



HAL
open science

Mise en forme d'un biomatériau par auto-assemblage colloïdal : modification de surface de nanoparticules à base d'hydrogel par un copolymère à blocs thermosensible

Clemence Nadal

► To cite this version:

Clemence Nadal. Mise en forme d'un biomatériau par auto-assemblage colloïdal : modification de surface de nanoparticules à base d'hydrogel par un copolymère à blocs thermosensible. Matériaux. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30285 . tel-03769206

HAL Id: tel-03769206

<https://theses.hal.science/tel-03769206v1>

Submitted on 5 Sep 2022

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

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

**Présentée et soutenue par
Clémence NADAL**

Le 16 décembre 2021

**Mise en forme d'un biomatériau par auto-assemblage colloïdal:
Modification de surface de nanoparticules à base d'hydrogel par
un copolymère à blocs thermosensible**

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :

**CIRIMAT - Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des
Matériaux**

Thèse dirigée par

Audrey TOURRETTE et Mathias DESTARAC

Jury

Mme Yvette TRAN, Rapporteure

M. Benjamin NOTTELET, Rapporteur

M. Damien MERTZ, Examineur

Mme Maud SAVE, Examinatrice

Mme Myrtil KAHN, Examinatrice

Mme Audrey TOURRETTE-DIALLO, Directrice de thèse

M. Mathias DESTARAC, Co-directeur de thèse

Remerciements

J'ai eu la chance de partager ma thèse entre deux laboratoires toulousains, le CIRIMAT et le laboratoire des IMRCP, dont je remercie les directeurs respectifs, **M. Christophe Laurent** et **M. Christophe Mingotaud**, pour leur accueil au sein de leurs unités.

Je tiens, avant toute chose, à remercier les membres du jury ayant accepté d'évaluer mon travail de thèse. **Mme Yvette Tran** et **M. Benjamin Nottelet**, merci à vous d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit et d'avoir suscité une discussion intéressante autour de ces travaux. **Mme Myrtil Kahn**, vous m'avez fait l'honneur de présider ce jury de thèse et je vous en remercie. Je remercie également **Mme Maud Save** d'avoir examiné mes travaux.

Enfin, **M. Damien Mertz**, je te remercie d'avoir accepté de prendre part à mon jury de thèse. Tu étais également présent à mon jury de fin d'études à l'ECPM, la boucle est bouclée ! Tu m'as transmis ta passion pour la recherche dans le domaine des biomatériaux et j'espère que l'on aura l'occasion de se recroiser lors de congrès.

Je souhaite bien évidemment remercier mes encadrants de thèse, **Mme Audrey Tourrette-Diallo** et **M. Mathias Destarac**. Le projet a bien évolué pendant ces trois années en partie au gré des embuches rencontrées, mais qui se sont avérées tellement enrichissantes.

Audrey, tu m'as appris à me faire confiance et surtout à résoudre les problèmes. A chaque moment de panique où je me suis sentie submergée, tu as toujours su me recentrer sur l'essentiel pour ne pas rester bloquée ! J'ai adoré travailler avec toi et voir le projet évoluer au cours des différentes collaborations. Merci pour tes conseils et ton soutien, notamment pendant la dernière année sur la construction de mon projet professionnel après-thèse.

Mathias, merci pour ton soutien tout au long de la thèse, de mes débuts dans l'équipe P3R jusqu'aux moments de « rush » de rendu de la thèse et les soumissions d'articles. C'était un plaisir d'apprendre de toi, que ce soit d'un point de vue RAFT et polymérisation mais aussi sur la rédaction d'articles, la rigueur scientifique et j'en passe !

Olivier, j'ai énormément appris de nos échanges, qu'ils aient été au laboratoire lorsque tu m'as initiée à la RAFT ou sur mes résultats parfois surprenants de SEC ou RMN. Merci pour cela et de manière générale pour tous tes conseils au long de ma thèse.

Jean-Daniel, nous avons travaillé ensemble sur un nouveau casse-tête de copolymère cationique thermosensible et cela a été parfois laborieux. Grâce à cela et grâce à ton encadrement sur cette

partie j'ai découvert la physico-chimie des copolymères à blocs. Merci à toi et ta bonne humeur à chacune de nos réunions « article ».

Jérémy, nous avons fait appel à ton expertise sur les nanoparticules au début de ma troisième année et je suis très heureuse que tu nous aies rejoint dans le projet. Merci pour ton implication et pour nos échanges où chacune de tes remarques a été précieuse.

Avant de remercier mes collègues de laboratoire, j'aimerais adresser un petit mot à des acteurs extérieurs dont l'aide a été précieuse. Ainsi, je tiens à remercier **Roland Ramsch** et **Serife Korkmaz** de l'entreprise Formulaction à Toulouse pour m'y avoir accueillie et pour leur aide dans la compréhension de mes suspensions thermosensibles, chose qui n'était pas gagnée d'avance... De même, je remercie **Benoit Maxit** de Cordouan Technologies à Bordeaux pour avoir réalisé les mesures des RMN Bas champ sur ces mêmes échantillons capricieux et pour son aide dans l'interprétation de ces résultats. Je remercie également l'ensemble du personnel de la plateforme d'imagerie du CMEAB, **Marc Vedrenne** de l'ICT pour sa patience et sa gentillesse lors de nos discussions RMN et enfin merci à **Pierre Roblin** pour les mesures de SAXS. Pour terminer, je remercie **Cathy Fenouillet** de la Fonderephar pour m'avoir prêtée la sonde à ultrasons qui m'a permis de gagner, ou plutôt de ne pas perdre, un temps précieux pendant ma dernière année.

Aux IMRCP, je remercie toutes les personnes qui ont rendu le quotidien au labo si sympathique. C'était d'ailleurs un tel plaisir d'être parmi vous que je suis restée 1 an et demi de plus que prévu ! Merci à **Stéphane** et **Christophe** pour la DLS, **Charles-Louis** pour la spectroscopie, **Pascale** pour la SEC, **Barbara** pour ton aide avec les données de SAXS. Merci à toute l'équipe P3R, **Mathias**, **Olivier**, **Stéphane**, **Simon**, **Marc**, **Marie** et tous les docs/postdocs/stagiaires rencontrés au cours de ces trois belles années. **Juliette**, merci d'avoir suivi ma thèse en tant que marraine et pour tes conseils lors de nos rencontres.

Merci à la team Upsi/tarot du midi, **Camille**, **Marjorie**, **Sara**, **Judith**, **Alexis**, **Sasha**, c'était un plaisir de partager ces moments avec vous ! Enfin, à mes chères collègues de bureau et amies **Hai Yen**, **Barbara** et **Lucie**, je suis tellement contente de vous avoir rencontrées et ma thèse aurait été si différente sans vous ! **Hai Yen**, tu es d'une gentillesse et bienveillance à toute épreuve et je te souhaite tout le meilleur dans ta carrière où tu brilles déjà j'en suis certaine. **Barbara**, je ne sais pas par où commencer... je nous revois avec nos pauses café et chocolat, nos galères de polymérisation et toutes nos discussions souvent liées à la cuisine pour être honnête !! Tu es une personne incroyablement attachante et je suis fière d'être ton amie !

Lucie, sur le côté pro tu m'as été d'une aide précieuse pendant la thèse et je te remercie pour ta bonne humeur au quotidien qui est contagieuse tellement tu as la banane ! Sur un plan plus perso, merci d'avoir été là pendant les coups de mou de la thèse, j'ai adoré toutes nos discussions et c'était un plaisir de venir au labo en sachant que tu y serais.

J'aimerais maintenant remercier le personnel du CIRIMAT que j'ai côtoyé, que ce soit à l'UPS, à l'ENSIACET ou à la fac de pharmacie.

Au CIRIMAT UPS, merci à **Mohammed** pour ton aide et ta disponibilité avec l'ATG et le lyophilisateur qui m'ont sauvée pour ma dernière année ; merci également à **Marie-Claire** pour le BET. Merci à ma promo de thèse, les 1A, **Edouard, Julien, Ariane, Mélanie, Marco, Juliette, Guillaume** ; nos thèses ont été un succès à l'image du FIESTA !

A l'ENSIACET je remercie la team PPB Labège, et notamment **Christophe, David, Ghislaine, Christèle, Jérémy**. Aux doctorants, **Camille, Marine, Maximilien, Prescillia, Ambra, Marion** merci pour les moments partagés ensemble. On retiendra notamment une belle victoire au club oeno !

Passons maintenant à la team Pharma, **Audrey, Sandrine, Fabien, Christelle, Sophie G. et Sophie C.**, ce fut un grand plaisir de passer ces 3 années à vos côtés dans notre merveilleuse coque B. J'ai adoré découvrir l'enseignement de la galénique avec vous, promis je n'oublierai pas qu'un cachet ça n'existe pas (enfin, plus !) et que le suppo glycérine peut rester collé au plafond. J'ai adoré nos repas d'équipe, nos pique-niques, galettes et raclettes dans la cuisine et je garde de précieux souvenirs avec chacun d'entre vous ! Mention spéciale pour **Sandrine**, en attendant ta dédicace personnalisée, je te remercie déjà pour touuuuute ton aide pendant ma thèse, de la rhéo (no comment) aux conseils skincare dès que j'ai dépassé mes 25 ans... Tu es indispensable à la vie de l'équipe pharma sur tellement d'aspects et c'était un grand bonheur de travailler avec toi.

La vie en pharma a été particulièrement belle dans ce cher bureau - sans fenêtre mais parfaitement décoré - grâce aux personnes qui l'ont partagé. **Andrea**, ta carte de France revisitée est gravée dans ma mémoire ainsi que ta recette de pasta and tuna.. C'était un plaisir de t'accueillir dans l'équipe. **Fahd**.... Nos séances photos, nos fou-rires et karaokés de 17h me manquent ... Merci infiniment pour ton soutien et ton amitié ! **Laure**, tu es en apparence douce et discrète mais j'ai adoré découvrir ton côté malicieux au cours de nos sorties toulousaines ! Dire qu'on est quasiment cousines avec nos familles mi-Lorraines/mi-auvergnates.. Bon courage pour ta dernière année qui commence.

Simon, t'as coaché à distance ma rédac grâce à nos longues séries de vocaux sur les définitions d'ingénierie tissulaire et de biomatériaux, et t'as incroyablement contribué au succès de mon entretien pour ce postdoc (#mécanobiologie), merci ! C'était un plaisir de te rencontrer à Toulouse et de te rejoindre à Londres, j'ai hâte qu'on publie dans Nature ou Science nos collaborations (most likely sur la cuisson de l'œuf poché ou la sauce hollandaise though).

Pour terminer, j'en arrive au Bureau des légendes tel que je l'ai découvert le 1^{er} octobre 2018, **Clémentine, Thibault** et **Maylis**. Merci à tous les 3 de m'avoir si bien accueillie dès le premier

jour, je me suis très vite sentie comme à la maison avec vous et ça fait toute la différence sur un début de thèse ! **Thibault**, tu as sans aucun doute élevé la qualité des blagues dans le bureau à un niveau inégalable.... Mais surtout, j'ai adoré nos conversations « sans filtre » qu'on a su commencer en un regard explicite ! Au fait, on part où en vacances la prochaine fois ? **Maylis**, toutes les deux on a créé la team Biopol et on a défendu nos couleurs à travers la France (à la Grande-Motte, ok). Ta thèse a été un exemple de persévérance et tu m'impressionnes pour ton dynamisme et ta motivation à toute épreuve. Merci aussi de m'avoir partagé ton amour pour Toulouse et fait découvrir toutes ces belles adresses. **Clem**, je nous revois dans le bureau, toi en train d'essayer de rédiger et moi entrain de lutter pour ne pas te parler et te distraire... Déso !! Mais ces conversations ont souvent été riches en émotions ou en révélations... Merci pour tout, des conseils botaniques improbables à ton écoute toujours bienveillante.

Ces trois années de thèse ont été riches en émotions sur plein d'aspects et je tiens à remercier mes amies et amis. Merci à **Mickaël** et **Gwen** pour nos weekends retrouvailles qu'ils aient été à Toulouse, Poitiers ou Clermont !

Merci à la team Canaille/Soirée foot/PDL/Jeux, **Julien, Andreas, Vignesh**. pour tous ces bons moments passés avec vous, j'en garde de précieux souvenirs !

Maëlle, c'était un plaisir d'assister à ta soutenance et je te remercie d'être venue à la mienne. On a bien évolué (#pokémon) depuis nos stages de M2 et je retiens tellement de belles choses de notre amitié depuis le début de l'ECPM. **Camille**, on s'est suivies littéralement depuis le début. Voisines de stage d'anglais à l'ECPM, on se retrouve en thèse dans le même labo - puis dans la même team post-covid ;) - on aurait difficilement pu prévoir cela et c'était un grand plaisir. Je t'attends pour ton prochain séjour à Londres car il nous reste un certain nombre de brunchs à tester !

Enfin, merci à **Alexia** et **Charlotte** pour votre amitié depuis le lycée malgré la distance et nos retrouvailles pas assez fréquentes mais tellement réconfortantes à chaque fois. Merci d'avoir assisté à ma soutenance également.

Je tiens à remercier **ma famille** pour votre soutien pendant ces 8 années d'études de Clermont à Toulouse. Je vous ai fait voyager en France et maintenant à l'étranger !

Enfin, **Edouard**, on s'est suivis de Strasbourg à Toulouse, en passant par l'Irlande, puis l'Irlande (encore), puis le Canada (ah non). Je suis fière de ce qu'on a accompli et de ce qu'on a pu s'apporter pendant ces 6 années.

Table des matières

Liste des abréviations.....	1
Introduction générale.....	5
Contexte bibliographique.....	7
Partie 1: Synthèse et caractérisation physico-chimique d'un copolymère à blocs pH- et thermosensible.....	21
P1 – Chapitre 1 : Etat de l'art sur la synthèse et caractérisation de copolymères à blocs double-hydrophiles pH- et thermosensibles	25
1. La PRDR au service de l'ingénierie macromoléculaire.....	25
2. Synthèse de copolymères à blocs par RAFT.....	27
3. Physico-chimie des copolymères à blocs double-hydrophiles en milieu aqueux	33
4. Stratégie de la Partie 1	38
P1 – Chapitre 2 : Synthèse des copolymères à blocs PVAm_m-<i>b</i>-PNIPAM_n	41
1. Stratégie de synthèse	41
2. Synthèse du macro-agent de transfert PVPI _m -X.....	42
3. Synthèse par polymérisation RAFT/MADIX des diblocs PVPI _m - <i>b</i> -PNIPAM _n -X.....	44
4. Synthèse des diblocs PVAm _m - <i>b</i> -P(NIPAM- <i>stat</i> -NVC) _n -X.....	55
5. Purification des diblocs.....	56
6. Conclusion	57
P1 – Chapitre 3 : Caractérisation physico-chimique des copolymères PVAm_m-<i>b</i>-PNIPAM_n en milieu aqueux.....	59
1. Objectif.....	59
2. Propriétés physico-chimiques des homopolymères	59
3. Propriétés physico-chimiques des copolymères	60
4. Propriétés d'auto-assemblage des copolymères	77
5. Conclusion de l'étude physico-chimique des diblocs PVAm _m -PNIPAM _n	85
P1 – Chapitre 4 : Matériel et méthodes	87
1. Réactifs et matériel	87
2. Synthèse des copolymères PVAm _m - <i>b</i> -PNIPAM _n	87
3. Etude physicochimique des copolymères PVAm _m - <i>b</i> -PNIPAM _n	91
Annexes de la Partie 1	95
Références.....	105

Partie 2 : Mise en forme et modification de surface de nanoparticules à base d'hydrogel.....	111
Introduction.....	115
1. Généralités sur les polysaccharides	115
2. NPs composites cœur-couronne à base de polysaccharides	119
3. Stratégie de la Partie 2	122
P2 – Chapitre 1: Mise en forme de nanoparticules à base d'hydrogel	125
1. Introduction.....	125
2. Caractérisation des polysaccharides	125
3. Mise en forme des nanoparticules cœur/couronne à base de polysaccharides	131
4. Conclusion	147
P2- Chapitre 2 : Modification de surface des nanoparticules coeur-couronne et mise en évidence des propriétés thermosensibles	149
1. Introduction.....	149
2. Stratégie de modification de surface	150
3. Modification de surface des SiNP@CS/ALG et caractérisation du greffage	159
4. Mise en évidence des propriétés thermosensibles.....	172
5. Conclusion	180
P2- Chapitre 3 : Matériel et méthodes	183
1. Réactifs et matériel	183
2. Caractérisation des polysaccharides	183
3. Mise en forme des nanoparticules SiNP@CS/ALG	185
4. Modification chimique de surface des nanoparticules SiNP@CS/ALG.....	186
5. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules	187
Annexes de la partie 2	191
Références	201
Discussion générale.....	211
Conclusion et perspectives.....	215

Liste des abréviations

AIBN	Azobisisobutyronitrile	DOSY	<i>Diffusion Ordered NMR Spectroscopy</i>
ALG	Alginate	DP_n	Degré de polymérisation en nombre
ATG	Analyses thermogravimétriques	DSC	<i>Differential Scanning calorimetry</i>
ATRP	<i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>	EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
CB	copolymères à blocs	HA	Acide hyaluronique
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole	Hep	Héparine
CTA	<i>chain transfer agent</i> , agents de transfert de chaîne	HRMAS	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>
CS	Chitosane	IRTF	Infrarouge à Transformée de Fourier
DCR	<i>Derived Count Rate</i>	LbL	<i>Layer-by-Layer</i>
DDA	Degré de déacétylation	LCST	<i>Lower Critical Solution Temperature</i>
D_h	Diamètre hydrodynamique	LPO	Peroxyde de dilauroyle
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>	MADIX	<i>MACromolecular Design by Interchange of Xanthates</i>
DMF	N-N-diméthylformamide	MALS	<i>Multi-angle light scattering</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde	MET	Microscopie électronique à transmission
dn/dc	Incrément d'indice de réfraction	M_n	masse molaire moyenne en nombre

Mv	masse molaire moyenne viscosimétrique	PRDR	Polymérisation radicalaire par désactivation réversible
NagG	Nombre d'agrégation	PVAm	Poly(vinyl amine)
NHS	N-hydroxysuccinimide	PVCL	Poly(vinyl caprolactame)
NIPAM	N-isopropylacrylamide	PVPI	Poly(vinyl phtalimide)
NPs	Nanoparticules	pSac	Polysaccharides
NVCL	N-vinyl caprolactame	RAFT	Reversible Addition Fragmentation Transfer
NVC	N-vinyl carbazole	RI	Refractive index, indice de réfraction
NVF	N-vinyl formamide	RMN	Résonance magnétique nucléaire
NVPI	N-vinyl phtalimide	SAXS	Small-angle X-ray scattering
PDI	Polydispersity index	SEC	Steric exclusion chromatography
PEC	Complexes polyélectrolytes	(M)SINPs	Nanoparticules de silice (mésoporeuses)
PEG	Poly(éthylène glycol)	T_c	Température de point de trouble
PLA	Acide polylactique	TEOS	Tétraéthylorthosilicate
PLGA	Acide poly(lactique-co-glycolique)	TSI	Turbiscan Stability Index
PNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamide)	XPS	X-ray photoelectron spectroscopy

Introduction générale

Les progrès réalisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire sont intimement liés à la conception de nouveaux biomatériaux répondant à des cahiers des charges spécifiques. Dans un contexte de médecine régénérative, où les biomatériaux sont souvent implantés ou injectés chez les patients, les biomatériaux à base de particules colloïdales sont très prometteurs.¹ En effet, ils ont des propriétés modulables, notamment par leur mise en forme, et sont particulièrement utiles dans les applications de médecine régénérative. En effet, ils présentent une surface spécifique élevée, ils permettent l'incorporation et la libération de molécules bioactives, et présentent une capacité à s'auto-assembler (éventuellement *in situ*) pour former des matériaux aux propriétés mécaniques, rhéologiques, physico-chimiques variées et contrôlables. De plus, ils peuvent être injectés dans un espace ou un défaut du tissu de taille irrégulière et remplir l'espace disponible pour une régénération maximale. Au contraire, les matériaux tridimensionnels doivent souvent être adaptés aux bonnes dimensions sans un contact interfacial optimal avec le tissu.^{2,3} Les systèmes qui gélifient *in situ* sont particulièrement intéressants car ils peuvent être introduits sous forme liquide par une procédure mini-invasive, et s'adaptent également parfaitement au défaut à réparer avant gélification.⁴ L'auto-assemblage de ces systèmes se produit généralement par le biais d'interactions physico-chimiques (i.e électrostatiques, de van der Waals ou hydrophobes), entre particules colloïdales ou entre les particules et le milieu dispersant, qui conduisent à leur floculation et à la formation d'une structure de réseau tridimensionnelle.

Cette étude porte sur la mise en forme d'un biomatériau par auto-assemblage colloïdal. L'objectif est de modifier la surface de nanoparticules afin de contrôler les interactions interparticulaires en fonction de la température. En effet, un système dans lequel les particules seraient stabilisées à température ambiante pourrait être facilement injecté. Une fois la température corporelle atteinte, des interactions de type hydrophobes permettraient une déstabilisation du système, entraînant une floculation des particules, et dans certains cas, une gélification *in-situ* du biomatériau.

Dans un premier temps, un **état de l'art** sur l'auto-assemblage colloïdal de particules d'hydrogel est réalisé et amène à la **stratégie** de ce projet. Les résultats présentés dans ce manuscrit sont articulés en deux parties.

La **Partie 1** de ce travail porte sur la synthèse et la caractérisation physico-chimique d'un copolymère à blocs pH- et thermosensible. Elle est divisée en 4 chapitres : le Chapitre 1 établit le contexte bibliographique de la synthèse et la caractérisation de copolymères stimuli-sensibles, les Chapitres 2 et 3 portent sur les résultats respectifs concernant la synthèse et la caractérisation du copolymère d'intérêt. Enfin le Chapitre 4 présente les méthodes et procédés utilisés dans les

chapitres précédents.

La **Partie 2** de ce manuscrit s'attache à décrire la mise en forme des nanoparticules à base d'hydrogels ainsi que leur modification de surface avec le copolymère thermorépondant. Elle s'organise également en 3 chapitres qui suivent une introduction bibliographique sur la mise en forme de particules à base de polysaccharides. Le Chapitre 1 porte sur les résultats expérimentaux concernant la mise en forme de particules à base de polysaccharides. Le Chapitre 2 décrit la modification de surface de ces particules avec le copolymère étudié dans la Partie 1 et l'étude des propriétés thermosensibles des biomatériaux ainsi formés. Enfin le Chapitre 3 présente les méthodes et procédés utilisés dans les chapitres précédents.

Enfin, une **discussion générale** permet de relier les Parties 1 et 2 afin de mettre en avant les principaux résultats obtenus dans ce projet, d'apporter une **conclusion**, et de discuter les **perspectives**.

Contexte bibliographique

I. Ingénierie tissulaire et biomatériaux

La médecine régénérative, considérée aujourd'hui comme la médecine du futur, consiste à reconstruire des tissus endommagés, plutôt que de les retirer et de les remplacer par des transplantations ou implants comme c'est le cas jusqu'à aujourd'hui. Une des solutions pour la reconstruction de tissus, ces derniers étant définis comme un assemblage de cellules ayant une même fonction, est **l'ingénierie tissulaire**. L'ingénierie tissulaire est une science interdisciplinaire qui s'appuie notamment sur la biologie cellulaire, la science des biomatériaux, l'ingénierie biomédicale, etc, dans le but de créer ou reconstruire des tissus vivants et fonctionnels. Pour cela, des **biomatériaux** sont très souvent utilisés, en combinaison avec des cellules et/ou des molécules bioactives. Les biomatériaux sont définis en 1986 par la Société Européenne des Biomateriaux comme « matériau non-vivant utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques ». Le développement du biomatériau est particulièrement critique car celui-ci doit répondre à un cahier des charges défini en fonction du type de tissu concerné. Tous types de matériaux peuvent être utilisés, qu'ils soient naturels, synthétiques ou hydrides, biodégradables ou non.

Les **hydrogels** sont l'une des familles de biomatériaux qui sont utilisés en ingénierie tissulaire pour de nombreuses applications. Ces réseaux tridimensionnels hydratés et solides sont utilisés pour la reconstruction de tous types de tissus, des tissus osseux aux tissus nerveux.⁵⁻⁸ Ils sont facilement modifiables chimiquement et ont des propriétés mécaniques qui peuvent être comparables à celles de l'environnement dans lequel ils sont implantés. Parmi les hydrogels, les plus étudiés pour la médecine régénérative sont les hydrogels injectables et les hydrogels macroporeux.⁹

Ces derniers sont des matrices tridimensionnelles, sous forme de mousses, qui présentent une grande porosité (> 50 µm) interconnectée, ce qui est particulièrement intéressant pour la recolonisation du matériau par les cellules.¹⁰ Elles nécessitent cependant une implantation chirurgicale qui peut être associée à des risques d'infections post-opératoires ainsi qu'à des temps et coûts d'hospitalisation plus importants.

Au contraire, les **hydrogels injectables** sont bien moins invasifs car ils sont suffisamment fluides pour être injectés par voie parentérale et forment un réseau 3D une fois dans le corps.^{4,11,12} Les mécanismes de gélification peuvent être chimiques ou physiques.¹³ Les gels chimiques sont réticulés par des liaisons covalentes, alors que les gels physiques résultent de l'association des

polymères entre eux par des liaisons non-covalentes comme des liaisons hydrogène, ioniques, hydrophobes, etc. La gélification peut être induite par l'injection en elle-même, c'est notamment le cas des hydrogels rhéofluidifiants qui gélifient lorsque le cisaillement de l'injection s'interrompt,¹⁴ ou en réponse à l'environnement, dans ce dernier cas on parle d'hydrogels injectables stimuli-répondants.¹⁵⁻¹⁷

Les hydrogels formés *in-situ* gélifient en réponse au milieu dans lequel ils sont injectés ; ils passent donc d'une forme liquide avant injection à une forme gélifiée sur le site d'injection. La littérature décrit très souvent des mécanismes physiques de gélification *in-situ*, notamment en réponse aux stimuli que sont la température et le pH.^{18,19} Les hydrogels injectables stimuli-répondants peuvent avoir diverses compositions, on distinguera dans cette étude les systèmes polymères des systèmes particulaires. Les systèmes polymères, comme leur nom l'indique, sont composés de polymères qui sont stimuli-répondants,²⁰ soit intrinsèquement comme les polyélectrolytes,^{21,22} soit grâce à des modifications chimiques.²³⁻²⁵ Ces systèmes ne seront pas détaillés ici, contrairement aux systèmes particulaires qui sont au cœur de cette étude.

