* **2006**, *22* (17), 7342–7350.
- (31) Bacri, J.-C.; Perzynski, R.; Salin, D.; Cabuil, V.; Massart, R. Magnetic Colloidal Properties of Ionic Ferrofluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **1986**, *62* (1), 36–46.
- (32) Borukhov, I.; Andelman, D.; Borrega, R.; Cloitre, M.; Leibler, L.; Orland, H. Polyelectrolyte Titration: Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (47), 11027–11034.
- (33) Boullaras, M.; Deniau-Lejeune, E.; Alard, V.; Tranchant, J.-F.; Billon, L.; Save, M. Dual Stimuli-Responsive Oligo(Ethylene Glycol)-Based Microgels: Insight into the Role of Internal Structure in Volume Phase Transitions and Loading of Magnetic Nanoparticles

- to Design Stable Thermoresponsive Hybrid Microgels. *Polym Chem* **2016**, 7 (2), 350–363.
- (34) Fortin, J.-P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Ménager, C.; Bacri, J.-C.; Gazeau, F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (9), 2628–2635.
- (35) Fauconnier, N.; Bée, A.; Roger, J.; Pons, J. N. Synthesis of Aqueous Magnetic Liquids by Surface Complexation of Maghemite Nanoparticles. *J. Mol. Liq.* **1999**, 83 (1–3), 233–242.
- (36) Smeets, N. M. B.; Hoare, T. Designing Responsive Microgels for Drug Delivery Applications. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2013**, 51 (14), 3027–3043.
- (37) Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. A Review of Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. *J. Controlled Release* **2008**, 126 (3), 187–204.
- (38) Janssen, M.; Crommelin, D.; Storm, G.; Hulshoff, A. Doxorubicin Decomposition on Storage. Effect of PH, Type of Buffer and Liposome Encapsulation. *Int. J. Pharm.* **1985**, 23 (1), 1–11.
- (39) Xiong, W.; Wang, W.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Chen, H.; Xu, H.; Yang, X. Dual Temperature/PH-Sensitive Drug Delivery of Poly(N-Isopropylacrylamide-Co-Acrylic Acid) Nanogels Conjugated with Doxorubicin for Potential Application in Tumor Hyperthermia Therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, 84 (2), 447–453.
- (40) Oliveira, H.; Pérez-Andrés, E.; Thevenot, J.; Sandre, O.; Berra, E.; Lecommandoux, S. Magnetic Field Triggered Drug Release from Polymersomes for Cancer Therapeutics. *J. Controlled Release* **2013**, 169 (3), 165–170.
- (41) Jaiswal, M. K.; De, M.; Chou, S. S.; Vasavada, S.; Bleher, R.; Prasad, P. V.; Bahadur, D.; Dravid, V. P. Thermoresponsive Magnetic Hydrogels as Theranostic Nanoconstructs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6 (9), 6237–6247.
- (42) Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers Poly(N-Isopropylacrylamide), Poly(N-Vinylcaprolactam) and Amphiphilically Modified Poly(N-Vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, 26 (16), 3055–3064.
- (43) Wadajkar, A. S.; Koppolu, B.; Rahimi, M.; Nguyen, K. T. Cytotoxic Evaluation of N-Isopropylacrylamide Monomers and Temperature-Sensitive Poly(N-Isopropylacrylamide) Nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2009**, 11 (6), 1375–1382.
- (44) Bianco-Peled, H.; Gryc, S. Binding of Amino Acids to “Smart” Sorbents: Where Does Hydrophobicity Come into Play? *Langmuir* **2004**, 20 (1), 169–174.
- (45) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, 46 (11), 3459–3470.
- (46) Brites, C. D. S.; Lima, P. P.; Silva, N. J. O.; Millán, A.; Amaral, V. S.; Palacio, F.; Carlos, L. D. A Luminescent Molecular Thermometer for Long-Term Absolute Temperature Measurements at the Nanoscale. *Adv. Mater.* **2010**, 22 (40), 4499–4504.
- (47) Luk, B. T.; Zhang, L. Current Advances in Polymer-Based Nanotheranostics for Cancer Treatment and Diagnosis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6 (24), 21859–21873.