II. Systèmes particulaires stimuli-répondants

1. Hydrogels composites et hydrogels colloïdaux

Les systèmes particulaires injectables stimuli-répondants se présentent sous la forme de suspensions colloïdales qui, après injection, vont former un réseau tridimensionnel gélifié en réponse à un stimulus et par des interactions de natures diverses.²⁶⁻²⁸ Roux *et al.* ont décrit ces assemblages de particules en 2013 et ont distingué deux types d'assemblages comme représenté sur la Figure 1:¹

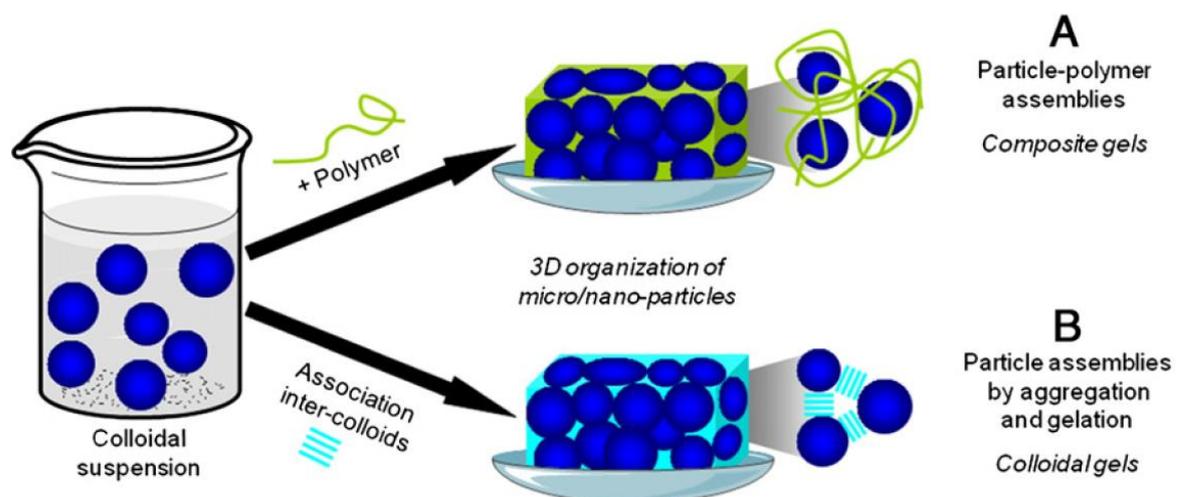


Figure 1 : Représentation schématique des différents types d'assemblages de particules dont font partie les gels composites (A) et les gels colloïdaux (B). Reproduit de Roux *et al.*¹

Les **gels composites** (Figure 1a) sont des assemblages de particules dans un réseau de polymère. Le mécanisme de gélification d'un système composite peut être lié soit à des interactions physiques ou à l'emprisonnement des particules au sein de la matrice polymère. En se basant sur cette dernière approche, Holland *et al.* ont notamment encapsulé des microparticules de gélatine au sein d'une matrice de poly(éthylène glycol) (PEG).²⁹ Avant injection, les particules sont en suspension avec des oligo-PEG, puis après injection, les chaînes PEG sont réticulées pour constituer un réseau de chaînes emprisonnant les particules. Sur le même principe de réticulation chimique de la matrice, Hong *et al.* ont mis au point un système composite à base de microparticules d'acide polylactique (PLA) recouvertes de collagène, dans une matrice de chitosane.³⁰ A l'état initial, le précurseur d'hydrogel à base de chitosane modifié est mélangé aux particules et à l'agent de réticulation (couple redox). La réticulation a lieu après injection du mélange polymère/particules au sein d'un moule à 37 °C.

L'encapsulation de particules au sein d'une matrice de polymère n'est pas toujours liée à la réticulation chimique de la matrice. En effet, les polymères comme l'agarose ou encore la gélatine, qui sont liquides lorsqu'ils sont chauffés et se solidifient lors du retour à température ambiante, peuvent également permettre l'encapsulation de particules. Cette stratégie a été utilisée par Wang *et al.* sur leur système composé de microsphères de gélatine-*g*-gellane incorporées dans une matrice d'agarose.³¹

Dans le cas des exemples précédents, la gélification est directement liée à un changement d'état de la matrice polymère qui entoure les particules, celles-ci étant passivement intégrées à ce réseau. D'autres systèmes sont basés sur une gélification dans laquelle les particules jouent activement un rôle. C'est le cas dans l'étude de Arimura *et al.* qui utilise les interactions électrostatiques entre des microsphères d'acide polylactique terminées -NH₂ (donc cationique) et les chaînes d'acide hyaluronique (polyanion) pour former des complexes polyioniques.³² Ce système pH-sensible basé sur les interactions électrostatiques de ses constituants a l'avantage de ne nécessiter aucune réticulation chimique.

Les **hydrogels colloïdaux** (Figure 1b) sont constitués uniquement de particules qui s'assemblent pour former un réseau tridimensionnel. Il est important de comprendre et de définir les forces qui s'exercent dans un système particulière avant de s'intéresser aux différents assemblages qui peuvent résulter de ces forces.

2. Interactions interparticulaires

Les assemblages de particules en agrégats ou réseaux tridimensionnels sont la conséquence d'une réorganisation des particules par des interactions entre elles. Ces interactions sont directement liées à leur surface et aux forces qui s'exercent entre elles.

1. *Forces de surfaces à l'origine des interactions interparticulaires*

Les forces de surfaces ont été classifiées par Israelachvili et se caractérisent ainsi :³³

- Les forces de van der Waals : ces forces sont la résultante de plusieurs interactions entre des dipôles induits et permanents (forces de Debye, London et Keesom). Elles sont faibles mais omniprésentes et principalement attractives.
- Les forces électrostatiques : elles interviennent entre des corps chargés avec une longue portée, appelée longueur de Debye, qui dépend de la force ionique du milieu considéré. Les forces électrostatiques sont répulsives entre des objets de charges identiques, et attractives pour des objets de charges opposées. L'étude des forces électrostatiques a conduit à la théorie de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) qui décrit que la force totale d'interaction entre des particules est la somme des forces attractives de van der Waals et des forces répulsives électrostatiques.
- Les forces de solvation : dans le cas de l'eau, les forces d'hydratation jouent sur l'organisation des molécules d'eau au contact d'une surface. Elles incluent les interactions hydrophobes et les interactions de déplétion.
 Les interactions hydrophobes sont des interactions attractives entre des molécules ou surfaces hydrophobes dans l'eau. Leur force motrice est entropique. En effet, lorsque les entités hydrophobes se rapprochent, elles expulsent l'eau qui les solvate vers l'extérieur. Cette déstructuration du réseau de molécule d'eau se traduit par une augmentation de l'entropie, ce qui est favorable à l'équilibre thermodynamique du système. Les interactions de déplétion sont des interactions attractives entre particules colloïdales en présence de petits objets (plus petites particules, macromolécules en solution, micelles). En effet, lorsque deux particules colloïdales se rapprochent, elles excluent les petites particules entre elles. Ainsi, les petites particules exercent une pression à la surface des grosses, sauf dans ce volume où elles sont exclues. Ce déséquilibre de pression osmotique entraîne une attraction entre les particules colloïdales.
- Les forces entropiques : elles sont typiquement d'origine stérique. Les interactions stériques entre particules résultent de l'adsorption à leur surface de polymères. Un polymère s'adsorbe généralement de manière irréversible. En effet, le polymère crée un grand nombre de liens avec la surface, chacun de ces liens étant une énergie d'interaction. Pour désorber le polymère, il faudrait rompre toutes ces interactions en même temps ce qui est hautement improbable. En revanche, les polymères adsorbés peuvent s'échanger avec les polymères en solution. Lorsque deux particules recouvertes d'une couche de

polymère se rapprochent, les couches adsorbées s'interpénètrent. La concentration locale en « monomère » augmente, entraînant une répulsion des particules (si le polymère est en bon solvant).

En résumé, les forces électrostatiques et stériques sont de nature répulsives alors que les interactions de van der Waals et les forces de solvatation sont attractives. Ces forces, auxquelles s'ajoutent d'autres facteurs comme la concentration, la viscosité du milieu, ou encore la gravité, sont à l'origine de la stabilité colloïdale, et peuvent être responsables de différents types de d'interactions interparticulaires.³⁴

2. Interactions interparticulaires

Les colloïdes peuvent subir, entre autres, des mécanismes d'agrégation ou de coalescence. L'agrégation est le terme général qui englobe la floculation, c'est-à-dire l'agrégation réversible de particules, et la coagulation, qui est l'agrégation irréversible de particules. La coalescence diffère de l'agrégation puisque les particules perdent leur individualité en fusionnant.

La gélification est la déstabilisation contrôlée d'une suspension colloïdale qui résulte en la formation d'un réseau tridimensionnel de particules.³⁵ La frontière entre la gélification et l'agrégation est parfois floue. Lors d'une gélification, on s'attend à ce que le gel forme un réseau qui comble le volume dans lequel il se trouve et qui ne subisse pas de précipitation, contrairement aux agrégats qui, en fonction de leur taille, peuvent être affectés par la gravité. La capacité d'un système à gélifier plutôt qu'à s'agréger est contrôlée par de nombreux paramètres, dont la concentration en particules, leur nature chimique et leur taille.³⁵ Enfin, ces mécanismes d'interactions interparticulaires, qu'ils soient réversibles ou non, peuvent être induits par un stimulus.^{36,37}

3. Systèmes stimuli-répondants

1. Systèmes avec deux types de particules

Parmi les systèmes à deux types de particules stimuli-répondants, l'exemple le plus couramment décrit dans la littérature est celui des hydrogels colloïdaux à base de nanoparticules de charges opposées. Des particules de PLA de charges de surface positives et négatives ont été mises au point à partir de PLA fonctionnalisés en bout de chaînes par des peptides porteurs de fonctions amines et acides carboxyliques respectivement.³⁸ Le mélange de ces particules dans un milieu salin provoque immédiatement leur agrégation et la formation d'une matrice de complexes polyioniques.

Un système similaire a été mis au point par Van Tomme *et al.* à partir de dextrane modifié de manière à être porteur de charges positives (ammoniums) ou négatives (carboxylates).³⁹ Leur

étude a montré qu'un mélange en proportions volumiques égales de suspensions à 15%_m en particules gélifie instantanément. Par ailleurs, ce gel colloïdal est rhéofluidifiant et peut s'écouler sous une contrainte de cisaillement comme l'injection. Ce type de gel colloïdal bicomposant et rhéofluidifiant a également été obtenu par Wang *et al.* à partir de nanoparticules d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) modifiées avec une polyamine ou un polyacide (Figure 2).⁴⁰

Ces gels colloïdaux ont été formulés pour obtenir différents niveaux de cohésion ; des matrices tridimensionnelles et manipulables de l'ordre du centimètre ont ainsi été obtenues. L'un des inconvénients de ces systèmes bicomposants est qu'ils nécessitent la formulation des deux types de particules, contrairement aux systèmes particuliers monocomposants.

2. Systèmes avec un seul type de particules

La plupart des hydrogels colloïdaux avec un unique type de particules décrits dans la littérature sont des assemblages de copolymères à blocs.⁴¹⁻⁴⁴ Wang *et al.* ont synthétisé des copolymères triblocs amphiphiles, à base de PEG et de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) modifié avec des groupes éthers cycliques pendants, de structure PCL-PEG-PCL.⁴⁴ Ces copolymères majoritairement hydrophobes (ratio massique PCL/PEG de 3 :1) s'auto-assemblent en milieu aqueux sous la forme de nanoparticules avec une couronne de PEG à l'interface avec l'eau. Leur étude a démontré que ces nanoparticules forment un hydrogel lorsqu'elles sont chauffées à 37 °C et qu'un retour à température permet de redisperser les objets en suspension (Figure 3).

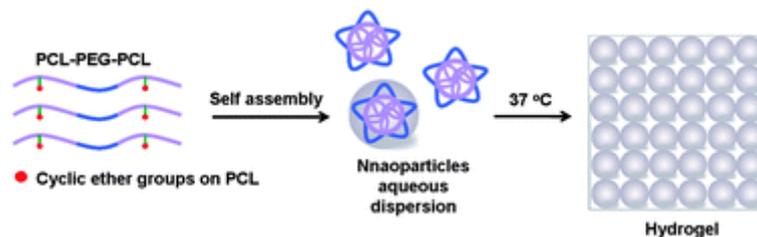


Figure 2 Représentation schématique de l'auto-assemblage à 25 °C en milieu aqueux des copolymères à blocs PCL-PEG-PCL et thermogélification des nanoparticules à 37 °C. Adapté de Wang *et al.*⁴⁴

Des systèmes similaires ont été décrits, dont un à partir de copolymères triblocs de structure ABA à base de poly(éthylène glycol) (bloc A) et de poly(ester anhydride) (bloc B) qui a fait l'objet d'étude *in vivo* et pour lequel une gélification *in situ* a été observée chez un modèle animal.⁴²

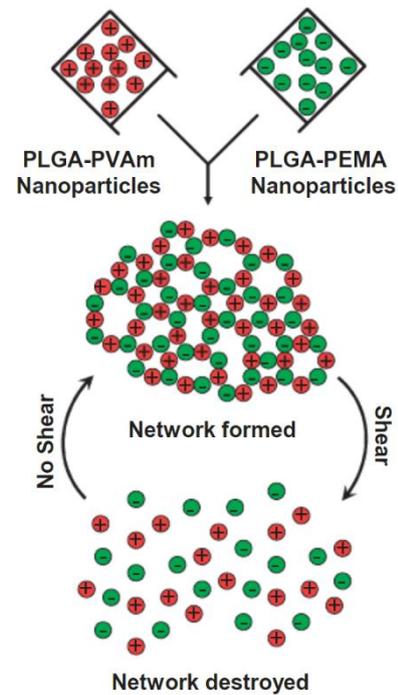


Figure 1 Hydrogel colloïdal formé par mélange de suspensions de nanoparticules à base de PLGA chargées positivement ou négativement. Adapté de Wang *et al.*⁴⁰

Enfin, une dernière stratégie de mise en forme d'hydrogels colloïdaux consiste à décorer en surface des nanoparticules par un copolymère stimuli-répondant. Le groupe de C. Alexander a notamment mis au point deux systèmes similaires de nanoparticules cœur-couronne avec une couronne thermorépondante.^{45,46} Le premier est à base de microparticules de PLGA recouvertes d'une couronne d'un copolymère thermosensible de méthacrylate de poly(éthylène glycol) et méthacrylate de poly(propylène glycol),⁴⁵ et le second à partir de microparticules de PCL avec un revêtement de poly(méthacrylate de polyéthylène glycol éthyle éther).⁴⁶ Ces deux suspensions ont montré une gélification à 37 °C pour des concentrations respectives en particules de 60%_m et 19%_m.

La stratégie est particulièrement intéressante puisqu'elle permet une grande versatilité avec le contrôle des propriétés des particules (diamètre, charge de surface, etc) et les propriétés du polymère avec lequel elles sont décorées (masse molaire, fonctionnalité, etc).

III. Stratégie de la thèse

L'état de l'art sur les systèmes particuliers capables de s'auto-assembler pour former un gel colloïdal a révélé qu'en matière auto-assemblage thermo-induit, les copolymères à blocs sont la voie la plus couramment décrite. Les objets auto-assemblés à base de copolymères thermorépondants présentent de nombreux atouts pour des applications dans le domaine biomédical mais également certains désavantages. En effet, la plupart des systèmes décrits sont des polymères synthétiques qui nécessitent une synthèse complexe et qui peuvent poser des problèmes de biocompatibilité et de biodégradation par la suite.⁴⁷

Ainsi, pour palier à ces inconvénients, il serait intéressant de formuler des nanoparticules de biopolymères biocompatibles, biodégradables, de taille et de porosité contrôlées, éventuellement capables d'encapsuler et de libérer des actifs. Ces nanoparticules seraient alors modifiées en surface pour leur apporter des propriétés thermosensibles, en les décorant par exemple d'un polymère lui-même thermosensible. L'intérêt de ce système réside dans la maîtrise à la fois de la mise en forme des nanoparticules, de la synthèse du polymère thermorépondant, ainsi que de la densité de greffage du polymère à la surface des particules. **L'objectif de ce travail de thèse est donc de mettre en forme des nanoparticules modèles, de les modifier en surface avec le polymère thermorépondant préalablement synthétisé, et d'étudier les propriétés thermosensibles qui découlent de cette suspension de nanoparticules fonctionnalisées.**

Dans un premier temps, un cahier des charges des nanoparticules modèles a été mis en place. Ce projet s'inscrit dans un contexte biomédical où les biomatériaux doivent répondre aux critères suivants : biocompatibilité, non-cytotoxicité, etc. Les polymères naturels, et tout particulièrement les polysaccharides, constituent une ressource de choix pour la mise en forme

de biomatériaux ; l'équipe PPB du CIRIMAT en a fait l'une de ses expertises. Le chitosane, polymère semi-naturel dérivé de la chitine, et l'alginate de sodium ont notamment été utilisés pour la mise en forme de films, de matrices tridimensionnelles et ce pour des applications variées, comme le traitement de fistules pancréatiques ou la thérapie cellulaire des tissus mous.^{48,49} Le choix de ces deux polysaccharides pour la formulation des nanoparticules de ce projet s'appuie ainsi sur cette expertise. Le chitosane (CS) est un polycation et s'assemble en présence du polyanion alginate (ALG) sous forme de complexes polyélectrolytes (PEC). Ces assemblages à fortes interactions électrostatiques sont bien connus dans la littérature et ont montré de nombreux intérêts en ingénierie tissulaire.⁴⁸ Les nanoparticules de PEC de chitosane et d'alginate ont notamment été mises en forme et utilisées pour la libération d'actifs.⁵⁰⁻⁵² Cependant, les polymères naturels comme le CS et l'ALG présentent comme inconvénient une viscosité importante, ce qui implique de les utiliser en solution très diluée. Travailler à de faibles concentrations impacte la production de biomatériaux puisque de très grands volumes de travail sont nécessaires pour obtenir de faibles quantités de matériau. Pour contrebalancer cette difficulté, **nous proposons la mise en forme de nanoparticules modèles, constituées d'un cœur de silice et d'une couronne d'hydrogel de PEC.** Les nanoparticules de silice sont par ailleurs déjà très souvent utilisées comme biomatériaux et ont l'avantage de pouvoir être produites rapidement en grande quantité.^{53,54} Pour reproduire l'interface d'hydrogel et la fonctionnalité de surface des nanoparticules de PEC, nous avons souhaité enrober ces cœurs de silice par une couronne d'hydrogel à base de CS et d'ALG. Pour cela, un assemblage par *layer-by-layer* (LbL) a été réalisé et 2 bicouches de CS et d'ALG (polycation/polyanion) ont été déposées successivement sur la surface initialement chargée négativement de silice. Ainsi, les particules modèles cœur/couronne de silice et d'hydrogel seront mises en forme en s'appuyant sur des protocoles existant dans la littérature.⁵⁵⁻⁵⁷

Dans un deuxième temps, il s'agit d'établir le cahier des charges concernant le polymère thermorépondant qui sera utilisé pour modifier la surface des nanoparticules cœur-couronne. Pour cela, il est nécessaire d'envisager les différentes voies de modification de surface possibles, les plus couramment utilisées pour la fonctionnalisation avec des broches de polymères étant le *grafting from* et le *grafting to*.⁵⁸ Le *grafting from* consiste à modifier la surface avec un amorceur de la polymérisation et d'initier la polymérisation depuis la surface. En *grafting to*, le polymère est synthétisé de manière à présenter des groupements fonctionnels en bout de chaîne ou au long de la chaîne, et il est ensuite greffé à la surface par le biais d'une réaction ou interaction spécifique. Les avantages et inconvénients de ces deux techniques seront approfondis dans la partie 2 de ce manuscrit ; cependant, dans le cadre de ce projet, une approche de *grafting to* paraît la plus pertinente car elle permet le design de macromolécules plus complexes et leur caractérisation. Ainsi, pour pouvoir fonctionnaliser la surface des nanoparticules, le polymère doit répondre aux

critères suivants : i) être thermorépondant, ii) présenter des groupements fonctionnels pouvant permettre un greffage sur la couronne d'hydrogel des particules. Pour répondre à ces critères, et en s'appuyant sur l'expertise de l'équipe Polymères de Précision par Procédés Radicalaires (P3R) du laboratoire des IMRCP, nous proposons la synthèse par RAFT/MADIX d'un copolymère dibloc composé d'un premier bloc polyaminé à base de poly(vinyl amine) (PVAm), et d'un second bloc thermosensible à base de poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM). La voie d'accès proposée pour ce copolymère est adaptée de Mori *et al.* et repose sur la copolymérisation RAFT d'un dibloc poly(vinyl phthalimide)-*b*-poly(N-isopropylacrylamide) (PVPI-*b*-PNIPAM), suivie de l'hydrazinolyse du bloc PVPI pour obtenir la PVAm.^{59,60} La PVAm apporte ainsi des amines primaires qui peuvent réagir avec les amines du chitosane tout comme les acides carboxyliques de l'alginate de sodium, en fonction des agents de couplage choisis, tandis que le bloc PNIPAM apportera les propriétés de LCST. Afin de mettre au point des conditions de greffage optimales, une étude de la physico-chimie du copolymère en solution sera réalisée et aura pour but de mettre en évidence l'influence du caractère pH-sensible du copolymère sur sa thermosensibilité et les conséquences sur l'auto-assemblage thermo-induit du copolymère en solution.

Finalement, et en s'appuyant sur les résultats obtenus, la modification de surface des nanoparticules cœur/couronne sera réalisée et caractérisée, avec pour objectif de quantifier la quantité de polymère thermorépondant greffée en surface des particules et de mettre en évidence la nature chimique de ce greffage.

L'évaluation des propriétés thermosensibles des nanoparticules modifiées aura pour but de montrer si une thermosensibilité est observée, que ce soit par l'agrégation des particules ou leur déstabilisation, lorsque la température est élevée au-delà de la température critique du copolymère thermosensible.

En résumé, l'objectif de ce projet de thèse est de mettre en forme des nanoparticules à base de biopolymères et de les fonctionnaliser (Partie 2) avec un polymère thermorépondant précédemment synthétisé (Partie 1) pour évaluer leurs propriétés thermosensibles en suspension (Schéma 1).

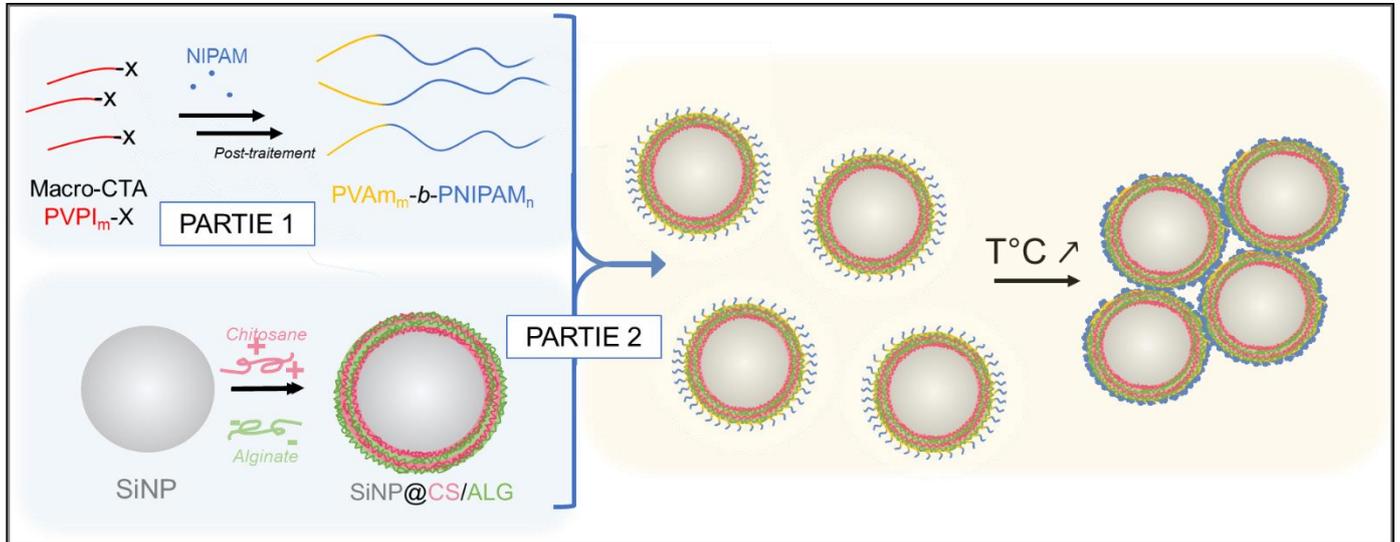


Schéma 1 Représentation schématique de la stratégie globale du projet de thèse avec la mise en forme des nanoparticules à base de polysaccharides et de leur fonctionnalisation (Partie 2) avec un polymère thermorépondant précédemment synthétisé (Partie 1) pour évaluer leurs propriétés thermosensibles en suspension

Références

1. Roux, R., Ladavière, C., Montembault, A. & Delair, T. Particle assemblies: Toward new tools for regenerative medicine. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 997–1007 (2013).
2. Hollister, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* **4**, 518–524 (2005).
3. Xie, R. *et al.* Self-fitting shape memory polymer foam inducing bone regeneration: A rabbit femoral defect study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1862**, 936–945 (2018).
4. Delair, T. In situ forming polysaccharide-based 3D-hydrogels for cell delivery in regenerative medicine. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1013–1019 (2012).
5. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem. Rev.* **101**, 1869–1880 (2001).
6. Lee, J. H. Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue engineering. *Biomater. Res.* **22**, 27 (2018).
7. Yue, S., He, H., Li, B. & Hou, T. Hydrogel as a Biomaterial for Bone Tissue Engineering: A Review. *Nanomaterials* **10**, 1511 (2020).
8. Madhusudanan, P., Raju, G. & Shankarappa, S. Hydrogel systems and their role in neural tissue engineering. *J. R. Soc. Interface* **17**, 20190505 (2020).
9. Flégeau, K. *et al.* Toward the development of biomimetic injectable and macroporous biohydrogels for regenerative medicine. *Adv. Colloid Interface Sci.* **247**, 589–609 (2017).
10. Zhang, X. *et al.* An effective strategy for preparing macroporous and self-healing bioactive hydrogels for cell delivery and wound healing. *Chem. Eng. J.* **425**, 130677 (2021).
11. Liu, L., Gao, Q., Lu, X. & Zhou, H. In situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration. *Asian J. Pharm. Sci.* **11**, 673–683 (2016).
12. Mathew, A. P., Uthaman, S., Cho, K.-H., Cho, C.-S. & Park, I.-K. Injectable hydrogels for delivering biotherapeutic molecules. *Int. J. Biol. Macromol.* **110**, 17–29 (2018).
13. Sun, Y., Nan, D., Jin, H. & Qu, X. Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *Polym. Test.* **81**, 106283 (2020).
14. Pek, Y. S., Wan, A. C. A. & Ying, J. Y. The effect of matrix stiffness on mesenchymal stem cell differentiation in a 3D thixotropic gel. *Biomaterials* **31**, 385–391 (2010).
15. Ding, X. & Wang, Y. Weak bond-based injectable and stimuli responsive hydrogels for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B* **5**, 887–906 (2017).
16. Fu, X., Hosta-Rigau, L., Chandrawati, R. & Cui, J. Multi-Stimuli-Responsive Polymer Particles, Films, and Hydrogels for Drug Delivery. *Chem* **4**, 2084–2107 (2018).
17. Mantha, S. *et al.* Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials* **12**, 3323 (2019).
18. Yang, J.-A., Yeom, J., Hwang, B. W., Hoffman, A. S. & Hahn, S. K. In situ-forming injectable hydrogels for regenerative medicine. *Prog. Polym. Sci.* **39**, 1973–1986 (2014).
19. Kim, D. Y. *et al.* Stimuli-Responsive Injectable In situ-Forming Hydrogels for Regenerative Medicines. *Polym. Rev.* **55**, 407–452 (2015).
20. Klouda, L. & Mikos, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**, 34–45 (2008).
21. Lv, X. *et al.* Influence of chitosan oligosaccharide on the gelling and wound healing properties of injectable hydrogels based on carboxymethyl chitosan/alginate polyelectrolyte complexes. *Carbohydr. Polym.* **205**, 312–321 (2019).
22. Ishihara, M., Kishimoto, S., Nakamura, S., Sato, Y. & Hattori, H. Polyelectrolyte Complexes of Natural Polymers and Their Biomedical Applications. *Polymers* **11**, 672 (2019).
23. Chen, C.-H. *et al.* Injectable thermosensitive hydrogel containing hyaluronic acid and chitosan as a barrier for prevention of postoperative peritoneal adhesion. *Carbohydr. Polym.* **173**, 721–731 (2017).
24. Sabourian, P. *et al.* Stimuli-responsive chitosan as an advantageous platform for efficient delivery of bioactive agents. *J. Controlled Release* **317**, 216–231 (2020).

25. Safakas, K., Saravanou, S.-F., Iatridi, Z. & Tsitsilianis, C. Alginate-g-PNIPAM-Based Thermo/Shear-Responsive Injectable Hydrogels: Tailoring the Rheological Properties by Adjusting the LCST of the Grafting Chains. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3824 (2021).
26. Scott, R. & Kuntz Willits, R. 16 - Future applications of injectable biomaterials: the use of microgels as modular injectable scaffolds. in *Injectable Biomaterials* (ed. Vernon, B.) 375–398 (2011).
27. Wiltsey, C. *et al.* Thermogelling bioadhesive scaffolds for intervertebral disk tissue engineering: Preliminary in vitro comparison of aldehyde-based versus alginate microparticle-mediated adhesion. *Acta Biomater.* **16**, 71–80 (2015).
28. Sahoo, J. K., VandenBerg, M. A. & Webber, M. J. Injectable network biomaterials via molecular or colloidal self-assembly. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **127**, 185–207 (2018).
29. Holland, T. A., Tabata, Y. & Mikos, A. G. In vitro release of transforming growth factor- β 1 from gelatin microparticles encapsulated in biodegradable, injectable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels. *J. Controlled Release* **91**, 299–313 (2003).
30. Hong, Y., Gong, Y., Gao, C. & Shen, J. Collagen-coated polylactide microcarriers/chitosan hydrogel composite: Injectable scaffold for cartilage regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A* **85A**, 628–637 (2008).
31. Wang, C. *et al.* The control of anchorage-dependent cell behavior within a hydrogel/microcarrier system in an osteogenic model. *Biomaterials* **30**, 2259–2269 (2009).
32. Arimura, H., Ouchi, T., Kishida, A. & Ohya, Y. Preparation of a hyaluronic acid hydrogel through polyion complex formation using cationic polylactide-based microspheres as a biodegradable cross-linking agent. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **16**, 1347–1358 (2005).
33. Leckband, D. & Israelachvili, J. Intermolecular forces in biology. *Q. Rev. Biophys.* **34**, 105–267 (2001).
34. Cabane, B. La stabilité Colloïdale des Latex. 27.
35. Matter, F., Luna, A. L. & Niederberger, M. From colloidal dispersions to aerogels: How to master nanoparticle gelation. *Nano Today* **30**, 100827 (2020).
36. Gibson, M. I. & O'Reilly, R. K. To aggregate, or not to aggregate? considerations in the design and application of polymeric thermally-responsive nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7204–7213 (2013).
37. Minami, S., Suzuki, D. & Urayama, K. Rheological aspects of colloidal gels in thermoresponsive microgel suspensions: formation, structure, and linear and nonlinear viscoelasticity. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **43**, 113–124 (2019).
38. Arimura, H., Ohya, Y., Ouchi, T. & Yamada, H. Preparation of a biodegradable matrix through polyion complex formation by mixing polylactide-based microspheres having oppositely charged surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **270**, 299–303 (2004).
39. Van Tomme, S. R., van Steenbergen, M. J., De Smedt, S. C., van Nostrum, C. F. & Hennink, W. E. Self-gelling hydrogels based on oppositely charged dextran microspheres. *Biomaterials* **26**, 2129–2135 (2005).
40. Wang, Q., Wang, L., Detamore, M. S. & Berkland, C. Biodegradable Colloidal Gels as Moldable Tissue Engineering Scaffolds. *Adv. Mater.* **20**, 236–239 (2008).
41. Abulateefeh, S. R. *et al.* Facile synthesis of responsive nanoparticles with reversible, tunable and rapid thermal transitions from biocompatible constituents. *Chem. Commun.* 6068–6070 (2009)
42. Liang, Y. *et al.* Thermoreversible gelation of poly(ethylene glycol)/poly(ester anhydride) triblock copolymer nanoparticles for injectable drug delivery systems. *Soft Matter* **6**, 1915–1922 (2010).
43. Cayre, O. J., Chagneux, N. & Biggs, S. Stimulus responsive core-shell nanoparticles: synthesis and applications of polymer based aqueous systems. *Soft Matter* **7**, 2211–2234 (2011).
44. Wang, W. *et al.* Controlled thermal gelation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol) block copolymers by modifying cyclic ether pendant groups on poly(ϵ -caprolactone). *Soft Matter* **8**, 1575–1583 (2012).
45. Wang, W. *et al.* Biodegradable Thermoresponsive Microparticle Dispersions for Injectable Cell Delivery Prepared Using a Single-Step Process. *Adv. Mater.* **21**, 1809–1813 (2009).
46. Ghanami, R. C. A., Saunders, B. R., Bosquillon, C., Shakesheff, K. M. & Alexander, C. Responsive particulate dispersions for reversible building and deconstruction of 3D cell environments. *Soft Matter* **6**, 5037–5044 (2010).

47. Englert, C. *et al.* Pharmapolymer in the 21st century: Synthetic polymers in drug delivery applications. *Prog. Polym. Sci.* **87**, 107–164 (2018).
48. Conzatti, G. *et al.* Elaboration of a thermosensitive smart biomaterial: From synthesis to the ex vivo bioadhesion evaluation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **175**, 91–97 (2019).
49. Bushkalova, R. *et al.* Alginate-chitosan PEC scaffolds: A useful tool for soft tissues cell therapy. *Int. J. Pharm.* **571**, 118692 (2019).
50. Arora, S., Gupta, S., Narang, R. K. & Budhiraja, R. D. Amoxicillin Loaded Chitosan–Alginate Polyelectrolyte Complex Nanoparticles as Mucopenetrating Delivery System for H. Pylori. *Sci. Pharm.* **79**, 673–694 (2011).
51. Friedman, A. J. *et al.* Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activity of Chitosan–Alginate Nanoparticles: A Targeted Therapy for Cutaneous Pathogens. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1231–1239 (2013).
52. Wu, D. *et al.* Chitosan-based Colloidal Polyelectrolyte Complexes for Drug Delivery: A Review. *Carbohydr. Polym.* **238**, 116126 (2020).
53. Lagarrigue, P. *et al.* Well-defined polyester-grafted silica nanoparticles for biomedical applications: Synthesis and quantitative characterization. *Polymer* **211**, 123048 (2020).
54. Pandele, A. M., Andronescu, C., Ghebaour, A., Garea, S. A. & Iovu, H. New Biocompatible Mesoporous Silica/Polysaccharide Hybrid Materials as Possible Drug Delivery Systems. *Materials* **12**, 15 (2019).
55. Yang, Y.-J. *et al.* Mesoporous silica nanotubes coated with multilayered polyelectrolytes for pH-controlled drug release. *Acta Biomater.* **6**, 3092–3100 (2010).
56. Feng, W. *et al.* Effect of pH-Responsive Alginate/Chitosan Multilayers Coating on Delivery Efficiency, Cellular Uptake and Biodistribution of Mesoporous Silica Nanoparticles Based Nanocarriers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 8447–8460 (2014).
57. Du, P., Zhao, X., Zeng, J., Guo, J. & Liu, P. Layer-by-layer engineering fluorescent polyelectrolyte coated mesoporous silica nanoparticles as pH-sensitive nanocarriers for controlled release. *Appl. Surf. Sci.* **345**, 90–98 (2015).
58. Li, D., Xu, L., Wang, J. & Gautrot, J. E. Responsive Polymer Brush Design and Emerging Applications for Nanotheranostics. *Adv. Healthc. Mater.* **10**, 2000953 (2021).
59. Maki, Y., Mori, H. & Endo, T. Controlled RAFT Polymerization of N-Vinylphthalimide and its Hydrazinolysis to Poly(vinyl amine). *Macromol. Chem. Phys.* **208**, 2589–2599 (2007).
60. Maki, Y., Mori, H. & Endo, T. Synthesis of Amphiphilic and Double-Hydrophilic Block Copolymers Containing Poly(vinyl amine) Segments by RAFT Polymerization of N-Vinylphthalimide. *Macromol. Chem. Phys.* **211**, 45–56 (2010).

Partie 1

Synthèse et caractérisation physico-chimique d'un copolymère à blocs pH- et thermosensible

P1 – Chapitre 1 : Etat de l'art sur la synthèse et les propriétés d'auto-assemblage de copolymères à blocs double-hydrophiles pH- et thermosensibles	25
1. La PRDR au service de l'ingénierie macromoléculaire	25
2. Synthèse de copolymères à blocs par RAFT	27
3. Physico-chimie des copolymères à blocs double-hydrophiles en milieu aqueux	33
4. Stratégie de la Partie 1	38
P1 – Chapitre 2 : Synthèse des copolymères à blocs PVAm _m - <i>b</i> -PNIPAM _n	41
1. Stratégie de synthèse	41
2. Synthèse du macro-agent de transfert PVPI _m -X	42
3. Synthèse par polymérisation RAFT/MADIX des diblocs PVPI _m - <i>b</i> -PNIPAM _n -X	44
4. Synthèse des diblocs PVAm _m - <i>b</i> -P(NIPAM- <i>stat</i> -NVC) _n -X	55
5. Purification des diblocs	56
6. Conclusion	57
P1 – Chapitre 3 : Propriétés d'auto-assemblage des copolymères PVAm _m - <i>b</i> -PNIPAM _n en milieu aqueux	59
1. Objectifs	59
2. Propriétés physico-chimiques des homopolymères	59
3. Propriétés physico-chimiques des copolymères	60
4. Propriétés d'auto-assemblage des copolymères	77
5. Conclusion de l'étude physico-chimique des diblocs PVAm _m -PNIPAM _n	85
P1 – Chapitre 4 : Matériel et méthodes	87
1. Réactifs et matériel	87
2. Synthèse des copolymères PVAm _m - <i>b</i> -PNIPAM _n	87
3. Etude physico-chimique des copolymères PVAm _m - <i>b</i> -PNIPAM _n	92
Annexes de la Partie 1	95
Références	105

Partie 1 : Synthèse et caractérisation physico-chimique d'un copolymère à blocs pH- et thermosensible

La Partie 1 de ce manuscrit s'attache à décrire la synthèse et la caractérisation physico-chimique des copolymères à blocs double-hydrophiles pH- et thermosensibles PVAm_m-b-PNIPAM_n. Elle s'organise en 4 chapitres. Le Chapitre 1 est un état de l'art sur la synthèse et la caractérisation de copolymères à blocs stimuli-répondants. Le Chapitre 2 décrit la synthèse des copolymères PVAm_m-b-PNIPAM_n tandis que le Chapitre 3 s'intéresse à leur physico-chimie en milieu aqueux. Enfin, le Chapitre 4 contient la partie expérimentale des deux chapitres précédents.

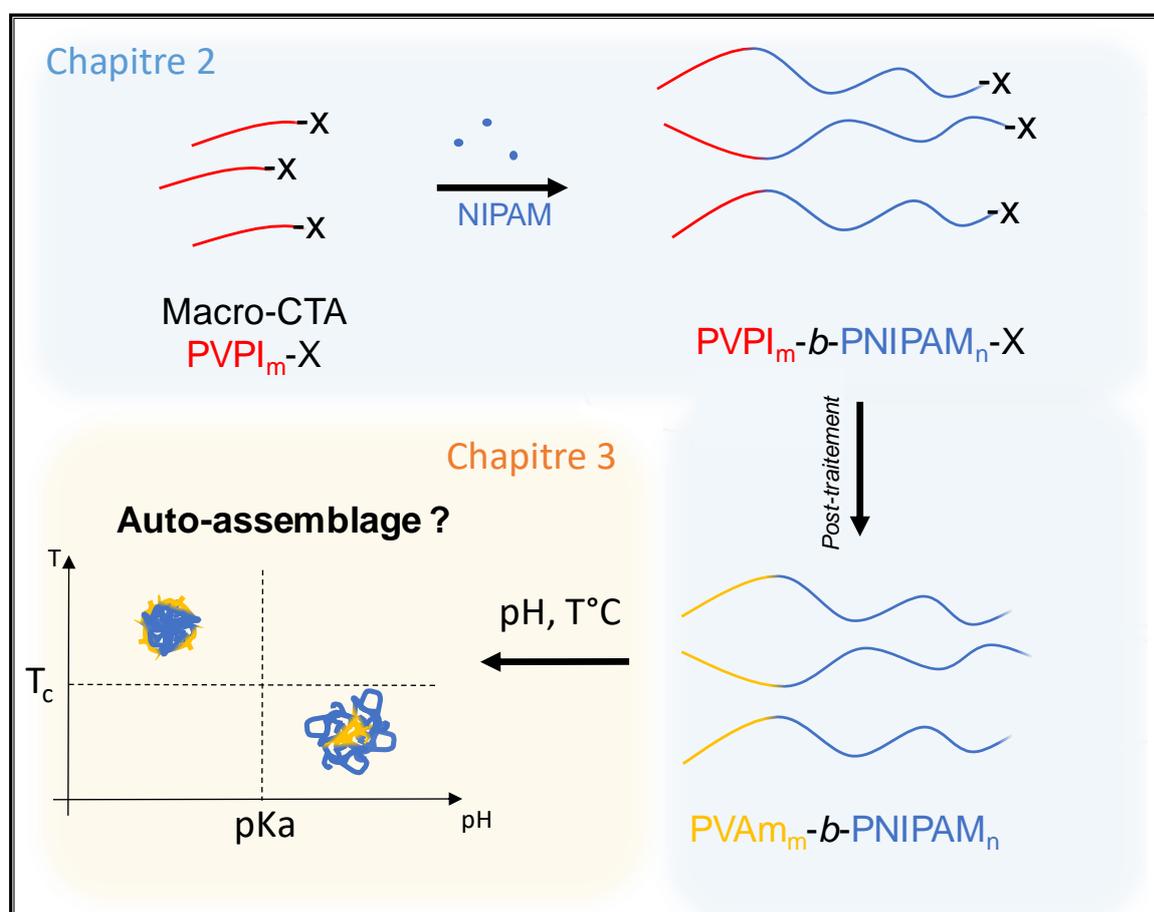


Schéma 1 Résumé graphique de la Partie 1 : Chapitre 2 : Synthèse des copolymères PVAm_m-b-PNIPAM_n, Chapitre 3 : étude physico-chimique des copolymères en solution

P1 – Chapitre 1 : Etat de l'art sur la synthèse et les propriétés d'auto-assemblage de copolymères à blocs double-hydrophiles pH- et thermosensibles

1. La PRDR au service de l'ingénierie macromoléculaire

L'émergence des techniques de polymérisation radicalaire par désactivation réversible (PRDR) a constitué dans les années 1990 une révolution dans le domaine de l'ingénierie macromoléculaire. Cette avancée répond au besoin de développer une technologie combinant à la fois les avantages de la polymérisation anionique vivante, et la polymérisation radicalaire conventionnelle. En effet, la polymérisation anionique vivante permet le contrôle des bouts de chaîne ainsi que l'obtention de structures bien définies ; cependant elle requiert des conditions très strictes (absence de substances protiques, d'impuretés ou de groupes fonctionnels). Au contraire, la polymérisation radicalaire conventionnelle supporte la présence de certaines impuretés, peut avoir lieu dans des solvants protiques comme l'eau et peut être mise en œuvre dans différents milieux (en masse, en solution ou en milieu hétérogène). Cependant la polymérisation radicalaire conventionnelle est sujette à des réactions de terminaison, empêchant le contrôle du bout de chaîne et l'obtention d'architectures complexes et contrôlées. Initialement connue sous le terme de polymérisation radicalaire contrôlée, la PRDR est une approche qui permet de limiter les réactions de terminaisons irréversibles qui posent problème en polymérisation radicalaire conventionnelle.

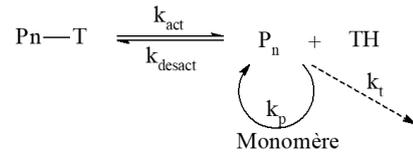
Les différents types de PRDR apparus par ordre chronologique sont : la polymérisation par transfert d'iode (Iodine Transfer Polymerization, ITP),^{1,2} la polymérisation contrôlée par des nitroxydes (Nitroxide-Mediated Polymerization, NMP),³ la polymérisation radicalaire contrôlée par des composés à base de cobalt (OrganoCobalt-mediated Radical Polymerization, OCRP),⁴ la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP),^{5,6} la polymérisation par transfert de chaîne par addition-fragmentation réversible (Reversible Addition-Fragmentation chain-Transfer Polymerization, RAFT)⁷ dont fait partie la technologie MADIX (MAcromolecular Design by Interchange of Xanthates).⁸

Le point commun à chacune des PRDR est le processus d'équilibre réversible entre une espèce dormante (qui diffère selon la technologie) et une espèce active (macro-radical en croissance) (Figure 1).

Désactivation réversible par couplage

NMP, OCRP

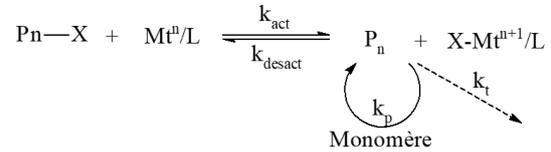
T = nitroxyde, complexes de Cobalt

**Désactivation réversible par transfert d'atome**

ATRP

Mt = Cu, Ru, Ni, Fe, Mo etc...

L = amines, phosphines

**Désactivation réversible par transfert dégénératif**

RAFT/MADIX, (R)ITP, OHRP

- Transfert d'atome ou de groupe (I, Te, Sb, Bi)
- Addition-Fragmentation (S(C=S)Z)

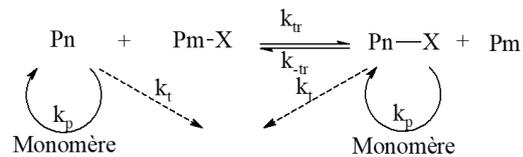
X = I, Te-R, Sb-R₂, Bi-R₂, S(C=S)Z

Figure 1 Mécanisme général des techniques de PRDR

L'activation-désactivation des chaînes permet de contrôler leur croissance à la même vitesse, ce qui garantit une faible dispersité et un contrôle des masses molaires obtenues.

Grâce à la désactivation réversible des chaînes en croissance, celles-ci ne subissent pas (ou peu) de réactions de terminaison irréversibles. En effet, une majorité des chaînes sont sous forme dormante, c'est-à-dire qu'elles sont réactivables en vue d'une potentielle extension de chaîne avec un autre monomère. Cette particularité de la PRDR en fait un outil précieux pour l'ingénierie macromoléculaire puisqu'elle permet d'accéder à des architectures complexes, de composition et taille contrôlées (Figure 2).

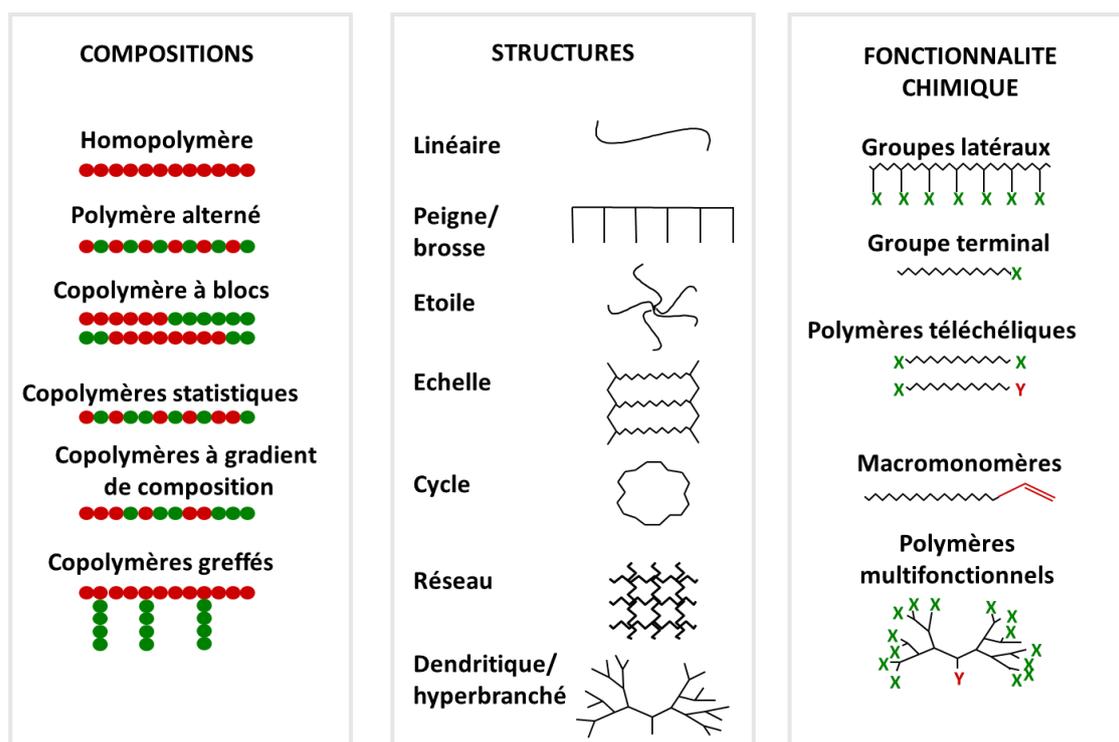


Figure 2 Exemples d'architectures macromoléculaires pouvant être obtenues par PRDR

Nous ne détaillerons dans ce manuscrit que la polymérisation RAFT qui est la technologie utilisée dans ces travaux et qui permet notamment la synthèse de copolymères à blocs.