Abstract Graphic



Synthèse de nanogels biocompatibles et multi-stimulables pour la libération contrôlée d'une molécule modèle par hyperthermie magnétique et photothermie

Résumé : Les nanogels hybrides constitués de polymères thermosensibles et de nanoparticules inorganiques stimulables telles que des nanoparticules magnétiques (NPMs) ou des nanobâtonnets d'or (AuNRs) sont extrêmement intéressants pour des applications biomédicales. Leur matrice en polymère permet d'encapsuler et de libérer de grandes quantités de molécules actives, alors que les nanoparticules peuvent générer de la chaleur lorsqu'elles sont exposées à un champ magnétique alternatif (AMF) pour les NPMs, et à une irradiation proche infrarouge (NIR-L) pour les AuNRs. Ce manuscrit de thèse porte sur la synthèse et la caractérisation de nanogels biocompatibles, pH- et thermosensibles, à base de monomères en oligo (éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate (OEGMAs), d'acide méthacrylique (MAA) et encapsulant des NPMs et/ou des AuNRs pour déclencher de manière contrôlée, par hyperthermie magnétique ou par photothermie, la libération d'une molécule anticancéreuse, la doxorubicine (DOX). Des nanogels hybrides magnétiques, plasmoniques et magnéto-plasmoniques ont été synthétisés. Ces nanogels ont un diamètre hydrodynamique entre 200 et 500 nm et une température de transition de phase volumique comprise entre 30 et 54 °C. Le comportement de gonflement-dégonflement des nanogels peut être induit par plusieurs stimuli (température, pH, AMF, NIR-L). Ces résultats démontrent que les MagNanoGels sont d'excellents nanovecteurs pour accroître l'internalisation cellulaire en augmentant la cytotoxicité de la DOX et qu'il est possible de déclencher à distance la libération intracellulaire de DOX sous AMF dans des conditions athermiques. Par ailleurs, les PlasMagNanoGels peuvent générer efficacement de la chaleur par photothermie pour une thérapie. En outre, les propriétés intrinsèques des NPMs, pour le ciblage magnétique et en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (MRI), font de ces nanogels des candidats idéaux pour une nouvelle approche thérapeutique (diagnostique et traitement) contre le cancer.

Mots-clés : nanogels hybrides multi-stimulables – polymères en oligo (éthylène glycol) méthyl éther méacrylates – nanoparticules magnétiques et plasmoniques – hyperthermie magnétique – photothermie – libération contrôlée de molécules – thérapie du cancer

Synthesis of biocompatible and multi-responsive nanogels for a controlled release of a model molecule by magnetic hyperthermia and photothermia

Abstract : Hybrid nanogels, composed of thermoresponsive polymers and inorganic responsive nanoparticles, such as magnetic nanoparticles (NPMs) and gold nanorods (AuNRs) are highly interesting for biomedical applications. Their polymeric matrix makes them able to uptake and release high quantities of drugs, whereas nanoparticles can generate heat when exposed to an alternating magnetic field (AMF) for NPMs, and to a near-infrared light for AuNRs. This thesis manuscript focuses on the synthesis and the characterization of biocompatible, pH- and thermoresponsive nanogels, based on oligo(ethylene glycol) monomers (OEGMAs), methacrylic acid (MAA) and encapsulating NPMs and/or AuNR for remotely triggered doxorubicin (DOX, anticancer drug) release, by magnetic hyperthermia or photothermia. Hybrid magnetic, plasmonic and magneto-plasmonic nanogels were synthesized. These nanogels have a hydrodynamic diameter between 200 and 500 nm and a volume phase transition temperature (VPTT) from 30 to 54°C. The nanogels' swelling-deswelling behavior can be induced by several stimuli (temperature, pH, AMF, NIR-L). These results demonstrate that MagNanoGels are excellent nanocarriers for enhancing cellular internalization enhancing DOX cytotoxicity and that DOX release was significantly enhanced upon exposure to AMF in athermic conditions. In addition, PlasMagNanoGels can efficiently generate heat by photothermy for radiotherapy. Therefore, the intrinsic properties of NPMs for magnetic targeting and as contrast agents for Magnetic Resonance Imaging (MRI), make these nanogels ideal candidates for a new therapeutic approach (diagnosis and treatment) against cancer.

Keywords : hybrid multiresponsive nanogels – oligo (ethylene glycol) methacrylates polymers – magnetic and plasmonic nanoparticles – magnetic hyperthermia – photothermia – remote drug release – cancer therapy