2. Synthèse de copolymères à blocs par RAFT

1. Technologie RAFT

La polymérisation RAFT est une polymérisation radicalaire par désactivation réversible par transfert dégénératif. Les premiers travaux sur la polymérisation RAFT remontent à 1998. Ce procédé s'est depuis largement développé dans la communauté scientifique et est reconnu comme un outil puissant et polyvalent pour la synthèse de polymères et de matériaux fonctionnels dans de nombreux domaines. Le procédé RAFT utilise comme agents de transfert de chaîne (CTA, chain transfer agent) des composés thiocarbonylthio (Schéma 2), qui sont choisis en fonction de la nature chimique du monomère que l'on souhaite polymériser.

radicaux très réactifs car ils ne sont pas stabilisés par conjugaison et du fait du caractère donneur d'électrons de leur groupe pendant. La réactivité de ces radicaux propageants favorise des réactions de transfert et de terminaison non-désirées.¹⁴ Par exemple, le groupe de Klumperman a identifié des réactions parasites lors de la polymérisation de la N-vinyl pyrrolidone (NVP) avec des xanthates, notamment lorsque la réaction est menée en présence d'un xanthate porteur d'une fonction acide, d'eau et d'impuretés.¹⁵ Ces réactions induisent la perte du bout de chaîne et donc la perte du contrôle de la polymérisation; de plus, le xanthate éliminé est susceptible de réagir avec le monomère pour former de nouvelles espèces de xanthates. Parmi les CTA présentés dans le Schéma 2, les xanthates sont les plus adaptés pour la polymérisation des monomères N-vinyls.¹³ Nous nous intéresserons dans ces travaux aux polymères à base de N-vinyl caprolactame (NVCL), N-vinyl phtalimide (NVPI) et N-vinyl carbazole (NVC), et plus particulièrement aux copolymères à blocs.

Synthèse de copolymères à blocs à base de poly(vinyl amine)

Les copolymères à blocs (CB) sont une classe spécifique de copolymères dont les unités de monomères identiques sont regroupées en blocs discrets le long du polymère. Les CB peuvent avoir différentes architectures : linéaires, en peigne, en étoile, ou encore cycliques. Deux stratégies existent pour la synthèse de ces copolymères : i) l'addition séquentielle de monomères lors d'une polymérisation vivante ou contrôlée,^{16,17} ii) le couplage de segments de chaînes distincts par leurs bouts de chaînes.¹⁸

Les techniques de PRDR précédemment décrites sont très adaptées à l'addition séquentielle et permettent la formation de CB de masses molaires et compositions contrôlées. Dans le cas de la synthèse RAFT d'un copolymère AB, il s'agit de polymériser un monomère A en présence d'un agent de transfert de chaîne X pour obtenir le macro-CTA correspondant. Après sa purification, celui-ci est utilisé pour la polymérisation du deuxième bloc lors de l'ajout du monomère B, menant ainsi à la synthèse du copolymère. L'ordre de polymérisation des monomères A et B est déterminant.^{16,19} En effet, le radical propageant du bloc A doit être un bon groupe partant pour le bloc B.

Certains polymères à blocs sont obtenus après des réactions post-polymérisation. C'est notamment le cas des copolymères à blocs à base de poly(vinyl amine) (PVAm). La PVAm est un polymère cationique de structure très simple (Figure 5) mais dont la synthèse est relativement complexe car la vinyl amine n'est pas stable et se tautomérise en l'imine correspondante.²⁰ Les polymères commerciaux à base de PVAm sont issus de polymérisations radicalaires conventionnelles, la plus courante étant la polymérisation du N-vinyl formamide (NVF) suivie de l'hydrolyse du PNVF correspondant.²¹ Les voies d'accès principales à la PVAm sont présentées sur la Figure 5.

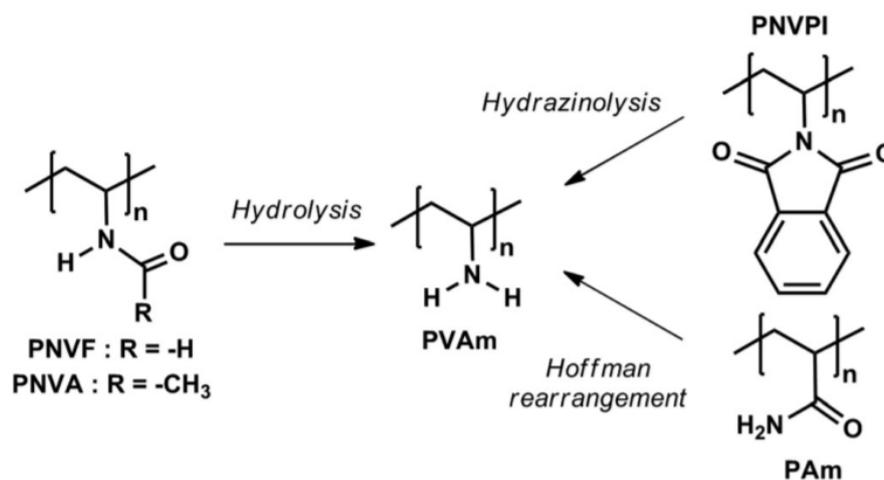


Figure 5 Voies d'accès à la PVAm. Reproduit de Dréan et al.²²

Concernant la PRDR, peu d'exemples dans la littérature illustrent la synthèse de ce polymère, mis à part les travaux de l'équipe d'A. Debuigne en Belgique et l'équipe de H. Mori au Japon.²²⁻²⁶ Les premiers s'intéressent à la PVAm pour son caractère cationique qui en fait un polymère intéressant pour des applications en thérapie génique.²³ Dans leurs travaux, la PVAm et poly(N-méthyl vinyl amine) (PMVAm) sont obtenues par polymérisation radicalaire contrôlée par des composés métalliques (OMRP) des monomères N-vinyl acétamide (NVA) et N-méthyl-vinyl acétamide (NMVA), suivie de l'hydrolyse en milieu acide des polymères PNVA et PNMVA correspondants. Dans le cas des PVAm, des hauts taux d'hydrolyse peuvent être atteints dans les conditions acides, jusqu'à 94 % d'après Dréan et al.²⁷

La seconde stratégie multi-étapes développée pour obtenir des polymères à base de PVAm de masse molaire contrôlée et de faible dispersité a été proposée en s'appuyant sur la voie « hydrazinolysse » présentée dans la Figure 5. En effet, Maki et al ont décrit en 2007 la polymérisation RAFT du monomère NVPI, et l'hydrazinolysse du poly(vinyl phtalimide) (PVPI) correspondant pour récupérer la poly(vinyl amine) déprotégée PVAm. Ces travaux ont été suivis par un nombre restreint d'articles sur la synthèse de copolymères alternés,²⁵ et à blocs à base de PVAm.^{26,28,29} Les exemples de copolymères à blocs synthétisés par RAFT sont présentés dans le Tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 Exemples de diblocs obtenus à partir de macro-CTA PVPI-xanthate et PVPI-dithiocarbamate

Dibloc final	Macro-CTA	M (conv%)	M_n	Composition	\bar{D}	Ref
PVAm-PS	PVPI-xanthate	St (40%)	10700	-	1.53	
PVAm-PNIPAM	PVPI-xanthate	NIPAM (97%)	16400	-	1.62	Maki <i>et al.</i> ²⁶
PVAm-PNIPAM	PVPI-dithiocarbamate (Z=pyrrole)	NIPAM (>99%)	14800	18 /82	1.38	
PVAm-PALysOH	PVPI-dithiocarbamate (Z=pyrrole)	Acryloyl L- Lysine (>85%)	13700	30/70	1.45	Kanto <i>et al.</i> ²⁹

A l'exception du dibloc PVAm-PS, les polymérisations des monomères NIPAM et Acryloyl L-Lysine avec les macro-CTA PVPI-xanthate et PVPI-dithiocarbamate ont permis d'atteindre des bonnes conversions.

Il est intéressant de noter que les diblocs PVAm-PNIPAM sont également thermorépondants du fait des propriétés LCST du bloc PNIPAM. Les copolymères à blocs thermorépondants feront l'objet de la partie suivante.

3. Synthèse de copolymères à blocs thermorépondants

Parmi les polymères à base monomères N-vinyls, la poly(vinyl caprolactame) (PVCL) est connue pour ses propriétés de LCST, celles-ci seront expliquées par la suite. De nombreuses études ont décrit la synthèse RAFT de copolymères à blocs à base de PVCL. Liu *et al.* ont notamment utilisé un PEG terminé par un xanthate pour polymériser la NVCL et obtenir une famille de diblocs PEG-PVCL de masses molaires comprises entre 10 000 et 15 000 g/mol et de dispersités inférieures à 1,06.³⁰ Toujours à partir d'un PEG-xanthate, Etchenausia *et al.* ont synthétisé le dibloc PEG-*b*-P(VAc-co-VCL) en copolymérisant la NVCL avec l'acétate de vinyle (VAc) en milieu dispersé.³¹ Han *et al.* ont étudié l'ordre de polymérisation séquentielle des monomères VAc et NVCL et ont montré que la synthèse du dibloc PVAc-PVCL à partir d'un macro-CTA PVAc-xanthate était plus contrôlée ($D < 1.4$) que la polymérisation inverse du monomère VAc à partir d'un PVCL-xanthate ($D > 1.4$).³² Des macro-CTA PVCL-xanthate ont également été utilisés pour les synthèses des diblocs PVCL-PVP,³³ ou encore le dibloc PVCL-PNIPAM.³⁴

Le PNIPAM est également un polymère à LCST obtenu par la polymérisation du monomère N-isopropylacrylamide. Bien qu'il ne soit pas inclus dans la famille des monomères N-vinyls, il est essentiel dans cette étude de citer des exemples de diblocs thermorépondants à base de PNIPAM et d'autres polymères N-vinyls, comme le dibloc PVPI-PNIPAM précédemment décrit.²⁶ Des diblocs PNIPAM-PNVim ont notamment été synthétisés par RAFT en présence d'un

xanthate.³⁵ Suachao-in *et al.* ont introduit statistiquement des unités NVC au sein d'un bloc PNIPAM lors d'une copolymérisation avec un trithiocarbonate comme CTA.³⁶ Plus récemment, des travaux au sein de l'équipe P3R du laboratoire des IMRCP ont permis d'obtenir le dibloc PNIPAM-PNMVA (A. Dupré-Demorsy, thèse de doctorat, travaux non-publiés). Il a été démontré dans cette étude que ce dibloc, double-hydrophile à température ambiante et amphiphile au-delà d'une température critique, présente des propriétés intéressantes d'auto-assemblage thermorépondant.

3. Physico-chimie des copolymères à blocs double-hydrophiles (DHBC) en milieu aqueux

1. Auto-assemblage des copolymères amphiphiles

L'introduction d'un copolymère amphiphile dans un solvant entraîne nécessairement son agrégation du fait de la non-solubilité de l'un des deux blocs. Ce procédé d'assemblage induit la formation d'objets de morphologies variées allant d'agrégats à des structures complexes comme des sphères, des vésicules, etc (Figure 6).^{37,38}

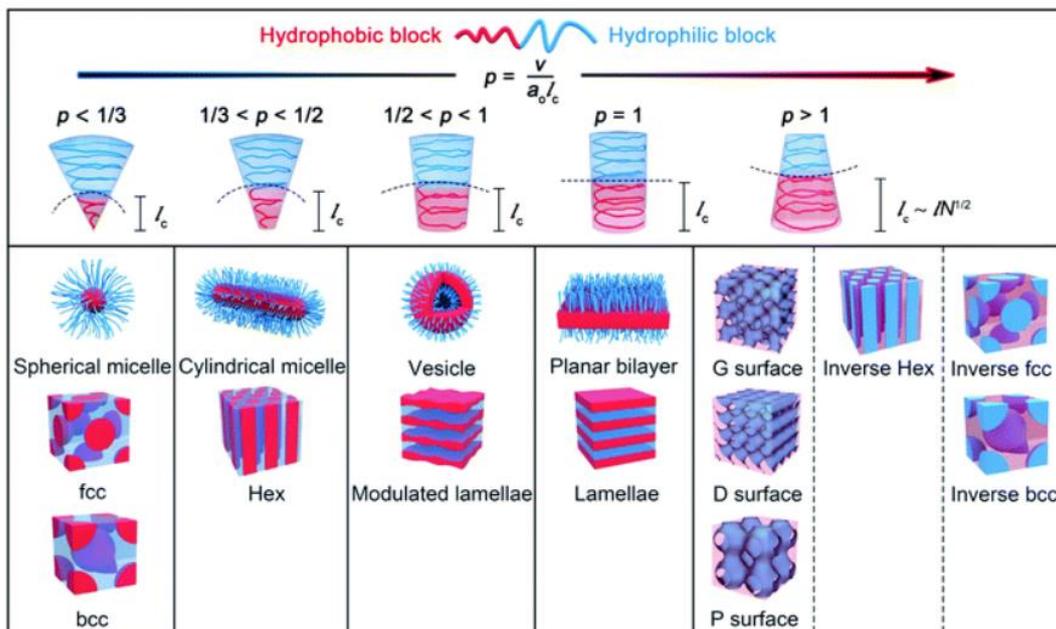


Figure 6 Représentation schématique de l'auto-assemblage des copolymères amphiphiles en fonction du paramètre d'empilement p . Reproduit de Li *et al.*³⁹

La morphologie peut être prédite à partir du calcul du paramètre d'empilement, défini tel que : $p = v \cdot a_0 \cdot l_c$ où v représente le volume des chaînes hydrophobes, a_0 est l'aire de la tête hydrophile et l_c la longueur de la queue hydrophobe. Il a été démontré que la formation de micelles sphériques est favorisée lorsque $p \leq 1/3$, celle de micelles cylindriques lorsque $1/3 \leq p \leq 1/2$ et de vésicules quand $1/2 \leq p \leq 1$.

L'auto-assemblage des copolymères ayant fait l'objet de très nombreuses revues bibliographiques, nous nous intéresserons ici plus particulièrement à l'auto-assemblage des copolymères à blocs double-hydrophiles stimuli-répondants.

2. Auto-assemblage des DHBC stimuli-sensibles

Certains copolymères s'auto-assemblent sous l'effet d'un ou plusieurs stimuli, on parle alors de polymère stimuli-répondants ou "intelligents".^{40,41} Les copolymères à blocs stimuli-répondants sont à l'état d'unimères en solution, et en réponse à un stimulus, deviennent amphiphiles et s'auto-assemblent pour former des objets de tailles et morphologies variées. Cet auto-assemblage stimuli-induit a seulement lieu lorsque la concentration du polymère en solution est supérieure à sa concentration micellaire critique (cmc), sans quoi il n'est pas possible. Les stimuli sont souvent catégorisés selon s'ils sont chimiques (pH, force ionique, ajout d'un réactif) ou physiques (température, champ électrique ou magnétique, contrainte mécanique, etc).⁴²

Dans le cadre de ces travaux, l'accent sera porté sur les paramètres de température et de pH. Les polymères thermorépondants sont particulièrement étudiés, notamment dans le domaine des biomatériaux car ils présentent un grand potentiel d'applications en ingénierie tissulaire et en libération d'actifs.⁴³⁻⁴⁵

Polymères thermosensibles

Les polymères DHBC thermorépondants sont composés d'au moins un bloc lui-même thermorépondant. Les polymères thermorépondants en solution présentent généralement des propriétés de Lower ou Upper Critical Solution Température (LCST ou UCST), en français on parle de température de solution critique inférieure ou supérieure.

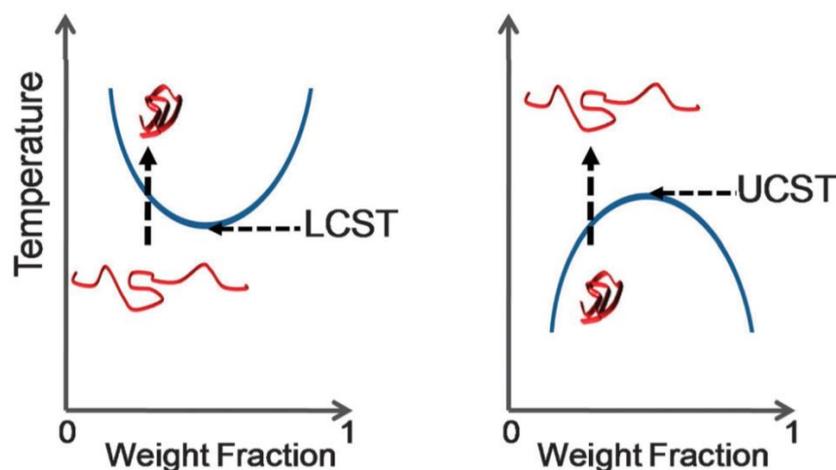


Figure 7 Transition de phase associée à un comportement de LCST (température de solution critique inférieure) ou de UCST (température de solution critique supérieure). Reproduit de Gibson et al.⁴⁶

Ces polymères ont la caractéristique de subir une transition de phase lorsque la température est élevée ou abaissée. Les polymères à LCST sont solubles dans un solvant à basse température et deviennent insolubles lorsque la température dépasse un seuil critique. Au contraire, les polymères à UCST ont le comportement opposé, ils sont insolubles à basse température et se solubilisent lorsque la température augmente. Nous nous intéressons ici uniquement aux polymères LCST.

Par définition, la LCST correspond à l'extremum du diagramme de phase, c'est-à-dire la température à laquelle la transition de phase a lieu sur toute la gamme de concentration. Pour une concentration donnée, c'est-à-dire en tout autre point du diagramme de phase, la température critique est appelée température de point de trouble (T_c , *cloud point temperature*). La LCST correspond ainsi à la valeur minimale de T_c .

La transition de phase d'un système monophasé où le polymère est soluble dans son solvant (typiquement l'eau), vers un système biphasé où il devient insoluble, a une origine thermodynamique. En effet, cette transition d'un comportement hydrophile à basse température à un comportement hydrophobe à plus haute température, s'explique par la rupture des liaisons hydrogène entre l'eau et le polymère. Le polymère est partiellement déshydraté et se replie sur lui-même, exposant ses entités hydrophiles à l'interface polymère/eau, et regroupant ses entités hydrophobes au cœur des agrégats.

A basse température, pour que le polymère soit soluble, l'énergie libre $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ est négative, avec $\Delta H < 0$ du fait des liaisons hydrogène entre l'eau et le polymère, et $\Delta S < 0$ car l'eau forme un réseau structuré avec le polymère. Lorsque la température augmente, $\Delta G > 0$: le terme $T\Delta S$ devient prédominant devant la composante enthalpique car le polymère se déshydrate : le polymère est insoluble.⁴⁷

Les polymères LCST les plus connus et décrits dans la littérature sont la PVCL⁴⁸, les copolymères à base de poly(éthylène glycol) et les copolymères à base de (méth)acrylates.^{43,49} Parmi les acrylates sont souvent cités les polymères suivants : le 2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate (DMAEMA),⁵⁰ méthoxyéthyléneglycolacrylate (EGA),⁵¹ méthoxy di(éthylène glycol) acrylate (DEGA),⁵² méthoxy di(éthylène glycol) méthacrylate (DEGMA).⁵³ Enfin, la famille des (méth)acrylamides est également représentée avec le plus connu des polymères LCST qui est le PNIPAM.⁵⁴

Nous nous intéresserons dans cette étude uniquement à la PVCL et au PNIPAM. Ces deux polymères thermorépondants ne présentent pas le même type de LCST. En effet, la PVCL a une LCST de type I, c'est-à-dire un comportement classique dit de Flory-Huggins, qui est impacté par sa masse molaire, contrairement aux LCST de type II comme le PNIPAM dont la masse molaire n'influe pas sur la température critique. Ce paramètre est important lorsqu'il s'agit d'ajuster la

LCST du polymère pour une application spécifique. Pour la PVCL, il suffit de viser des masses plus grandes pour abaisser la LCST et inversement.⁵⁵ Dans le cas du PNIPAM, il convient de copolymériser le NIPAM avec des monomères hydrophiles (hydrophobes) pour augmenter (abaisser) la LCST. Les polymères de faibles masses molaires (< 50 kg/mol) peuvent également voir leur LCST modifiée par le caractère hydrophile ou hydrophobe de leur bout de chaîne, d'où l'importance du choix du CTA lors de la polymérisation RAFT notamment.⁵⁶

Polymères pH-sensibles

L'introduction d'un bloc cationique ou anionique dans un copolymère neutre permet de lui apporter des propriétés pH-sensibles.^{43,57} Les polymères pH-sensibles transitent d'un état neutre à un état chargé, positif ou négatif, lors d'une variation de pH, ce qui modifie leur caractère hydrophile en solution aqueuse, le bloc chargé étant logiquement plus hydrophile.⁵⁸ Les monomères pH-sensibles les plus couramment utilisés sont l'acide acrylique (AA) et l'acide méthacrylique (MAA) qui permettent de synthétiser des polycarboxylates utilisés pour la délivrance d'actifs sous forme de vésicules, micelles et nanosphères.⁵⁹ Des polyacides contenant des fonctions acides sulfoniques,⁶⁰ phosphoniques,⁶¹ et boroniques⁶² sont également cités dans la littérature.

Pour la synthèse de blocs cationiques, il s'agit de polymériser des monomères à caractère basique, qui portent généralement des fonctions amines. Parmi les acrylates, l'acrylate de diméthylaminoéthyle (DMAEA) est copolymérisé par RAFT avec de l'acrylate de méthyle (MA) pour former des polyacrylates cationiques, du fait des amines tertiaires, avec un pKa d'environ 7.⁶³ La poly(vinyl amine) est un autre exemple de polymère cationique qui a fait l'objet d'une revue par Pelton *et al.*²¹ La PVAm présente une bonne solubilité dans l'eau sur une large gamme de pH, et un comportement de polyélectrolyte, avec un pKa d'environ 9. Bien que l'on caractérise les polyélectrolytes par un pKa, Pelton attire l'attention sur le fait que leur comportement reste très différent des monoacides ou monobases correspondants. Les groupes ionisés induisent des effets électrostatiques pouvant empêcher l'ionisation des groupes adjacents.⁶⁴

Les polymères pH-sensibles sont souvent associés à des polymères thermorépondants afin d'obtenir des systèmes multi-répondants, qui sont particulièrement utilisés dans le domaine biomédical.^{65,66}

Auto-assemblage des DHBC multi-répondants : pH- et thermosensibles

Etchenausia *et al.* ont synthétisé par RAFT des microgels de PVCL en présence du macro-CTA cationique poly (chlorure de [2-(acryloyloxy)éthyl]triméthylammonium) (PAETAC) terminé par un xanthate.⁶⁷ La structure cœur-couronne, avec la PVCL au cœur et les brosses cationiques de PAETAC en surface, a été confirmée par des mesures de relaxométrie T2 et de diffusion de

neutrons. Le caractère thermosensible de ces objets a été évalué par la mesure des diamètres hydrodynamiques (D_h) des particules à différentes températures. Des particules de 700 nm de diamètre hydrodynamique à 10 °C ont notamment subi une transition volumique lors de la déshydratation du cœur de PVCL qui s'est traduit par un diamètre à 50 °C de 200 nm.

Giaouzi *et al.* ont décrit la synthèse par RAFT de copolymères à blocs PNIPAM-PDMAEA de compositions variées et ont étudié leur comportement en solution à différents pH.⁶⁸ Leur étude physico-chimique, qui inclut de la diffusion de la lumière (DLS/SLS) et de la spectrofluorimétrie, a montré qu'à pH 3, lorsque le bloc pH-sensible est cationique, les agrégats formés au-delà de la LCST du PNIPAM sont de type vésiculaires, alors qu'à pH 7 et 10 les agrégats ont une structure cœur-couronne micellaire. En effet, la répulsion électrostatique des blocs PDMAEA chargés entraîne la formation de nano-objets plus grands avec un rayon hydrodynamique d'environ 120 nm à 50 °C à pH 3, contre 24 nm et 45 nm à pH 7 et 10 respectivement.

Des diblocs poly(chlorure de 3-acrylamidopropyltriméthylammonium)-poly(N-isopropylacrylamide) (PAPTAC-PNIPAM) ont été obtenus par polymérisation MADIX et caractérisés par Read *et al.*⁶⁹ Une température de point de trouble de 33 °C a été déterminée par DSC. A 25 °C, le copolymère cationique est présent à l'état unimoléculaire, le diamètre hydrodynamique mesuré par DLS de 5 nm étant en accord avec le rayon de giration de 5 nm déterminé par SAXS. Au-delà de la T_c , les objets formés ont un diamètre entre 80 et 120 nm (en fonction de la masse molaire du dibloc) et des mesures de potentiels- ζ ont permis d'identifier une structure cœur-couronne avec le PAPTAC positivement chargé à l'extérieur des objets.

Enfin, et pour faire le lien entre tous les exemples de polymères pH- et thermosensibles précédemment décrits, l'équipe de Mori a synthétisé pour la première fois le dibloc PVAm-PNIPAM en 2010.²⁶ Une brève caractérisation des propriétés physico-chimiques a été réalisée puis de nouveaux travaux ont illustré des applications de ce nouveau dibloc, notamment la formulation de nanoparticules réticulées pour l'optoélectronique en 2015.⁷⁰ Ce n'est qu'en 2021 qu'une caractérisation plus poussée a été réalisée dans leurs travaux sur la mise en forme de micelles polyplexes (complexe polymère/ADN).²⁹ Ils ont décrit l'assemblage spontané du copolymère double-hydrophile cationique à température ambiante sous la forme d'agrégats d'environ 80 nm de diamètre hydrodynamique, avec une fraction résiduelle d'unimères. Cette agrégation est expliquée par des liaisons hydrogène intermoléculaires entre la PVAm et le PNIPAM. Au-delà de la LCST, une unique population d'agrégats de D_h 120 nm est observée par DLS à pH 7, l'hypothèse de micelles sphériques composées d'un cœur de PNIPAM déshydraté et d'une couronne cationique de PVAm est faite en se basant sur les potentiels- ζ positifs.

Cette étude ne s'intéresse qu'à deux pH (7 et 11) avec un pKa supposé identique à celui de la PVAm (8.49) et la détermination de la température de point de trouble n'est pas explicitement décrite. De même, les hypothèses faites sur la morphologie des agrégats ne sont pas appuyées par des résultats expérimentaux de microscopie ou de diffusion de rayons X, par exemple. Ainsi, comme cela le sera expliqué en détails dans la partie suivante, nous proposons dans ces travaux une étude physico-chimique approfondie du comportement pH- et thermosensible du copolymère PVAm-PNIPAM.

4. Stratégie de la Partie 1

Dans le cadre de ces travaux de thèse, le polymère ciblé a pour vocation d'être utilisé pour modifier la surface de nanoparticules à base d'hydrogel. Il doit répondre à deux critères :

- Porter des fonctions chimiques permettant de le greffer à la surface des particules
- Etre thermorépondant afin d'apporter aux particules des propriétés thermosensibles

Afin de répondre à ce double objectif, nous proposons la synthèse d'un copolymère à blocs, dont chacun des blocs répond à un des critères.

Les nanoparticules étant recouvertes d'un assemblage de chitosane et d'alginate, elles présentent en surface des fonctions amines primaires et acides carboxyliques. Il serait donc intéressant de synthétiser un bloc polyaminé car en présence d'agents de couplage, les amines peuvent aussi bien réagir avec les acides qu'être réticulées entre elles.

Concernant le bloc thermorépondant, il s'agit de polymériser un monomère LCST dont les propriétés ont été expliquées précédemment. La cible de cette étude est donc un copolymère poly(aminé)-*b*-poly(thermosensible).

Une autre stratégie aurait été de synthétiser un homopolymère thermorépondant en utilisant un agent RAFT porteur d'une fonction amine, de manière à ce que les chaînes soient fonctionnalisées par un bout de chaîne aminé. Cependant, la stratégie du bloc polyaminé permettra d'augmenter l'efficacité du greffage du fait de sa plus grande fonctionnalité par rapport à un unique bout de chaîne.

Pour répondre au cahier des charges, nous proposons la synthèse par RAFT/MADIX d'un copolymère dibloc composé d'un premier bloc polyaminé à base de PVAm, et d'un second bloc thermosensible à base de PNIPAM. La voie d'accès proposée pour ce copolymère repose sur la polymérisation séquentielle RAFT du monomère N-vinyle NVPI puis du NIPAM pour obtenir le dibloc poly(vinyl phtalimide)-*b*-poly(N-isopropylacrylamide) (PVPI-*b*-PNIPAM), suivie de l'hydrazinolyse du bloc PVPI pour obtenir la PVAm.^{24,26}

Le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM est double-hydrophile à température ambiante, et devient amphiphile au-delà de sa température de point de trouble. De plus, il est pH-sensible de par son bloc polyaminé. Comme cela l'a été décrit dans l'étude bibliographique, les copolymères double-hydrophiles multi-répondants subissent des transitions de phase et des réarrangements de leur morphologie en réponse à des stimuli. Dans un premier temps, les caractéristiques physico-chimiques de ce copolymère, c'est-à-dire son pKa et sa température de point de trouble T_c , seront déterminées. Ensuite, et dans le but de mettre au point des conditions de greffage optimales, une étude de la physico-chimie du copolymère en solution sera réalisée par différentes techniques. L'un des objectifs de cette étude est de mettre en évidence l'influence du caractère pH-sensible du copolymère sur sa thermosensibilité et les conséquences sur l'auto-assemblage thermo-induit du copolymère en solution.

P1 – Chapitre 2 : Synthèse des copolymères à blocs PVAm_m-*b*-PNIPAM_n

1. Stratégie de synthèse

1. *Choix de l'agent de transfert de chaîne*

Le choix de l'agent de transfert de chaîne est essentiel en polymérisation RAFT comme cela l'a été décrit dans la revue de littérature. Dans l'optique de pouvoir transposer dans le futur la synthèse du dibloc poly(vinyl amine)-*b*-poly(thermosensible) à d'autres monomères thermosensibles tels que la N-vinyl caprolactame (NVCL), nous avons choisi d'utiliser un agent de transfert de type xanthate car ceux-ci permettent à la fois un bon contrôle du NIPAM et de la NVCL.⁷¹ Les xanthates ont l'avantage d'avoir une réactivité intermédiaire, ce qui permet de contrôler une large gamme de monomères pour la copolymérisation à blocs. En s'appuyant sur des résultats antérieurs obtenus dans l'équipe P3R du laboratoire des IMRCP, l'agent de transfert de chaîne RAFT/MADIX O-éthyl-S-(1-méthoxycarbonyl) éthyldithiocarbonate (Xanthate XA1) a été sélectionné pour la synthèse des diblocs PVAm-PNIPAM.^{55,69,72,73} Sa structure est présentée dans la Figure 8 ci-dessous. L'étude préliminaire de la copolymérisation de la NVCL étant un objectif secondaire de ces travaux, elle ne sera pas explicitée dans ce manuscrit.

2. *Schéma de la synthèse*

L'objectif de cette partie est la synthèse de copolymères à blocs PVAm_m-*b*-PNIPAM_n de masses molaires contrôlées avec m et n les degrés de polymérisations moyens en nombre respectifs des deux blocs. Dans un premier temps, le premier bloc PVPI_m-X est obtenu par polymérisation RAFT/MADIX du monomère NVPI en solution dans le DMF en présence de Xanthate XA1. Le copolymère PVPI_m-*b*-PNIPAM_n-X est obtenu par polymérisation du NIPAM dans le DMF à partir du macro-agent de transfert PVPI_m-X. Deux étapes de modification chimique post-polymérisation sont enfin réalisées. Tout d'abord, le bout de chaîne xanthaté est éliminé par un traitement radicalaire. Enfin, le premier bloc PVPI est déprotégé en présence d'hydrazine pour obtenir la poly(vinyl amine) et donc le copolymère PVAm_m-*b*-PNIPAM_n. La séquence de synthèse est résumée sur la Figure 8 ci-dessous :

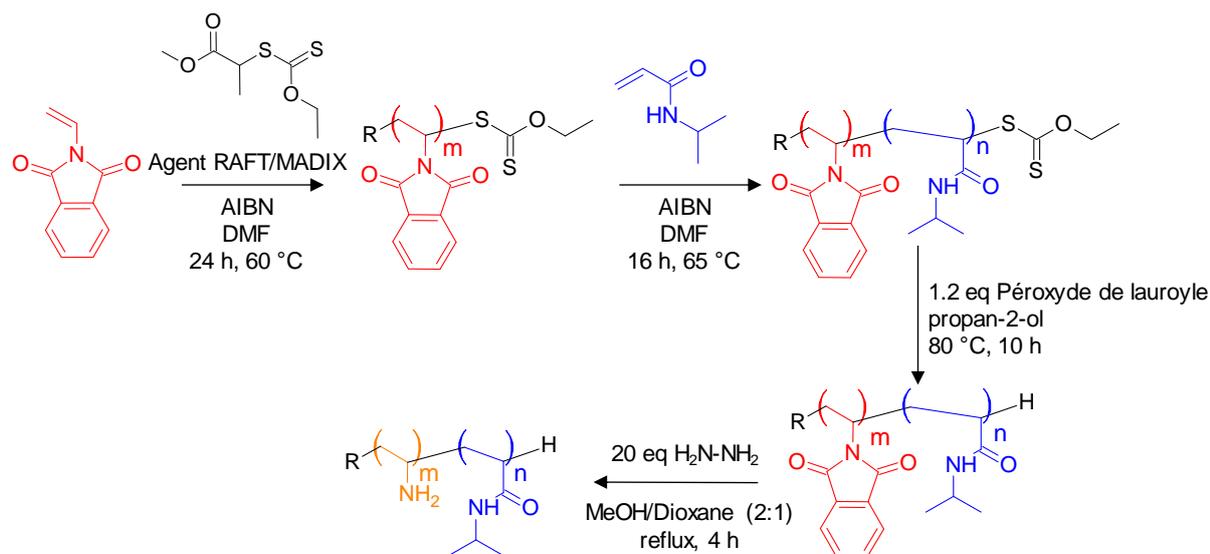


Figure 8 Séquence de synthèse des copolymères PVAm_m-b-PNIPAM_n

2. Synthèse du macro-agent de transfert PVPI_m-X

Les premiers blocs PVPI₁₀-X et PVPI₂₀-X ont été synthétisés selon le protocole de Mori *et al.*²⁴ Les quantités de CTA (Xanthate XA1) ont été modifiées pour que le degré de polymérisation visé soit 10 ou 20 selon la relation suivante : $DP_{n,visé} = \frac{[M]_0}{[CTA]_0}$ où $[M]_0$ représente la concentration initiale en monomère, en l'occurrence NVPI en solution dans le DMF, et $[CTA]_0$ la concentration initiale en XA1. La quantité d'amorceur introduite est gardée constante par rapport au monomère dans les proportions déterminées après optimisation. Typiquement, pour les DP_n visés de 10 et 20, les proportions utilisées sont les suivantes :

Tableau 2 Proportions Monomère/CTA/Amorceur pour la synthèse des macro-CTA PVPI_m-X

	DP_n visé	Eq. mol NVPI	Eq. mol XA1	Eq. mol Amorceur
PVPI ₁₀ -X	10	1,000	0,100	0,015
PVPI ₂₀ -X	20	1,000	0,050	0,015

Les polymérisations de NVPI sont réalisées à 60 °C pendant 24 h dans le DMF. Un échantillon du brut réactionnel est prélevé afin d'en déterminer par résonance magnétique nucléaire (RMN) la conversion en monomère. Le polymère est précipité dans l'éther diéthylique puis filtré et séché sous vide. Le polymère précipité est alors caractérisé par RMN ¹H dans le DMSO-d₆ tel qu'illustré dans la Figure 9 ci-dessous :

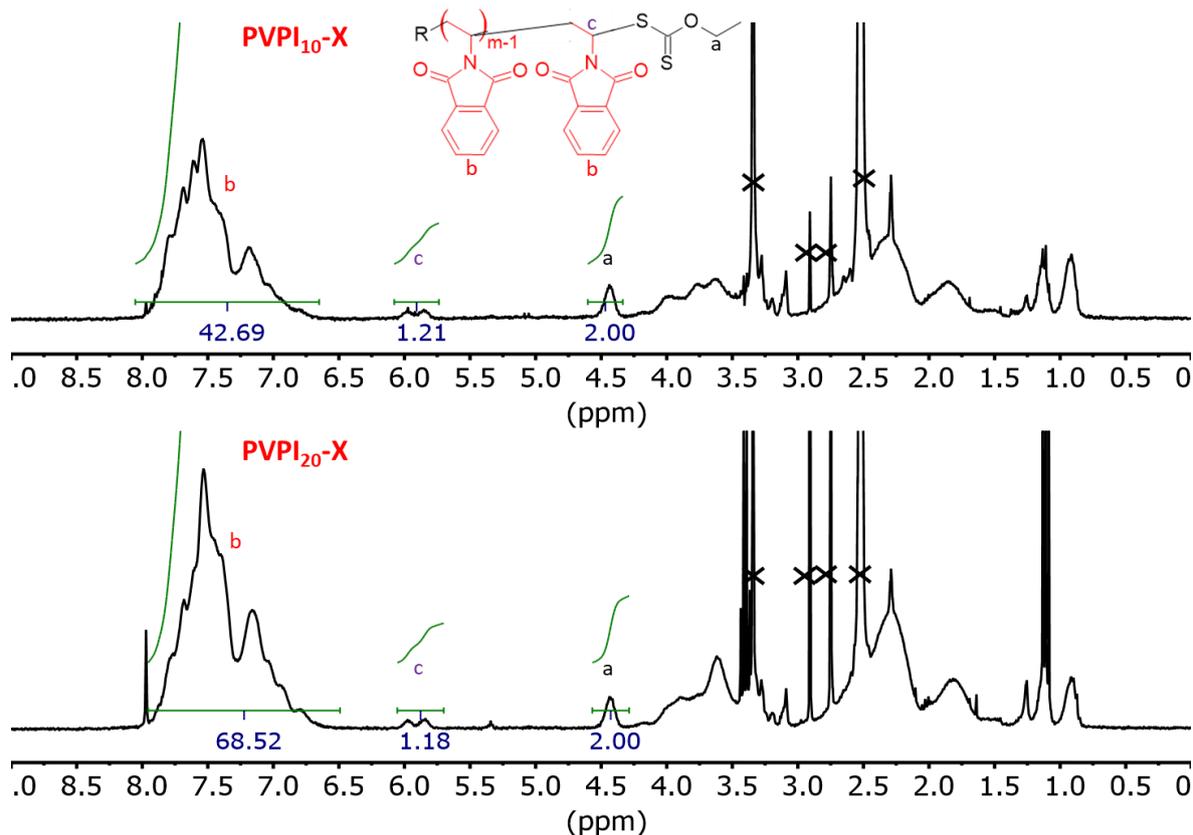


Figure 9 Spectres RMN ^1H à 300 MHz dans le DMSO- d_6 des macro-CTA PVPI $_{10}$ -X en haut et PVPI $_{20}$ -X en bas

Ces spectres présentent de larges signaux caractéristiques des polymères, l'attribution des différents protons permettra le calcul du degré de polymérisation $DP_{n,RMN}$ et de la masse molaire moyenne en nombre $M_{n,RMN}$ dans le Tableau 4. Le groupe de protons **a** à 4.5 ppm est attribué par comparaison au spectre RMN ^1H du xanthate XA1 (Annexe1). Entre 8 et 6.5 ppm se trouvent les protons aromatiques des unités phthalimide notés **b**. Chaque chaîne étant porteuse d'un xanthate, le ratio des intégrales pondérées par le nombre de protons qu'elles intègrent, soit $\frac{b/4}{a/2}$, correspond au nombre d'unités phthalimide par unité de xanthate et donc au degré de polymérisation. A 5,8-6,0 ppm se trouve le signal du proton **c** (méthine) sur l'unité monomère terminale liée au xanthate. Si chaque chaîne est porteuse d'une fonction xanthate, on devrait retrouver autant de protons **c** que de xanthate ($a/2$), c'est-à-dire un ratio $c/a = 1/2$. Dans notre cas, c/a vaut 0,6 pour les deux spectres, ce qui est proche du ratio théorique attendu.

Les premiers blocs PVPI $_{10}$ -X et PVPI $_{20}$ -X sont également caractérisés par SEC dans le DMF contenant 10 mM de LiBr. Le rôle du sel dans le solvant d'éluion est d'écranter les chaînes de polymères les unes des autres et donc de permettre une meilleure séparation lors de l'éluion. La triple détection incluant la diffusion de la lumière (*multi-angle light scattering*, MALS) donne accès aux masses molaires absolues, calculées à partir des valeurs d'incrément d'indice de réfraction

dn/dc du couple monomère/solvant. Les synthèses réalisées sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 Détails des synthèses par polymérisation RAFT/MADIX des macro-agents de transfert PVPI₁₀-X et PVPI₂₀-X

Polymère	DP _n visé	M _{n,visé} (g/mol)	Conversion NVPI ^a (%)	M _{n,th} ^b (g/mol)	DP _n RMN ^c	M _{n,RMN} ^d (g/mol)	M _{n,MALS} ^e (g/mol)	D
PVPI ₁₀ -X	10	2000	80	1700	11	2110	2750	1,11
PVPI ₂₀ -X	20	3700	87	3300	17	3148	3900	1,14

Dans ce tableau, les valeurs suivantes sont déterminées tel que décrit ci-dessous :
a) La conversion en NVPI est déterminée par RMN ¹H du brut réactionnel tel que détaillé dans le Chapitre 4, page 89;

b) M_n théorique calculé tel que $M_{n,th} = [M]_0/[CTA]_0 * conv * M_M + M_{CTA}$;

c) DP_{n,RMN} est déterminé par RMN ¹H (Figure 9) du polymère précipité tel que $DP_{n,RMN} = \frac{b/A}{a/2}$;

d) M_{n,RMN} est déterminé tel que $M_{n,RMN} = DP_{n,RMN} * M_{NVPI} + M_{XA1}$;

e) M_{n,MALS} est déterminé par SEC-RI-MALS avec dn/dc_{PVPI} = 0.153 mL/g ;

Les conversions en NVPI à l'issue des deux polymérisations (PVPI₁₀-X and PVPI₂₀-X) sont supérieures à 80%. Les valeurs de M_{n,RMN} (2110 g/mol pour PVPI₁₀-X et 3148 g/mol pour PVPI₂₀-X respectivement) sont en accord avec la théorie (1700 g/mol et 330 g/mol respectivement). Les valeurs de M_{n,MALS} de 2750 g/mol et 3900 g/mol pour PVPI₁₀-X et PVPI₂₀-X respectivement sont légèrement supérieures aux valeurs attendues, ce que l'on peut probablement expliquer par la faible intensité diffusée dans la région des plus faibles masses, ce qui a tendance à surestimer M_n. Les dispersités sont, quant à elles, inférieures à 1,14 pour les deux polymérisations ce qui atteste d'un bon contrôle du premier bloc par le CTA XA1. Le chromatogramme SEC-RI du polymère PVPI₂₀-X en Annexe 2 présente toutefois une dissymétrie qui semble indiquer une sous-population, mais celle-ci n'affecte pas significativement la dispersité.

3. Synthèse par polymérisation RAFT/MADIX des diblocs PVPI_m-b-PNIPAM_n-X

1. Essais préliminaires d'extension de chaîne

L'efficacité du premier bloc PVPI_m-X en tant que macro-CTA a été vérifiée par une extension de chaîne avec le monomère NVPI en présence du macro-CTA PVPI₁₀-X avec un ratio initial $[M]_0/[CTA]_0 = 30$. La polymérisation a été menée à 60 °C pendant 24 h. La conversion en monomère a été estimée par RMN à 83 %, la valeur de DP_{n,RMN} est estimée à 33, soit M_{n,RMN} = 5900 g/mol (M_{n,th} = 5400 g/mol). La SEC a permis de confirmer l'extension de chaîne telle que le montre la Figure 10 ci-dessous:

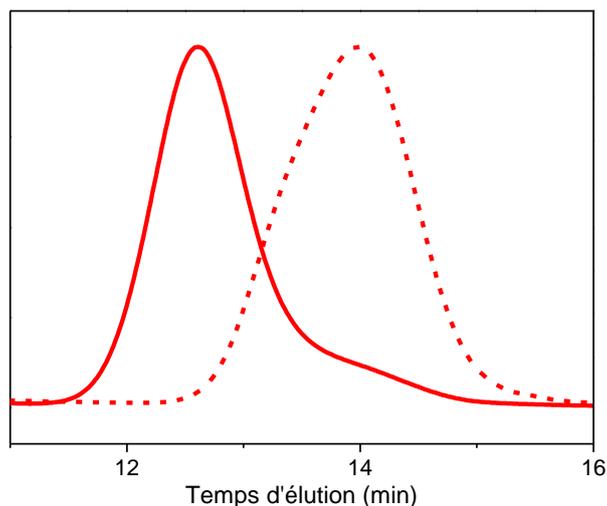


Figure 10 : Chromatogrammes SEC-RI du macro-amorceur PVPI₁₀-X (trait pointillés) et de l'homopolymère PVPI₅₀-X après extension de chaîne (trait plein)

Le décalage du signal RI vers les faibles temps d'éluion, c'est-à-dire vers les grandes masses molaires, confirme en effet l'extension de chaîne du macro-CTA PVPI₁₀-X. $M_{n,MALS}$ est estimé à 8900 g/mol, avec une dispersité $\mathcal{D} = 1,25$. Cette extension de chaîne réussie nous confirme ainsi le caractère contrôlé de la polymérisation en présence du xanthate XA1.

3. Copolymérisation du dibloc PVPI₁₀-b-PNIPAM₅₀-X

Suite aux résultats préliminaires d'extension de chaîne, le premier bloc PVPI₁₀-X a été utilisé comme macro-CTA lors de la polymérisation du NIPAM. A l'issue de cette copolymérisation de 16 h à 65 °C dans le DMF, le brut réactionnel a été analysé par RMN ¹H pour la détermination de la conversion du NIPAM. Enfin, le copolymère a été précipité, filtré et séché avant d'être à

nouveau caractérisé par RMN ^1H et SEC. Le spectre RMN ^1H du copolymère PVPI $_{10}$ -*b*-PNIPAM $_{50}$ -X est le suivant :

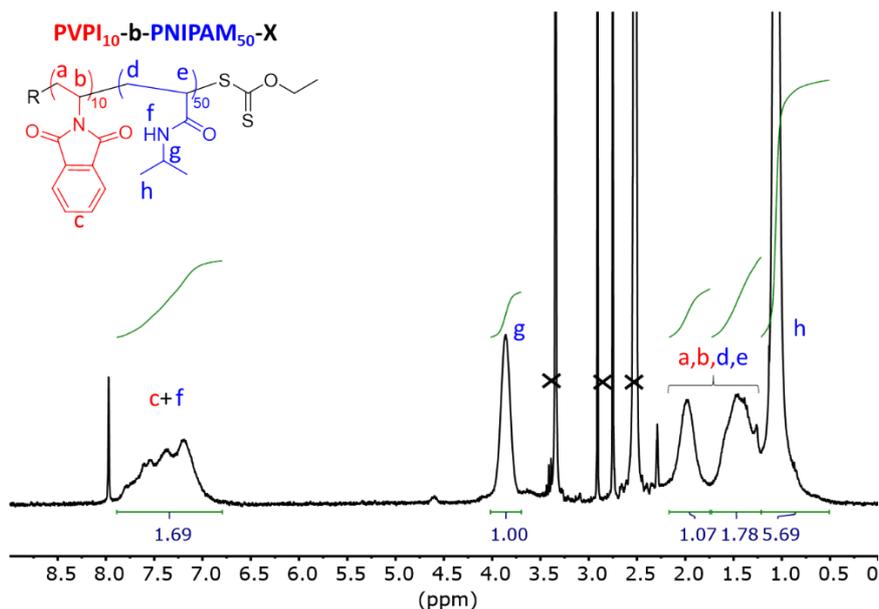


Figure 11 Spectre RMN ^1H à 300 MHz du copolymère PVPI $_{10}$ -*b*-PNIPAM $_{50}$ -X

Les protons du PNIPAM sont identifiables par comparaison avec la RMN ^1H du NIPAM en Annexe 3. Les protons aromatiques **c** du bloc PVPI sont confondus dans le massif entre 6,6 et 7,8 ppm avec le proton amide du PNIPAM **f**. Pour obtenir la composition du dibloc, la contribution du proton **f** doit être soustraite à l'intégrale du massif. Les protons **g** et **f** intègrent chacun pour 1 donc la contribution du bloc PVPI, qui compte $DP_{n,\text{RMN,PVPI}_{10}\text{-X}} * 4$ protons, dans le massif est $(\mathbf{c+f-g})$. Le degré de polymérisation du bloc PNIPAM est alors obtenu par le rapport $(DP_{n,\text{RMN,PVPI}_{10}\text{-X}} * 4) / \mathbf{c}$ comme précisé dans le Tableau 3. L'extension de chaîne a été confirmée par SEC comme le montre la Figure 12 ci-dessous:

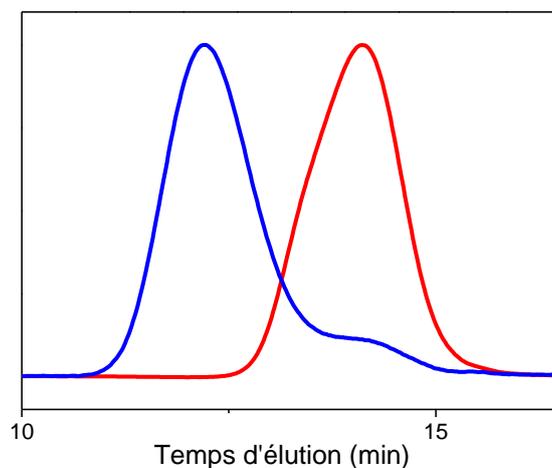


Figure 12 Chromatogrammes SEC-RI du macro-CTA PVPI $_{10}$ -X (rouge) et du copolymère PVPI $_{10}$ -*b*-PNIPAM $_{50}$ -X (bleu)

Le signal RI du macro-CTA en rouge aux temps d'éluion élevés laisse place au signal RI du dibloc en bleu vers un temps d'éluion inférieur, confirmant l'extension de chaîne. Les caractéristiques du dibloc obtenu sont données dans le Tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3: Détails de la synthèse du dibloc à partir du macro-CTA PVPI₁₀-X

Polymère	DP _{n,visé}	M _{n,visé} (g/mol)	Conversion monomère ^a (%)	M _{n,th} ^b (g/mol)	DP _{n,RMN}	M _{n,RMN} (g/mol)	M _{n,MALS} ^d (g/mol)	Đ
PVPI ₁₀ -X	10	2000	80	1700	11	2110	2750	1,11
PVPI ₁₀ -b- PNIPAM ₅₀ X	50	7600	> 99	7600	64 ^c	9342 ^d	6900	1,72

Dans ce tableau, les valeurs suivantes sont déterminées tel que décrit ci-dessous :
 a) La conversion est déterminée par RMN ¹H du brut réactionnel tel que détaillé dans le Chapitre 4, page 89;

b) M_n théorique est calculé tel que $M_{n,th} = [M]_0/[CTA]_0 * conv * M_M + M_{CTA}$;

c) DP_{n,RMN} est déterminé par RMN ¹H (Figure 11) du polymère précipité tel que $DP_{n,RMN} = (DP_{n,RMN,PVPI10-X} * 4) / (c+f-g)$;

d) M_{n,RMN} est déterminé tel que $M_{n,RMN} = DP_{n,RMN} * M_{NIPAM} + M_{PVPI10-X}$;

e) M_{n,MALS} est déterminé par SEC-RI-MALS avec $dn/dc_{PVPI} = 0.153$ mL/g, $dn/dc_{PVPI-b-PNIPAM} = 0.103$ mL/g ;

La conversion du NIPAM est supérieure à 99% ce qui est conforme avec une polymérisation du NIPAM contrôlée par un xanthate dans ces conditions opératoires.⁷⁴ M_{n,MALS} est en accord avec la valeur théorique. La dispersité du dibloc est bien supérieure à celle du premier bloc. Les chromatogrammes SEC-RI confirment cette dispersité puisqu'un épaulement est clairement distinguable sur la Figure 12. Cet épaulement fera l'objet d'une étude dans la suite de cette partie.

Etude cinétique de la polymérisation

Une étude cinétique de la synthèse du dibloc PVPI₁₀-b-PNIPAM₅₀-X a été menée pendant 10 h à 65 °C. Les valeurs de M_n et les dispersités ont été mesurées par SEC et la conversion du NIPAM suivie par RMN sur des échantillons de bruts réactionnels prélevés au cours de la polymérisation. Les résultats de cette étude cinétique sont représentés dans la Figure 13. La Figure 13a qui représente la conversion du NIPAM dans le temps, indique que la polymérisation est rapide et permet d'atteindre une conversion supérieure à 90 % en moins de 4 h à 65 °C. Les M_n des copolymères obtenus augmentent linéairement avec la conversion comme le montre la Figure 13b. Les dispersités associées restent inférieures à 1,4 au cours de la réaction ce qui suggère que le macro-CTA PVPI₁₀-X apporte un bon contrôle de la polymérisation du NIPAM dans

ces conditions. On remarque que la dispersité à $t = 10$ h de la cinétique est inférieure à celle du lot synthétisé précédemment (Tableau 3, $\bar{D} = 1,72$).

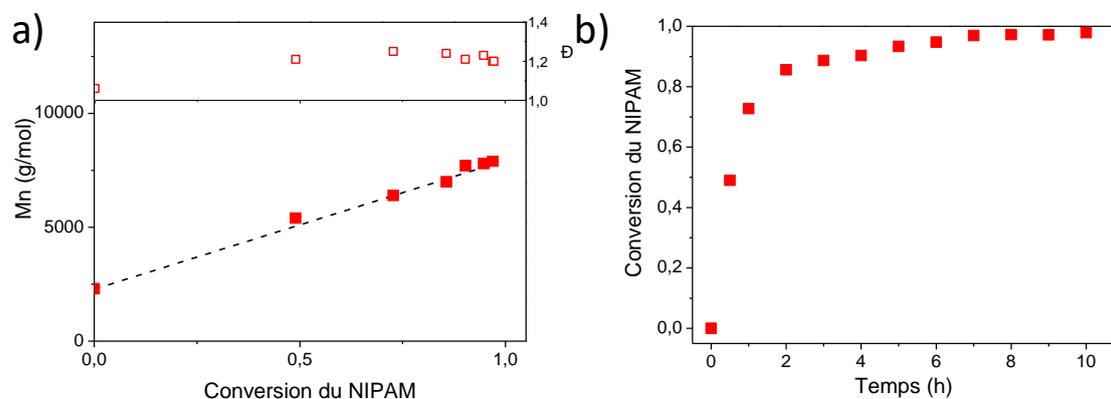


Figure 13 Evolution de (a) la conversion du NIPAM en fonction du temps, (b) La masse molaire moyenne en nombre et la dispersité en fonction de la conversion du NIPAM, Conditions de réaction: $[NIPAM]_0/[PVPI_{10-X}]_0/[AIBN]_0 = 1/0.02/0.004$

L'extension de chaîne au cours de la polymérisation a été suivie grâce à la détection SEC-UV à 254 nm (Figure 14). En effet, le bloc PVPI absorbant à cette longueur d'onde, il est possible de suivre la consommation du macro-CTA et de visualiser la formation du dibloc.

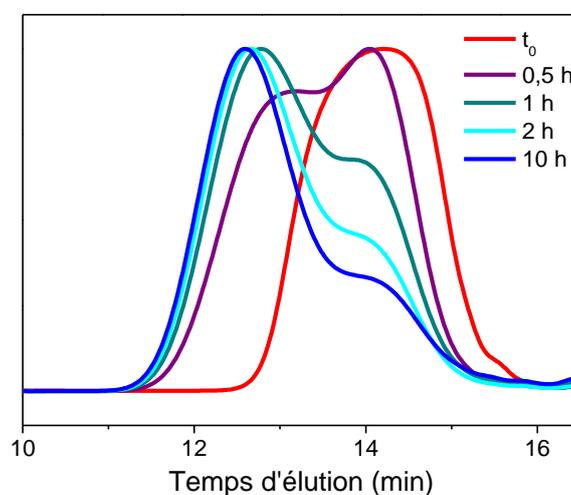


Figure 14 Chromatogrammes SEC-UV à 254 nm du suivi cinétique de la copolymérisation, du macro-CTA PVPI_{10-X} (rouge) jusqu'au copolymère final (bleu) après 10 h de réaction et 98 % de conversion

La polymérisation du NIPAM en présence du macro-CTA PVPI_{10-X} a été suivie par analyse SEC-UV à 254 nm pour observer sélectivement l'évolution du bloc PVPI qui absorbe à cette longueur d'onde, du fait du cycle aromatique présent sur chaque unité monomère. Après 10 h de polymérisation et une conversion du NIPAM de 98 %, le signal de SEC-UV montre clairement une double distribution. Celle-ci traduit la présence d'une quantité significative de premier bloc PVPI_{10-X} n'ayant pas réamorcé la polymérisation. L'évolution des signaux SEC-UV dans le temps

indique une faible réactivité du premier bloc qui disparaît progressivement pour laisser place au copolymère correspondant qui se forme jusqu'à la conversion totale du NIPAM. La double distribution observée à 10 h malgré la conversion totale du monomère est en accord avec la synthèse précédente du dibloc qui présentait ce même épaulement sur la trace SEC-UV.

Estimation de la quantité de premier bloc résiduel

L'étude cinétique ayant permis de mettre en évidence cette fraction de premier bloc non réagi, il est apparu nécessaire de quantifier ce ratio homopolymère/copolymère. Dans un premier temps, une première estimation a été réalisée et la droite d'étalonnage de l'homopolymère PVPI₁₀-X à différentes concentrations en fonction du maximum d'intensité du signal RI a été tracée. En effet, l'intensité du signal RI est proportionnelle à la concentration massique du polymère en solution. Ici, la gamme d'étalonnage s'étend de 0 à 2,4 mg/mL (Figure 15a).

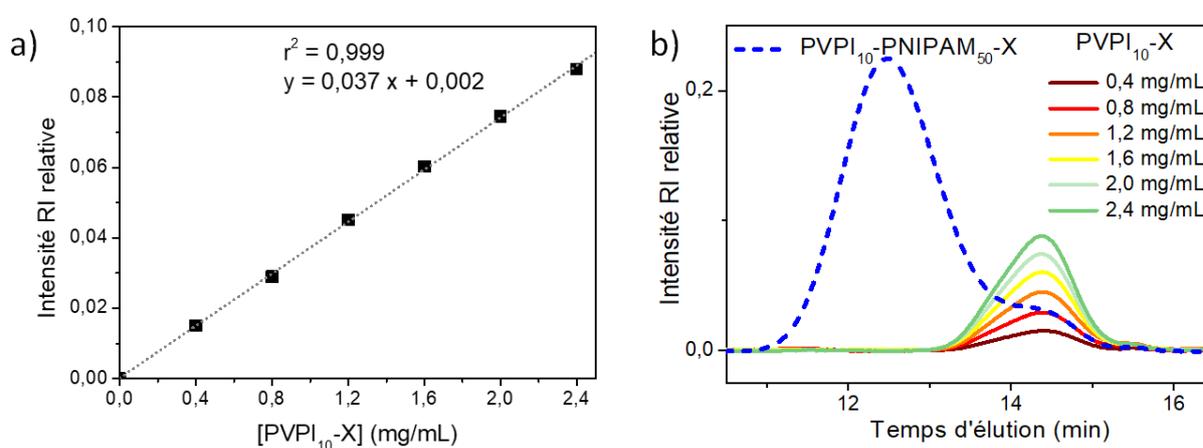


Figure 15 a) Droite d'étalonnage de l'intensité RI en fonction de la concentration en PVPI₁₀-X ; b) Estimation de la concentration en PVPI₁₀-X dans le mélange PVPI₁₀-X / PVPI₁₀-b-PNIPAM₅₀-X par rapport à la gamme d'étalonnage

Ensuite, le signal RI du copolymère PVPI₁₀-b-PNIPAM₅₀-X est superposé aux signaux RI de l'étalonnage et confirme que le signal d'intérêt est dans la gamme de linéarité de l'étalonnage (Figure 15b). L'épaulement du signal dû au premier bloc non-réagi se superpose avec la courbe de PVPI₁₀-X à 0,8 mg/mL. Cela correspond à un ratio massique de 16%_m de PVPI₁₀-X dans le mélange homopolymère/copolymère.

Une conversion en moles est possible puisque la fraction de PVPI₁₀-X initialement introduite dans le réacteur est connue et qu'il n'y a pas de perte de masse en polymérisation radicalaire. La fraction massique initiale PVPI₁₀-X₀ est de 25%_m. Dans la fraction injectée en SEC (50 µL à 5 mg/mL soit 250 µg de mélange), la quantité PVPI₁₀-X₀ représente 64 µg de macro-CTA. Dans l'échantillon d'intérêt, il en reste 40 µg en fin de polymérisation. La proportion d'homopolymère résiduel est alors estimée à 60%_{mol}, soit 60% des chaînes de macro-CTA initialement introduites qui n'ont pas réamorcé de polymérisation.

Ce résultat soulève la question de la proportion des chaînes de macro-CTA PVPI₁₀-X qui sont effectivement porteuses d'un bout de chaîne xanthaté. La présence du xanthate est généralement vérifiée par SEC-UV à la longueur d'onde caractéristique de 290 nm, mais le poly(vinyl phtalimide) absorbe le rayonnement UV de 250 nm à 315 nm ce qui masque la contribution du xanthate. Il est cependant peu probable que les 56%_{mol} de chaînes non réamorçées soient dépourvues du bout de chaîne au vu des conditions expérimentales. Ce résultat confirme donc les travaux de Mori qui décrivent une faible constante de transfert C_{tr} du macro-CTA PVPI₁₀-X pour la polymérisation du NIPAM.²⁶

Optimisation de la polymérisation en réacteur semi-fermé

L'étude cinétique de la polymérisation du NIPAM en présence de PVPI₁₀ X a permis de mettre en évidence un réamorçage difficile de la polymérisation par le macro-CTA PVPI₁₀-X dans des conditions de réacteur fermé. La polymérisation en réacteur semi-fermé, ou semi-batch, est un procédé fréquemment utilisé pour s'affranchir des problématiques liées à des réamorçages lents.^{8,75} Cela consiste à introduire l'un des réactifs tout au long de la réaction, typiquement le monomère dans le cas de la polymérisation. La concentration en monomère dans le réacteur est donc faible à tout moment de la polymérisation, on parle de conditions « affamées » en monomère.

La synthèse en réacteur semi-fermé du dibloc PVPI₁₀-*b*-PNIPAM₅₀-X a été réalisée via l'ajout du NIPAM en solution dans le DMF à l'aide d'une seringue à débit contrôlé, dans le réacteur contenant le macro-CTA PVPI₁₀-X et l'AIBN solubilisés dans le DMF à 65 °C. Le NIPAM a été ajouté à un débit de 0.5 g/h sur une période de 8 h, la réaction a été maintenue 30 min à 65 °C après la fin de l'ajout du monomère. Des prélèvements du brut réactionnel ont été réalisés à 2h30, 5h30 et 8h30 afin de déterminer la conversion du NIPAM par RMN (Figure 16). Après 8 h de réaction, la conversion atteint 90 % ce qui est satisfaisant bien qu'elle a atteint 99 % au même temps en réacteur fermé.

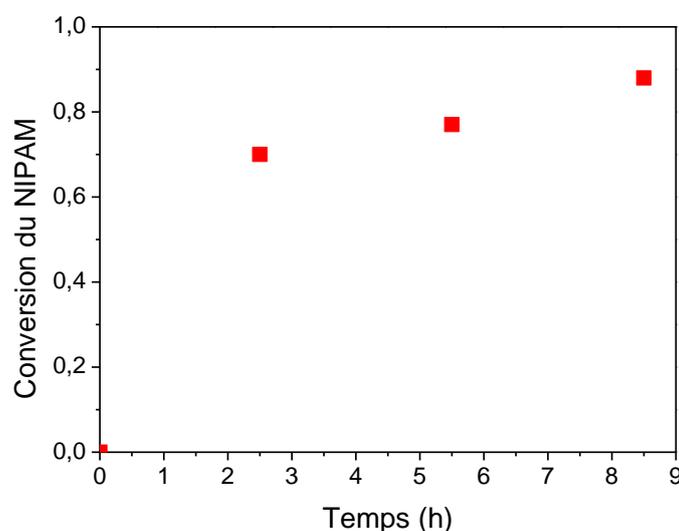


Figure 16 Conversion du NIPAM en fonction du temps lors de la synthèse du dibloc PVPI₁₀-b-PNIPAM₅₀-X en réacteur semi-fermé

La SEC du dibloc précipité (Figure 17) nous indique cependant la présence du même épaulement que lors de la synthèse en réacteur fermé. Les conditions semi-fermées n'ont donc pas eu les effets d'optimisation attendu sur le réamorçage de la polymérisation par le macro-CTA.

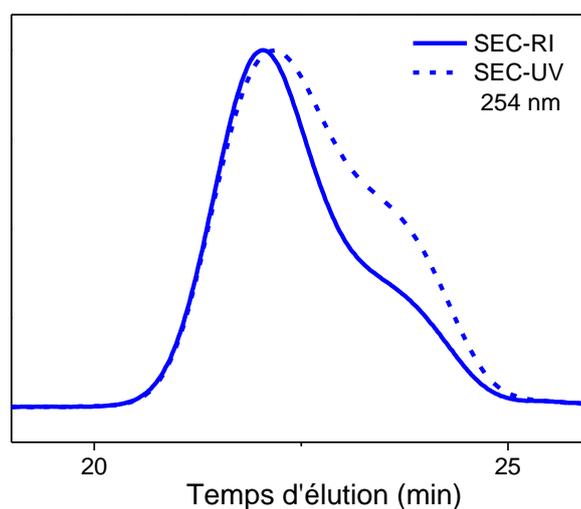


Figure 17 Chromatogrammes SEC-RI (trait plein) et SEC-UV 254 nm (trait pointillé) du copolymère PVPI₁₀-b-PNIPAM₅₀-X après 8 h 30 de polymérisation en réacteur semi-fermé

L'optimisation des conditions de synthèse en réacteur semi-fermé n'étant pas un objectif principal de ces travaux, cette étude n'a pas été approfondie. La polymérisation semi-batch reste néanmoins une perspective d'optimisation pour la synthèse du copolymère à blocs PVPI₁₀-b-PNIPAM₅₀-X.

Élimination du bout de chaîne xanthaté

À l'issue de la synthèse du dibloc PVPI₁₀-b-PNIPAM₅₀-X, le bout de chaîne xanthaté est éliminé par une réaction radicalaire en présence de peroxyde de lauroyle (LPO) et d'isopropanol, cette méthode est décrite dans la littérature.⁷⁶ Cette étape est essentielle pour éviter la formation de thiols en bout de chaîne pendant l'hydrazinolyse qui pourraient mener à la formation de copolymères triblocs par l'oxydation des thiols en ponts disulfures (Figure 18)

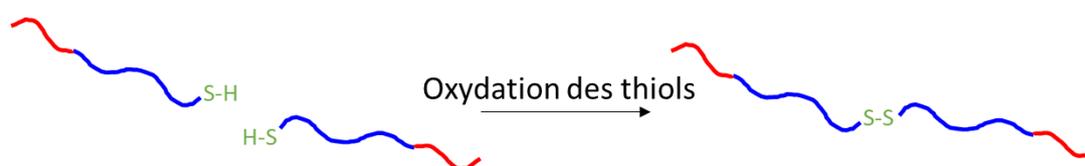


Figure 18 Représentation schématique de l'oxydation parasite des thiols en ponts disulfures pouvant mener à la formation de copolymères triblocs

Hydrazinolyse du bloc PVPI

Finalement, pour mener à bien l'hydrazinolyse du bloc PVPI, de l'hydrazine a été introduite en excès par rapport aux unités molaires de phtalimide (20eq :1eq). Après 6 h de reflux à 80-85 °C dans un mélange de méthanol/dioxane en proportions volumiques 2/1 ; une analyse RMN ^1H a permis de montrer la disparition des protons aromatiques du phtalimide. (Figure 19).²⁴

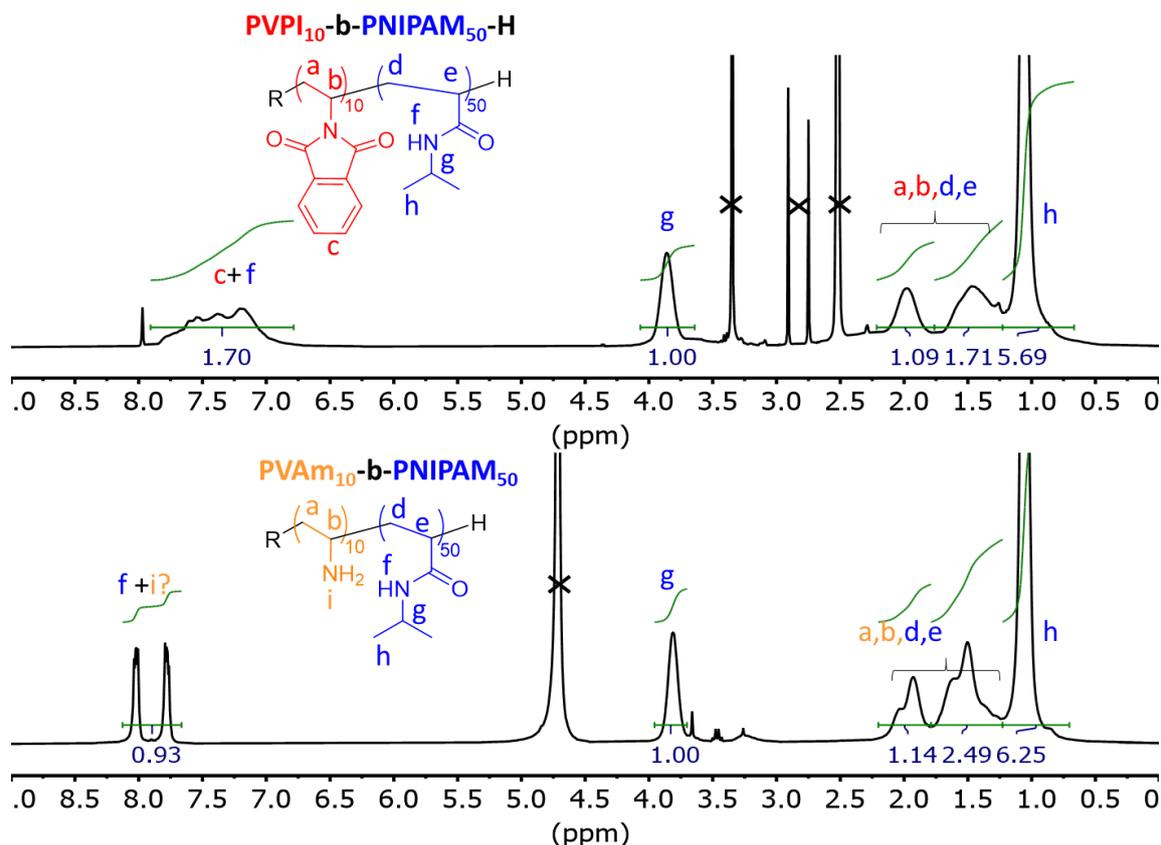


Figure 19 Spectres RMN ^1H à 300 MHz du copolymère $\text{PVPI}_{10}\text{-}b\text{-PNIPAM}_{50}\text{-H}$ dans le $\text{DMSO-}d_6$ (en haut), et du copolymère $\text{PVAm}_{10}\text{-}b\text{-PNIPAM}_{50}$ dans le D_2O (en bas)

Ceux-ci résonnent dans le massif à 7,5 ppm sur le spectre du dibloc $\text{PVPI}_{10}\text{-}b\text{-PNIPAM}_{50}$ et sont absents sur le spectre du dibloc déprotégé, ce qui confirme une hydrazinolyse efficace et donc l'obtention du copolymère $\text{PVAm}_{10}\text{-}b\text{-PNIPAM}_{50}$.

La valeur de M_n du copolymère $\text{PVAm}_{10}\text{-}b\text{-PNIPAM}_{50}$ a été calculée à partir du DP_n mesuré du bloc PVPI (Tableau 3) et de la masse molaire de l'unité répétitive vinyl amine (43 g/mol) et vaut 7700 g/mol.

4. Synthèse du dibloc $\text{PVPI}_{20}\text{-}b\text{-PNIPAM}_{100}\text{-X}$

Pour étudier l'influence de la masse molaire sur les propriétés d'auto-assemblage du copolymère $\text{PVAm}_m\text{-}b\text{-PNIPAM}_n$, un copolymère homothétique a été synthétisé, c'est-à-dire qu'il a les mêmes composition et structure mais sa longueur de chaîne est doublée. Le copolymère dibloc

PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ a été obtenu par copolymérisation du NIPAM à partir du macro-CTA PVPI₂₀-X en ajustant le ratio macro-CTA/NIPAM tel que le DP_n visé soit de 100. La conversion du monomère a été déterminée par RMN (Annexe 4), la masse molaire et la dispersité par SEC (Figure 20).

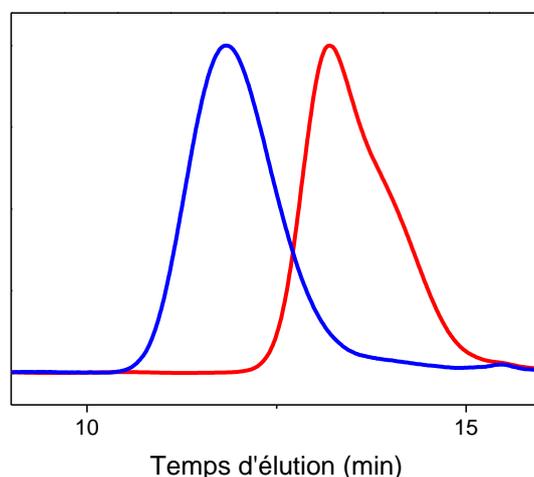


Figure 20 Chromatogrammes RI du macro-CTA PVPI₂₀-X (rouge) et du copolymère PVPI₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀-X obtenu après l'extension de chaîne

Le chromatogramme RI confirme ainsi l'extension de chaîne de la copolymérisation. Les détails de la copolymérisation sont explicités dans le Tableau 4 ci-dessous :

Tableau 4 Détails de la polymérisation du dibloc PVPI₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀-X à partir du macro-CTA PVPI₂₀-X

Polymère	DP_n visé	M_n visé (g/mol)	Conversion monomère ^a (%)	$M_{n,th}$ ^b (g/mol)	$DP_{n,RMN}$ ^c	$M_{n,RMN}$ ^d (g/mol)	M_n ,MALSe (g/mol)	\mathcal{D}
PVPI ₂₀ -X	20	3700	87	3300	17	3148	3900	1,14
PVPI ₂₀ - <i>b</i> -PNIPAM ₁₀₀ X	101	14700	97	14400	110	15578	15400	1,25

Dans ce tableau, les valeurs suivantes sont déterminées tel que décrit ci-dessous :

a) La conversion est déterminée par RMN ¹H du brut réactionnel tel que détaillé dans le Chapitre 4, page 89 ;

b) M_n théorique est calculé tel que $M_{n,th} = [M]_0/[CTA]_0 \cdot conv \cdot M_M + M_{CTA}$;

c) $DP_{n,RMN}$ est déterminé par RMN ¹H (Annexe 4) du polymère précipité tel que

$$DP_{n,RMN} = (c + f - g) / (DP_{n,RMN,PVPI10-X} \cdot 4) ;$$

d) $M_{n,RMN}$ est déterminé tel que $M_{n,RMN} = DP_{n,RMN} \cdot M_{NIPAM} + M_{PVPI10-X}$;

e) M_n ,MALSe est déterminé par SEC-MALS-RI avec $dn/dc_{PVPI} = 0.153 \text{ mL/g}$, $dn/dc_{PVPI-b-PNIPAM} = 0.103 \text{ mL/g}$

Il est intéressant de noter l'absence d'épaulement sur le signal RI du copolymère, ce qui suggère un meilleur réamorçage de la polymérisation avec le macro-CTA de DP_n 20. Aucune hypothèse ne permet d'expliquer cette différence de réactivité entre les deux macro-CTA à ce jour. L'élimination du xanthate terminal et l'hydrazinolyse ont été réalisés selon les mêmes procédures que pour le dibloc PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀; le spectre RMN ¹H en Annexe 4 confirme la disparition des protons aromatiques du bloc PVPI.

La masse molaire du copolymère PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ a été calculée à partir du DP_n mesuré du bloc PVPI (Tableau 4) et de la masse molaire de l'unité répétitive vinyl amine (43 g/mol) et vaut 13200 g/mol.

5. Reproduction et changement d'échelle

Chacune des synthèses précédemment décrites a été reproduite et mise en œuvre sur des lots de différentes quantités. Concernant les polymérisations, des premiers lots inférieurs à 1 g ont été synthétisés puis les proportions ont été augmentées jusqu'à des lots de plusieurs grammes, jusqu'à 30 g pour le dibloc PVPI₁₀-*b*-PNIPAM₅₀-X. Pour chacune de ces polymérisations, la conversion du monomère, NVPI pour les premiers blocs et NIPAM pour les diblocs, a été répertoriée dans le Tableau 5 ci-dessous. Celui-ci n'est pas exhaustif et ne présente qu'une fraction des synthèses réalisées, cependant la reproductibilité est très bonne à cette échelle de production et donc tous les lots ont été satisfaisants.

Tableau 5 Reproduction et changement d'échelle des polymérisations

		Masse de polymère obtenue	conversion M (%)
PVPI_m-X	PVPI ₁₀ -X	590 mg	94
		10.1 g	92
	PVPI ₂₀ -X	270 mg	90
		1,1 g	87
PVPI_m-	PVPI ₁₀ - <i>b</i> -PNIPAM ₅₀ -X	430 mg	98
		32.4 g	99
	PVPI ₂₀ - <i>b</i> -PNIPAM ₁₀₀ -X	360 mg	99
		2.5 g	98

Les conversions des blocs PVPI de DP_n 10 et 20 sont de l'ordre de 90 % sur tous les lots donc l'augmentation des quantités n'a pas impacté l'efficacité de la polymérisation. De même pour les diblocs, la conversion du NIPAM est excellente (supérieure à 98 %) dans toutes les polymérisations effectuées.

Concernant les diblocs polyaminés obtenus après les traitements post-polymérisations, plusieurs lots ont été obtenus pour les diblocs PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ et PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ (respectivement 5 et 2 lots). Ces lots ont été caractérisés par RMN ¹H et ne présentent pas de différences.

La reproduction de ces synthèses nous confirme donc que celles-ci sont bien maîtrisées et répétibles.

4. Synthèse des diblocs PVAm_m-b-P(NIPAM-stat-NVC)_n-X

Les diblocs PVAm_m-b-PNIPAM_n ont pour vocation d'être utilisés pour fonctionnaliser la surface de nanoparticules de polysaccharides. Afin de mettre en évidence la présence du copolymère à la surface des nanoparticules, un copolymère similaire mais fluorescent a été synthétisé pour l'utiliser à l'image d'un marqueur fluorescent. Un copolymère à bloc à base de N-vinyl carbazole (NVC) et de NIPAM a été décrit dans la littérature par l'équipe de S. Perrier.³⁶ Leurs travaux démontrent que 4% de NVC copolymérisés statistiquement au sein du bloc PNIPAM permettent d'obtenir des propriétés de fluorescence de leurs micelles thermosensibles. Ainsi, les copolymères PVAm₁₀-b-P(NIPAM-stat-NVC)₅₀ et PVAm₂₀-b-P(NIPAM-stat-NVC)₁₀₀ ont été synthétisés par copolymérisation statistique d'un mélange de NIPAM et de NVC (dont 8%_{mol} de NVC) à partir des macro-CTA PVPI₁₀-X et PVPI₂₀-X respectivement. La conversion en monomères est quasi-totale (>97%) après 16 h dans les deux copolymérisations, la RMN (Figure 21) a également permis d'estimer une composition des deux blocs de 18 :82 pour PVPI₁₀-b-P(NIPAM_{0,92}-stat-NVC_{0,08})₅₀ et 24 :76 pour PVPI₂₀-b-P(NIPAM_{0,92}-stat-NVC_{0,08})₁₀₀ (Annexe 5), ce qui est proche de la composition théorique (17 :83).

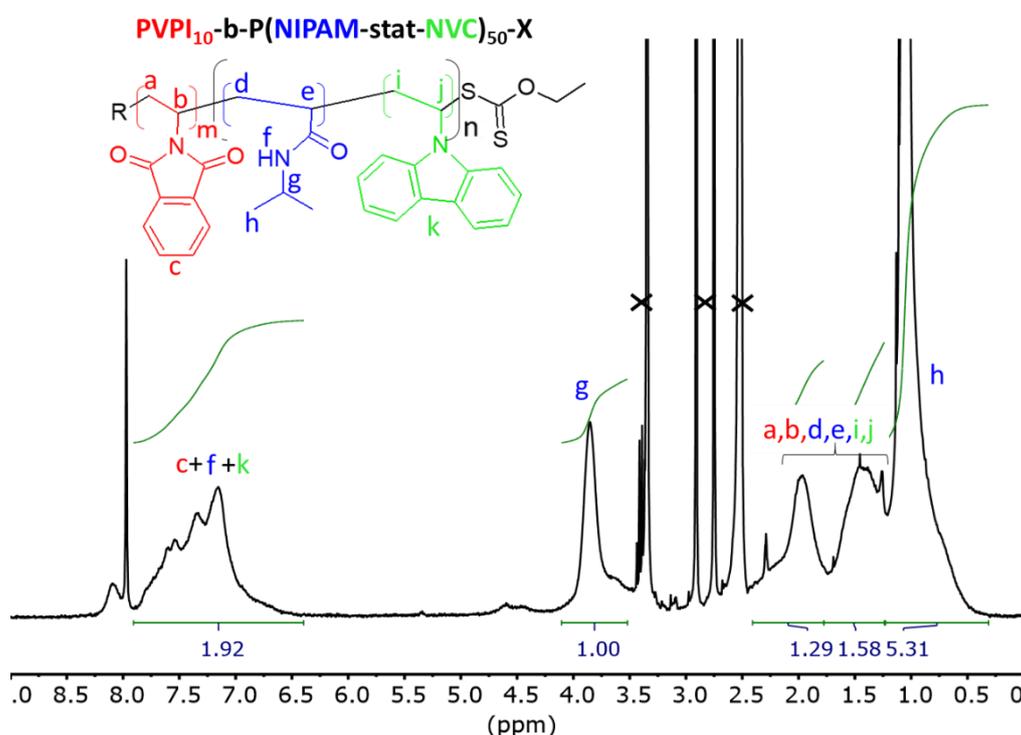


Figure 21 Spectre RMN ¹H du copolymère PVPI₁₀-b-P(NIPAM-stat-NVC)₅₀-X dans le DMSO-d₆

Les deux copolymères ont été caractérisés par SEC et ont une valeur de $M_{n,MALS}$ de 10000 g/mol ($\mathcal{D} = 1,4$) et 17500 g/mol ($\mathcal{D} = 1,28$) pour PVPI₁₀-b-P(NIPAM_{0,92}-stat-NVC_{0,08})₅₀ et PVPI₂₀-b-P(NIPAM_{0,92}-stat-NVC_{0,08})₁₀₀ respectivement.

Les étapes d'élimination du bout de chaîne et d'hydrazinolyse ont été réalisées dans les mêmes conditions que les homologues non fluorescents. Finalement, les copolymères PVAm₁₀-*b*-P(NIPAM_{0.92}-*stat*-NVC_{0.08})₅₀ et PVAm₁₀-*b*-P(NIPAM_{0.92}-*stat*-NVC_{0.08})₅₀ ont été obtenus. Un spectre de spectrofluorimétrie du copolymère PVAm₁₀-*b*-P(NIPAM-*stat*-NVC)₅₀ en solution dans l'eau, enregistré en excitant à 325 nm sur une gamme d'émission de 335 nm à 450 nm, a rapidement permis de confirmer la bonne insertion des unités NVC dans le copolymère (Figure 22).

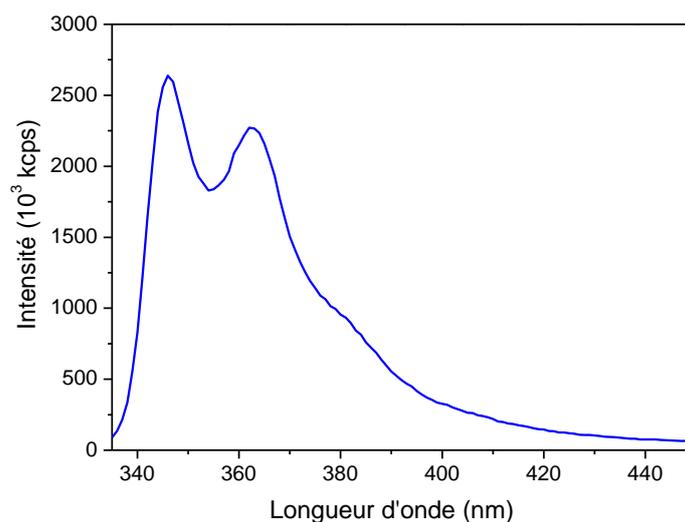


Figure 22 Spectre d'émission du copolymère PVAm₁₀-*b*-P(NIPAM-*stat*-NVC)₅₀ à 0.5 mg/mL dans l'eau, longueur d'onde d'excitation : 325 nm

Le spectre obtenu est identique à celui rapporté dans la littérature, il présente deux pics caractéristiques d'émission à 346 et 366 nm.³⁶ Les diblocs fluorescents ne feront pas l'objet de l'étude physico-chimique (Partie 1 Chapitre 3) et seront utilisés dans la Partie 2.

5. Purification des diblocs

Le mélange PVPI₁₀-X/PVPI₁₀-*b*-PNIPAM₅₀-X mis en évidence au moment de la copolymérisation devient un mélange PVAm₁₀/PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ à l'issue des deux traitements post-polymérisation. Une purification est alors nécessaire pour éliminer l'homopolymère. Une dialyse est réalisée à l'aide d'une membrane dont le seuil de séparation est de 1000 g/mol. En effet les homopolymères PVAm₁₀ et PVAm₂₀ ont des M_n calculés de 430 et 860 g/mol respectivement. Le seuil de séparation est proche de l'homopolymère PVAm₂₀ et il aurait été plus judicieux d'utiliser une membrane avec un seuil supérieur, cependant les chromatogrammes SEC (Figure 20) n'ont pas révélé la présence d'homopolymère résiduel donc les conséquences d'une dialyse moins efficace seront moindres. Tous les copolymères, fluorescents et non fluorescents, ont été

dialysés dans les mêmes conditions. Malgré une étude en RMN DOSY sur le copolymère PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀, il n'a pas encore été possible de démontrer l'efficacité de la purification.

Cependant, s'il restait de l'homopolymère dans le copolymère PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀, cela ne devrait pas avoir d'influence critique sur la fonctionnalisation des nanoparticules de biopolymères. L'étude physico-chimique devra en revanche être nuancée car l'homopolymère peut avoir une influence sur les propriétés de pH- et thermosensibilité du copolymère.

6. Conclusion

Ce chapitre a eu pour objectif de décrire la synthèse d'un copolymère à blocs double hydrophile. Nous avons ainsi synthétisé les copolymères PVAm_m-*b*-PNIPAM_n par polymérisation RAFT/MADIX d'un dibloc poly(vinyl phtalimide)_m-*b*-poly(N-isopropylacrylamide)_n (PVPI_m-*b*-PNIPAM_n), suivie de l'hydrazinolyse du bloc PVPI pour obtenir la PVAm en s'appuyant sur un protocole existant dans la littérature.²⁶ Les polymères synthétisés, de compositions théoriques PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ et PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀, ont été caractérisés par SEC et RMN et ont les compositions expérimentales suivantes : PVAm₁₁-*b*-PNIPAM₆₄ ($M_n = 6900$ g/mol) et PVAm₁₇-*b*-PNIPAM₁₁₀ ($M_n = 15400$ g/mol).

La polymérisation du dibloc PVPI₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ a particulièrement été étudiée. Un suivi cinétique de la polymérisation du NIPAM à partir du macro-CTA PVPI-X a montré un réamorçage lent de la polymérisation, ainsi que l'existence d'une importante population résiduelle de macro-CTA en fin de polymérisation. Une quantification de cette fraction résiduelle d'homopolymère a été réalisée par un dosage indirect en chromatographie d'exclusion stérique.

Des copolymères homologues fluorescents ont également été synthétisés en incorporant statistiquement au sein du bloc PNIPAM des unités de NVC afin d'obtenir les diblocs PVAm_m-*b*-P(NIPAM-*stat*-NVC)_n. Ces copolymères n'ont jamais été décrits dans la littérature et ont été particulièrement importants pour l'étude du greffage des diblocs sur les particules à base de polysaccharides.

Les diblocs PVAm-PNIPAM feront l'objet d'une étude de leurs propriétés physico-chimiques en milieu aqueux dans le chapitre suivant.

P1 – Chapitre 3 : Propriétés d'auto-assemblage des copolymères PVAm_m-b-PNIPAM_n en milieu aqueux

1. Objectifs

Dans le chapitre précédent, la synthèse des copolymères PVAm_m-b-PNIPAM_n a été mise au point et leur caractérisation a confirmé l'obtention des polymères ciblés. Les diblocs thermorépondants ont été synthétisés pour modifier la surface des nanoparticules cœur-couronne à base d'hydrogel. Ce sont cependant des copolymères à blocs double-hydrophiles et qui présentent à la fois une sensibilité au pH et à la température, ce qui leur confère très certainement des propriétés d'auto-assemblage en solution. Afin de mettre au point le protocole de greffage du dibloc sur les particules, il paraît donc essentiel de connaître leur comportement dans l'eau. Indépendamment, cette étude physico-chimique approfondie des diblocs PVAm_m-PNIPAM_n apporte de nouveaux éléments de compréhension de cette famille de diblocs, qui n'ont été caractérisés par Mori *et al.* que sur leur agrégation.^{26,29} Cette étude est composée de trois parties, la première décrivant les propriétés physico-chimiques des homopolymères PVAm et PNIPAM. Ensuite sera étudiée la transition en température des copolymères PVAm_m-b-PNIPAM_n en fonction du pH et de leur masse molaire. Enfin, le caractère thermoassociatif des copolymères sera caractérisé dans le but de dresser un diagramme de phase des morphologies des agrégats en fonction du pH et de la température.

2. Propriétés physico-chimiques des homopolymères

Avant de s'intéresser aux copolymères à blocs PVAm_m-b-PNIPAM_n, il est nécessaire de décrire les propriétés physico-chimiques des homopolymères qui le composent.

1. PVAm

La poly(vinyl amine) est particulièrement utilisée pour la modification de surface du fait de son importante fraction en fonction amines qui lui permettent de s'adsorber sur une large gamme de surfaces en milieu aqueux. De nombreux polymères dérivés de la PVAm ont été synthétisés pour de telles applications, on peut notamment citer l'utilisation historique de la PVAm comme revêtement de la cellulose dans l'industrie du papier. Son potentiel pour la modification de surface vient directement de ses propriétés physico-chimiques. Le pKa de la PVAm a été estimé à 8,49.^{77,21} A un pH inférieur au pKa, les fonctions amines sont protonées alors qu'au-delà, la PVAm est sous forme neutre. Différentes équipes se sont intéressées aux propriétés d'auto-assemblage en solution de la PVAm. Kirwan *et al.* a notamment imagé en AFM la transition de chaînes de PVAm sous forme de pelote à pH 3, en conformation « collier de perles » à pH 4 et sous forme de globules à pH 10.⁷⁸ Une autre étude en DLS a démontré que la PVAm à pH > 9 tend à s'associer,⁷⁹ probablement par des interactions hydrogènes inter- et intramoléculaires.

2. PNIPAM

Le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) est l'un des polymères thermorépondants les plus décrits dans la littérature. Il présente une transition de phase de type LCST, c'est-à-dire qu'à sa température critique autour de 32 °C, ⁸⁰ ses chaînes vont se déshydrater, induisant une transition pelote-globule. La synthèse du PNIPAM étant très accessible, cette propriété de LCST a été très exploitée pour diverses applications comme la libération d'actifs ou encore le design de thermogels⁸¹. En effet, un des atouts majeurs du PNIPAM est que sa LCST est proche de la température du corps humain, ce qui en fait un candidat idéal pour des biomatériaux thermorépondants à visée biomédicale.

La température de point de trouble d'un polymère peut être modulée par l'incorporation de comonomères hydrophiles ou hydrophobes. Par exemple, un copolymère statistique de NIPAM et de monomère hydrophile comme l'acrylamide verra sa T_c augmenter à 45 °C alors qu'un copolymère statistique de NIPAM et d'acroléine (monomère hydrophobe) aura une T_c diminuée à 26 °C pour des ratios en comonomères similaires autour de 20%_{mol}.⁷⁴ Cet effet a également été observé sur des copolymères à blocs contenant un bloc LCST et un second bloc hydrophile ou hydrophobe, bien qu'il soit moins marqué que sur les analogues statistiques.⁸²

Sachant cette propriété de modulation de la LCST, il paraît intéressant de comprendre comment, dans le dibloc PVAm_m-*b*-PNIPAM_n, le bloc hydrophile PVAm influe sur les propriétés de LCST du PNIPAM.

3. Propriétés physico-chimiques des copolymères

1. Stratégie de caractérisation

Les copolymères à blocs composés d'un bloc cationique PVAm et d'un bloc thermorépondant PNIPAM ont un comportement en solution qui va dépendre de deux paramètres : le pKa du dibloc et sa température de point de trouble T_c . La stratégie de cette étude physico-chimique repose donc, dans un premier temps, sur la détermination de ces deux valeurs qui sont essentielles à la compréhension globale du système. La détermination du pKa par titrage potentiométrique sera brièvement explicitée, puis l'étude approfondie sur la détermination de T_c par différentes méthodes de caractérisation sera décrite. La démarche de cette étude repose sur une analyse multi-échelle de la transition en température du copolymère, en commençant par une approche macroscopique avec la turbidimétrie, la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS), et l'analyse enthalpique différentielle (*Differential scanning calorimetry*, DSC) ; enfin la RMN apportera des informations à l'échelle moléculaire. Les températures de point de trouble seront déterminées par chacune de ces techniques en s'attachant aux deux états de protonation du bloc PVAm (totalement protoné $\alpha \sim 1$ ou totalement déprotoné $\alpha \sim 0$), et comparées.

Une fois la transition caractérisée, le comportement associatif du copolymère sera étudié, toujours en prenant en considération les différents domaines déterminés par les paramètres pK_a et T_c . La Figure 23 ci-dessous propose une représentation schématique des quatre domaines d'intérêt en fonction de T_c et pK_a :

- $pH < pK_a, T < T_c$
- $pH < pK_a, T > T_c$
- $pH > pK_a, T < T_c$
- $pH > pK_a, T > T_c$

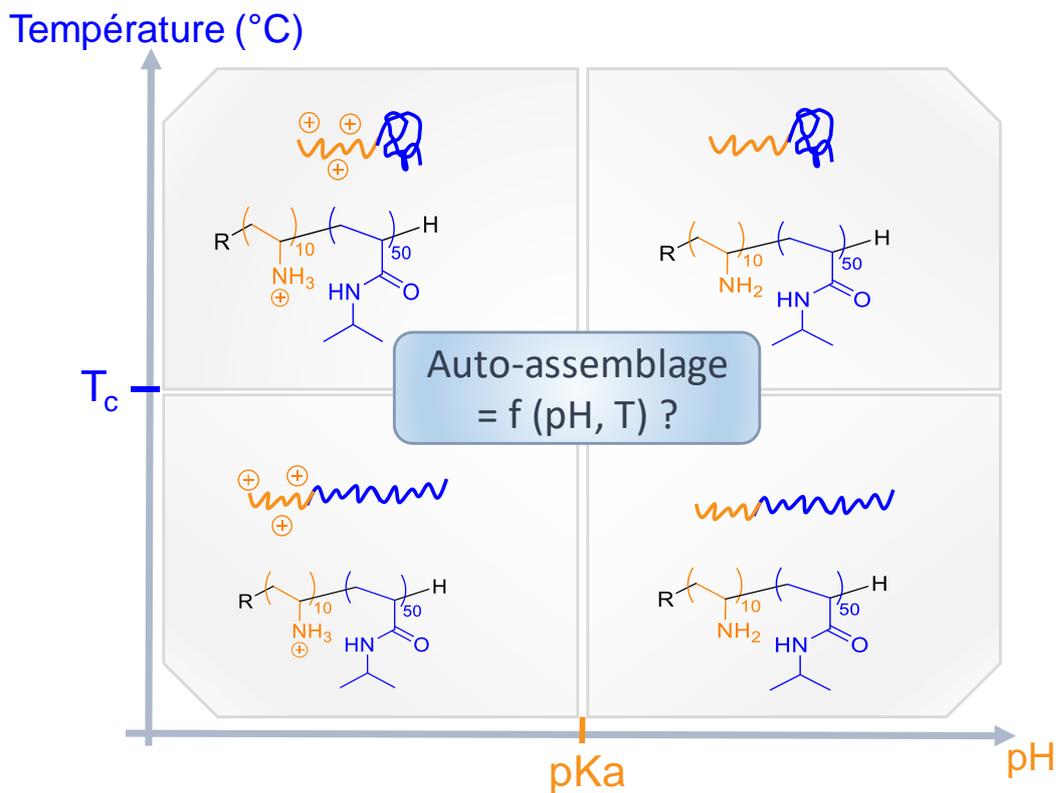


Figure 23 Représentation schématique du copolymère $PVAm_{10}\text{-}b\text{-}PNIPAM_{50}$ en fonction du pK_a et de la T_c

Ce schéma a pour but de visualiser sous quelle forme sont les copolymères en terme de protonation pour le bloc PVAm et en terme d'hydratation pour le bloc PNIPAM (chaîne allongée ou recroquevillée). Il est important de noter qu'il s'agit d'une représentation où l'on ne considère que des unimères et qui n'est pas réaliste. La vocation de cette figure est uniquement de faciliter la compréhension du système. L'objectif final de cette étude est d'établir un diagramme de phase des morphologies des agrégats présents dans chacun de ces domaines.

3. pK_a et degré de protonation

La première étape dans la caractérisation des diblocs $PVAm_m\text{-}b\text{-}PNIPAM_n$ est la détermination de leur pK_a . La composition des deux diblocs étant identique, leur pK_a est supposé identique. Le pK_a

du copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ en solution, mis en présence d'un excès d'HCl pour protoner l'ensemble des fonctions amines, a été déterminé par titrage potentiométrique par une solution titrante de KOH. Le degré de protonation a également été déterminé à partir de l'équation de Henderson-Hasselbalch's pour les bases faibles.⁸³

La Figure 24a ci-dessous représente l'évolution du pH en fonction de la concentration de base au long du dosage tandis que la figure 1b illustre la variation du degré de protonation en fonction du pH

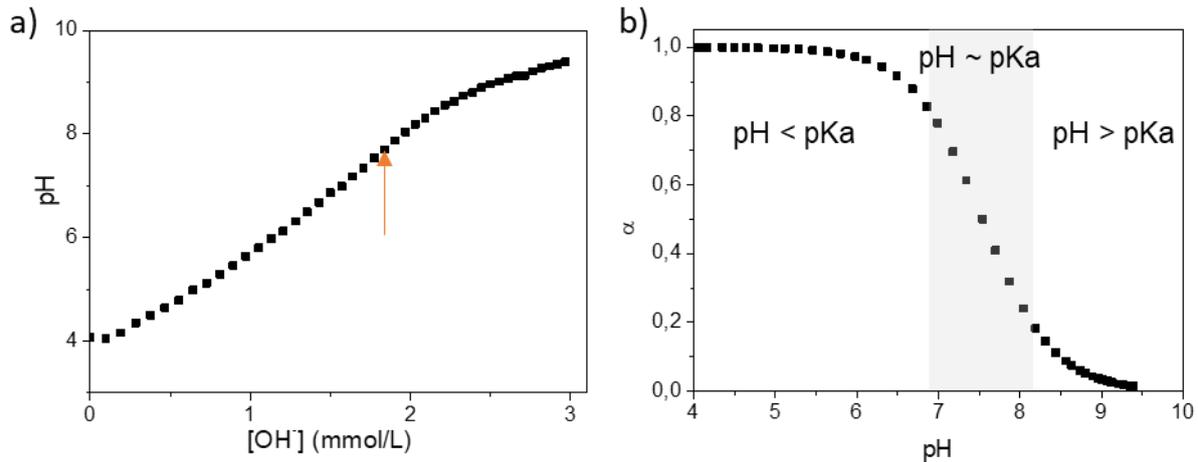


Figure 24 a) pH en fonction de la concentration en base au long du dosage : la flèche représente le point d'inflexion de la courbe $dpH/d[OH]=f([OH])$ qui correspond au pKa , b) degré de protonation α en fonction du pH.

La valeur de pKa de 7.54 est déterminée telle que l'extremum de la courbe $dpH/d[OH]=f([OH])$. Au vu du pKa et de la courbe du degré de protonation en fonction du pH, 3 pH d'intérêts ont été retenus pour notre étude (Figure 24b) :

- pH < pKa : nous avons choisi pH 5 tel que $\alpha \sim 1$, le bloc PVAm est totalement protoné
- pH \sim pKa : pH 7-8 où $0.2 < \alpha < 0.8$, le bloc PVAm est partiellement protoné,
- pH > pKa : nous avons choisi pH 11 tel que $\alpha \sim 0$, le PVAm est totalement déprotoné

Des solutions de copolymères à chacun de ces pH ont été préparées et étudiées sur une gamme de température entre 25 °C et 55 °C.

La nomenclature utilisée pour cette étude est la suivante : PVAm_m-b-PNIPAM_n@pHx avec m et n les degrés de polymérisations visés des blocs respectifs, et x le pH de la solution. Dans ce chapitre,

les valeurs visées de pH (5-8-11) seront utilisées pour plus de clarté, les pHs réels mesurés sont donnés dans le Tableau 13 du Chapitre 4.

4. Détermination de la température de point de trouble à $pH > pKa$

Dans un premier temps, une étude approfondie des propriétés de thermosensibilité du copolymère PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ au-delà de pKa a été réalisée. Cette première partie servira de description de la méthode de caractérisation appliquée pour chacun des autres échantillons. Les résultats de spectroscopie UV-visibles seront présentés indépendamment, suivis de la DLS et de la DSC avant de comparer ces différentes méthodes, enfin la RMN en température sera apportée pour compléter l'étude de la transition en température du dibloc.

Spectroscopie UV-vis

L'une des propriétés caractéristiques des polymères thermorépondants en solution est leur point de trouble qui traduit le passage d'un état solvaté à une insolubilité lorsque la température dépasse la température critique T_c . Ce point de trouble s'observe macroscopiquement lorsqu'une solution parfaitement limpide devient opaque au-delà de la T_c , comme on peut le voir sur la Figure 25.

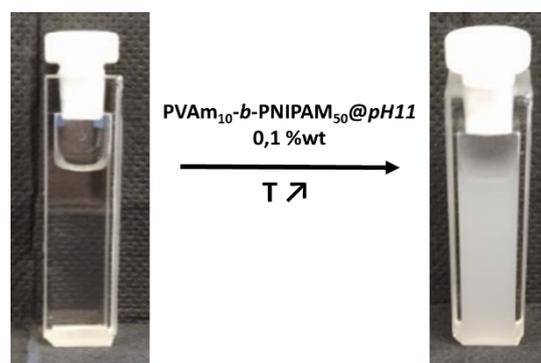


Figure 25 Photographies de la solution à 0,1%_m de copolymère PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ à pH 11 avant et après chauffage à $T > T_c$

Des mesures de turbidimétrie ont été réalisées par spectroscopie UV-vis pour déterminer cette température de point de trouble. Pour cela, la transmittance a été mesurée à 500 nm pendant des rampes de chauffage et de refroidissement à différentes vitesses (0.5-1-2-5 °C/min) sur une solution de copolymère PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀@pH11 à 0,1%_m (Figure 26a). La T_c a été déterminée sur chacune de ces courbes au point d'inflexion (Figure 26b).

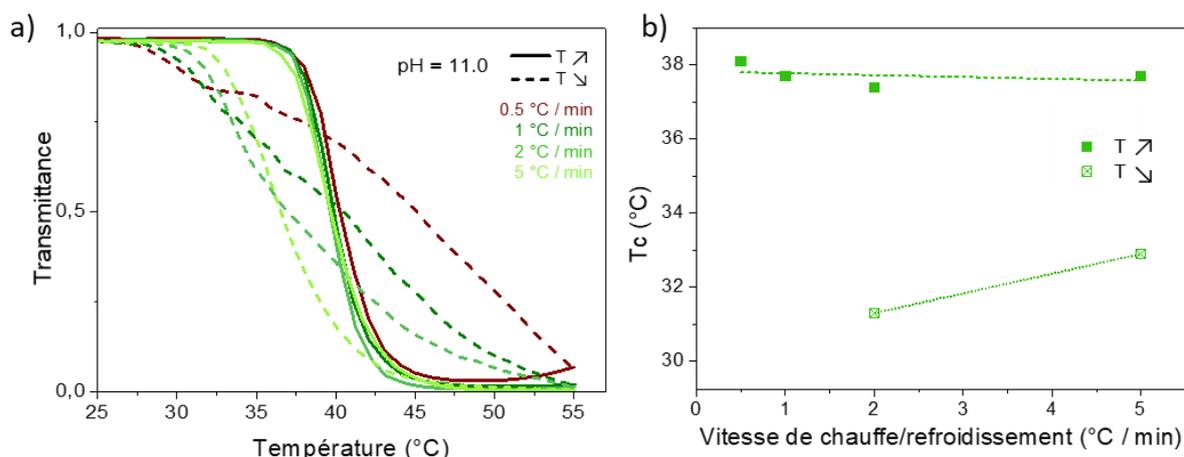


Figure 26 Spectroscopie UV-vis de l'échantillon PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH11 avec a) Courbes de transmittance à 500 nm lors des rampes de chauffage et refroidissement à différentes vitesses (0.5 - 1 - 2 - 5 °C/min) et b) Extrapolation à vitesse nulle des température de point de trouble en chauffage et refroidissement par une régression linéaire

Les profils de transmittance en fonction de la température aux différentes vitesses lors des phases de chauffage (Figure 26a, traits pleins) sont abrupts et superposés, ce sont des profils typiques de ce que l'on peut attendre pour un dibloc à base de PNIPAm.⁸⁴ En revanche, les profils de refroidissement (traits pointillés) sont plus surprenants. A vitesse très lente, la transmittance augmente quasi-linéairement avec la baisse de température, ce qui suggère une réhydratation difficile du copolymère. A 5 °C/min, la resolubilisation du copolymère paraît plus rapide lors de la phase de refroidissement. Une hypothèse pour expliquer cette observation est qu'à 5 °C/min, l'échantillon passe seulement 3 min au-delà de 40 °C contrairement aux rampes plus lentes où l'élévation de température de 40 °C à 55 °C peut prendre entre 6 et 30 min. Ainsi, lorsque le refroidissement est amorcé, le copolymère en solution à 5 °C/min n'a probablement pas eu le temps d'atteindre son équilibre et donc se réhydrate plus facilement que les échantillons ayant passé plus de temps à $T > T_c$ et où les assemblages formés ont eu le temps de se réorganiser plus significativement. Les mesures aux différentes vitesses ont permis d'extrapoler T_c à vitesse nulle à l'aide d'une régression linéaire (Figure 26b), de manière à s'affranchir de ce paramètre. Du fait des profils de refroidissement quasi-linéaires à 0,5 et 1 °C/min, les T_c à ces vitesses n'ont pas pu être déterminées au point d'inflexion, ce qui explique l'extrapolation basée sur deux mesures uniquement. A vitesse nulle, la T_c lors du chauffage est estimée à 39.8 °C. Cette valeur est supérieure à la T_c d'un homopolymère de PNIPAM (i.e. 32 °C) comme attendu, puisqu'il est couramment décrit dans la littérature que la LCST d'un dibloc contenant un bloc thermosensible est plus élevée en présence d'un second bloc hydrophile.⁸²

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les techniques de diffusion sont très fréquemment utilisées pour la caractérisation des polymères en solution, notamment les polymères thermorépondants. Les analyses de DLS ont été menées pour déterminer, dans un premier temps, les points de trouble des différentes solutions, ainsi que leurs propriétés d'auto-assemblage. Les résultats concernant la taille des objets formés au cours de la transition en température seront explicités dans la partie 4 de ce chapitre.

Des rampes de chauffage et de refroidissement ont été réalisées pendant l'acquisition des mesures de DLS sur une solution de copolymère PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀@pH11 à une concentration massique de 1%. L'allure des fonctions de corrélation obtenues permettent de valider la qualité de la mesure et donnent de premières informations sur la transition en température, la dispersité des objets, leur agrégation et stabilité. La température de point de trouble peut ensuite être déterminée plus précisément en traçant l'évolution de deux grandeurs mesurées au cours des expériences de diffusion en fonction de la température : celle de l'intensité moyenne diffusée (Derived Count Rate : DCR), et celle du diamètre hydrodynamique (noté Z-av) des objets qui est calculé via la loi d'Einstein-Stokes en supposant une population monomodale.

Les fonctions d'autocorrélation du copolymère PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀@pH11 sont représentées sur la Figure 27 à différentes températures entre 25 °C et 55 °C.

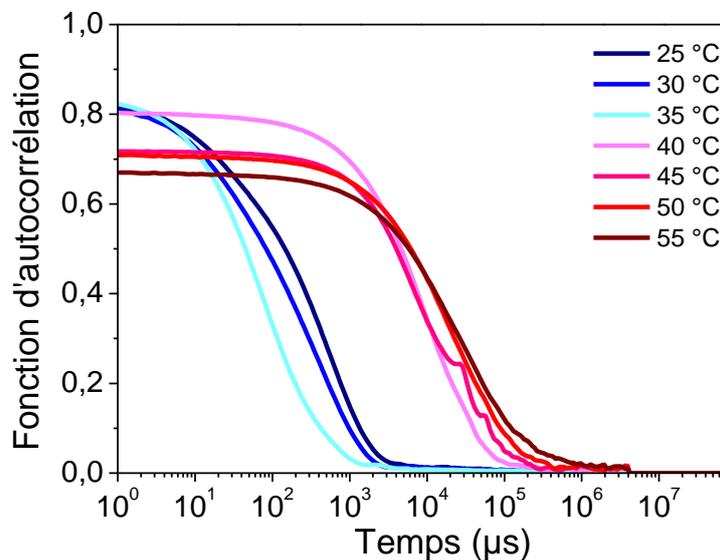


Figure 27 Fonctions d'autocorrélation à différentes températures entre 25 °C et 55 °C de l'analyse DLS au cours d'une rampe de chauffage de l'échantillon PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ à pH 11 à 1%_m

La fonction d'autocorrélation traduit l'évolution d'un système par rapport à un temps initial ; elle ne peut donc que décroître car un système ne peut retourner à son état initial. Les fonctions présentées dans la Figure 27 permettent les interprétations suivantes : la diffusion de la lumière dynamique repose sur l'hypothèse d'un mouvement Brownien des particules en suspension ; plus

leur taille est importante, plus leur mouvement est lent et donc plus la courbe de corrélation décroît tardivement. Ainsi, au-delà de 35 °C, les courbes sont décalées vers les longs temps de corrélation, ce qui traduit l'apparition de grands objets ou agrégats. Au contraire, de petits objets ont un mouvement Brownien très rapide et leur fonction de corrélation décroît très rapidement, ce qui est le cas des fonctions entre 25 et 35 °C. La pente de la fonction de corrélation apporte une information sur la dispersité des objets. Plus celle-ci est raide, plus la distribution est monodisperse. On remarque sur la Figure 27 que la dispersité du système diminue au début de la rampe de chauffage avant T_c , avant la formation des gros agrégats. Cela suggère une cinétique d'assemblage d'objets organisés d'abord à l'état individuel puis leur agrégation à partir de 35 °C. Enfin, la valeur initiale en ordonnée (*intercept*) renseigne sur la stabilité de l'échantillon, une perte d'intensité telle qu'observée entre les températures de 40°C et 45 °C, associée à un aspect des courbes présentant des « vagues », peut traduire une sédimentation. Les fonctions d'autocorrélations indiquent donc que la transition a lieu entre 35 °C et 40 °C ; la représentation du DCR et du Z-av en fonction de la température (Figure 28) permet une détermination plus précise de la valeur de T_c .

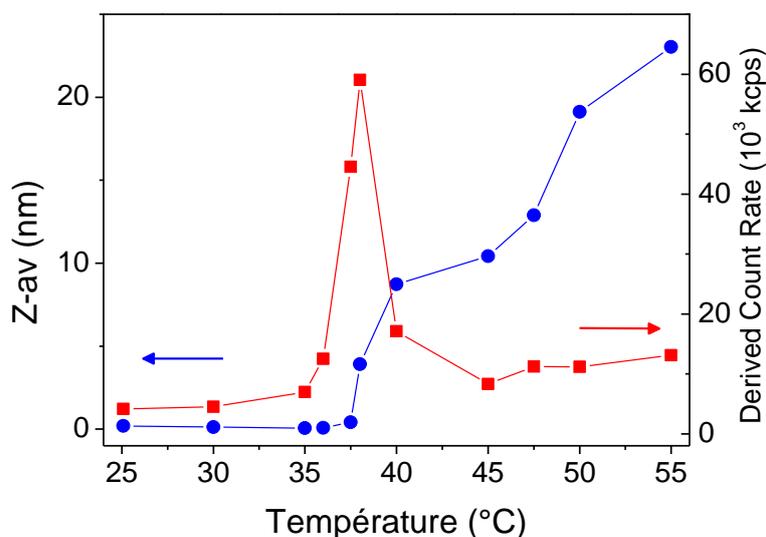


Figure 28 Evolution du Z-av (●) et du DCR (■) entre 25 °C et 55 °C de l'analyse DLS au cours d'une rampe de chauffage de l'échantillon PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ à pH 11 à 1%_m

La T_c est déterminée au niveau de la rupture de pente du DCR et du Z-av en fonction de la température et vaut 36,0 °C et 37,5 °C respectivement. Les T_c des rampes de refroidissement ont été déterminées également et sont résumées dans le Tableau 6.

Analyse enthalpique différentielle (DSC : differential scanning calorimetry)

Les températures de point de trouble mesurées par turbidimétrie et diffusion de la lumière s'appuient sur les conséquences macroscopiques de la LCST du copolymère en solution,

c'est-à-dire la perte de solubilité qui induit une précipitation d'objets qui absorbent ou diffusent la lumière. Cette transition se traduit également par la rupture de liaisons hydrogène entre le PNIPAM et l'eau, et la création concomitante de liaisons hydrogènes inter- et intra-PNIPAM. Ces modifications de liaison se traduisent par des échanges d'énergie qui peuvent être caractérisées par DSC. Des mesures ont donc été réalisées pour déterminer la T_c à différentes vitesses de chauffage et refroidissement, valeurs qui ont permis une extrapolation de la valeur de T_c à vitesse nulle. Un exemple de thermogramme à $2^\circ\text{C}/\text{min}$ est présenté (Figure 29a) ainsi que la régression permettant l'extrapolation des T_c de chauffage et refroidissement à vitesse nulle (Figure 29b) :

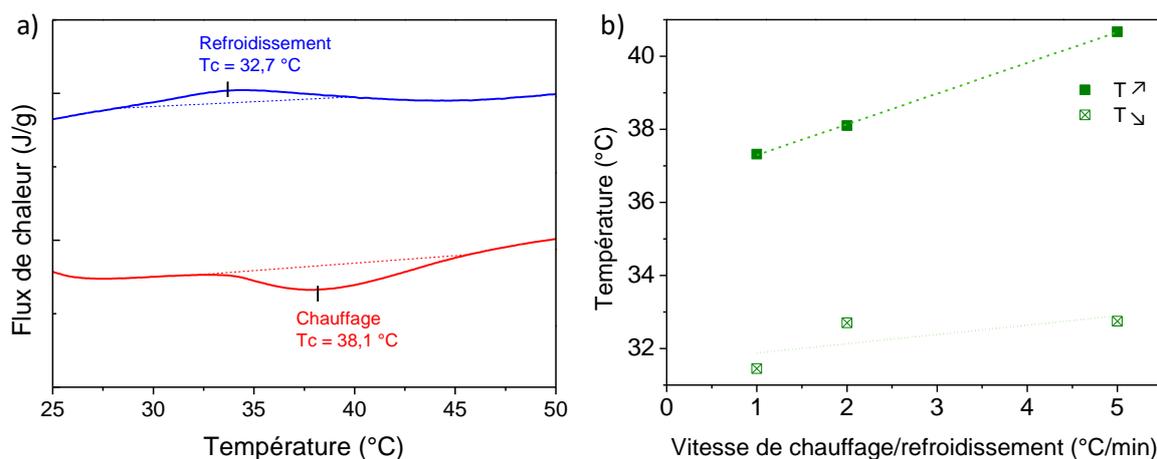


Figure 29 DSC de l'échantillon PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH11 à 5 %_{m/v} avec a) Thermogramme des rampes de chauffage et refroidissement à $2^\circ\text{C}/\text{min}$ et b) Extrapolation à vitesse nulle des température de point de trouble en chauffage et refroidissement par une régression linéaire

Le thermogramme (Figure 29a) permet d'observer le large pic endothermique associé à la LCST du PNIPAM lors du chauffage, et le pic exothermique lors du refroidissement. La T_c à chaque vitesse a été déterminée au niveau de l'extremum du pic. A $0^\circ\text{C}/\text{min}$, le copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀@pH11 a une T_c de $36,4^\circ\text{C}$ lors du chauffage, ce qui est à nouveau supérieur à l'homopolymère de PNIPAM comme attendu.

Comparaison des différentes techniques utilisées pour la détermination de T_c

Les températures de point de trouble du copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀@pH11 déterminées par les trois techniques précédemment explicitées sont résumées dans le Tableau 6.

Tableau 6 Températures de point de trouble à pH 11 déterminées par spectroscopie UV-visible à 0.1%_{m/v} et 500 nm, DLS à 1%_{m/v} et DSC à 5 %_{m/v}

UV (0.1%)		DLS (1%)				DSC (5%)	
T_c à $0^\circ\text{C}/\text{min}$ ($^\circ\text{C}$)		T_c , DCR ($^\circ\text{C}$)		T_c , Zav ($^\circ\text{C}$)		T_c à $0^\circ\text{C}/\text{min}$ ($^\circ\text{C}$)	
heating	cooling	heating	cooling	heating	cooling	heating	cooling
39,8	37,0	36,0	36,5	37,5	35,0	36,4	31,6

Il est important de préciser que les mesures des différentes techniques ont été réalisées à des concentrations différentes du fait des particularités qui sont propres à ces techniques : en spectroscopie UV-vis, l'absorbance mesurée doit rester en deçà d'un certain seuil ce qui implique de diluer, alors qu'en DLS la solution doit être suffisamment concentrée pour qu'elle diffuse. En DSC, la fraction massique en PNIPAM doit être suffisamment importante pour que des variations d'enthalpies puissent être mesurées, d'où la concentration de 5%_{m/v}. Cependant, ces concentrations restent faibles et dans le régime dilué, ce qui nous conforte dans l'idée qu'elles n'ont que peu d'influence sur les températures critiques obtenues.

Le Tableau 6 permet de confirmer que les points de trouble au refroidissement sont atteints à des températures inférieures à ceux observés lors du chauffage.⁵⁶ Il est en effet plus difficile, d'un point de vue cinétique, de réhydrater le polymère agrégé que de casser les liaisons hydrogènes entre le polymère et le solvant lors de la déshydratation du PNIPAM. Bien qu'elles n'aient pas été répliquées, les valeurs déterminées en turbidimétrie, DLS et DSC sont très proches. De manière générale, les T_c mesurées en DLS sont légèrement inférieures à celles de DSC et UV-vis, puisque ces dernières sont des valeurs de T_c au pic alors que les T_c de DLS sont mesurées à la base du pic. Enfin, il est important de noter que les T_c de turbidimétrie et DSC ont été extrapolées à vitesse nulle afin de s'affranchir du paramètre qu'est la rampe de chauffage ou de refroidissement. Cela n'a pas été le cas en DLS où la rampe n'est pas un paramètre connu ; cependant les temps d'acquisitions longs pour ces mesures (environ 15 h) confirment que les rampes ont été relativement lentes et probablement dans le même ordre de grandeur qu'en DSC et en turbidimétrie.

De manière générale, les T_c du copolymère déterminées expérimentalement sont supérieures à celle de l'homopolymère PNIPAM comme attendu. Le bloc PVAm à pH 11 est neutre mais reste malgré tout hydrophile. Il sera intéressant de se placer à différents pH pour évaluer l'influence de la protonation du bloc polyaminé sur la température de point de trouble du copolymère. Avant cela, l'étude du copolymère à pH 11 a été complétée par des mesures de RMN en température entre 20 °C et 55 °C. La RMN ne permet pas la détermination de T_c à proprement dite mais elle permet cependant d'observer l'influence de la transition à l'échelle moléculaire.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Des mesures de RMN en température ont finalement été menées entre 20 °C et 55 °C à 400 MHz. Lorsque la température se rapproche de la température critique de transition, la mobilité des chaînes de polymère et l'environnement électronique des atomes les composant est modifiée. Ces modifications se traduisent sur les spectres RMN des diblocs LCST par une diminution de l'intensité des signaux et un décalage des signaux vers les grands déplacements chimiques.⁸⁵⁻⁸⁷

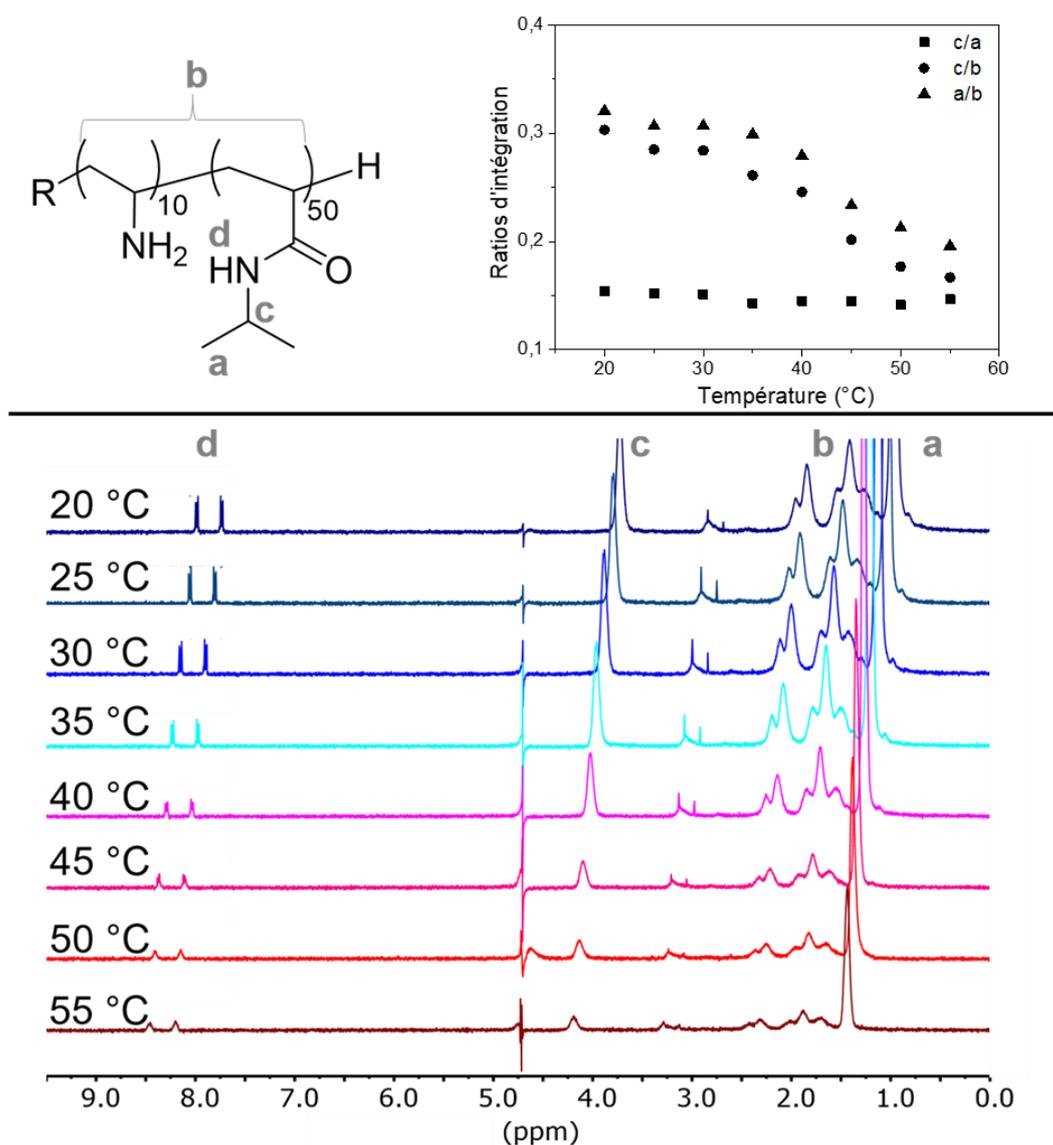


Figure 30 figure principale : Spectres de RMN ^1H en température acquis à 400 MHz entre 20 °C et 55 °C du copolymère PVAm₁₀-PNIPAM₅₀ à pH 11 dans le D₂O; haut à droite : évolution des ratios d'intégration en fonction de la température avec : ▲ ratio a/b, ● ratio c/b, ■ ratio c/a

La Figure 30 illustre un décalage d'environ 0.5 ppm de tous les signaux, sauf le solvant, vers les grands déplacements chimiques quand la température augmente. L'intensité chute avec la température, bien que tous les signaux restent visibles sur la gamme de 20 °C à 55 °C. Les différents signaux caractéristiques sont attribués sur la Figure 30 et les ratios entre ces signaux sont représentés. On observe tout d'abord que le ratio **c/a** reste constant ce qui est logique puisque les protons $-\text{CH}_3$ de l'isopropyle et le proton $-\text{CH}_c$ de l'isopropyle subissent la transition de manière similaire. Les ratios **c/b** et **a/b** ont la même tendance ce qui est logique également étant donné que les intégrations **a** et **c** de l'isopropyle diminuent lorsque le PNIPAM devient progressivement insoluble. Dans ces deux cas, les protons du squelette **b** sont peu affectés par

l'élévation de température.

Ces spectres à $\text{pH} > \text{pKa}$ seront comparés avec ceux à $\text{pH} < \text{pKa}$ à l'issue de l'étude de l'influence du pH sur la transition en température.

5. Influence de la protonation du dibloc sur la T_c

Le but de cette partie est d'étudier quel rôle joue le pH dans ce système pH-sensible et thermorépondant, et notamment de déterminer comment le pH affecte la température de point de trouble. Pour cela, les différentes caractérisations réalisées à pH 11 ont été répliquées sur des solutions de copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ à $\text{pH} < \text{pKa}$ et $\text{pH} \sim \text{pKa}$.

Influence sur la T_c mesurée par spectroscopie UV-vis

Les courbes de transmittance à 0.5 °C/min lors des rampes de chauffage et refroidissement sont présentées ci-dessous (Figure 31)

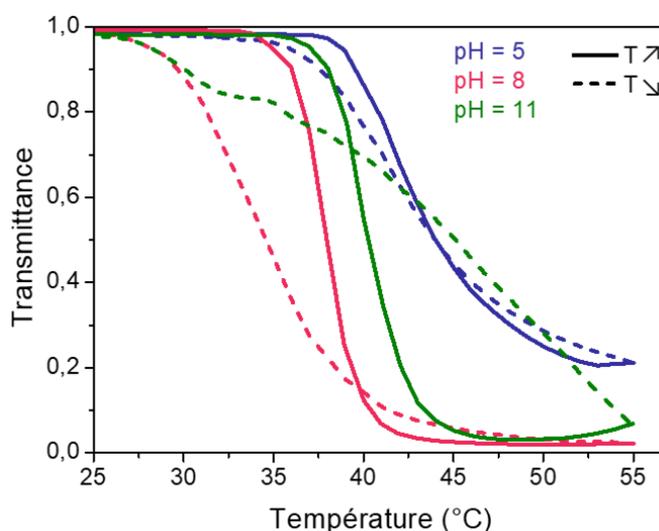


Figure 31 Transmittance en fonction de la température mesurée à 500 nm et 0,5 °C/min pendant le chauffage (trait plein) et le refroidissement (trait pointillé) pour les échantillons de copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ à pH 5 (bleu), 8 (rose) et 11 (vert)

On observe tout d'abord que le copolymère PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH5 n'atteint pas une opacité de 100 % lors de la rampe à 0.5 °C/min. Cela suggère la formation de petits objets stables tels que des micelles ou agrégats de micelles qui ne diffusent pas suffisamment pour rendre la solution opaque. Le copolymère PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH11 a un comportement différent, avec une transition nette de 100 % de transmittance à 25 °C jusqu'à 0% à 50 °C lors du chauffage, mais un profil de refroidissement quasi-linéaire comme discuté précédemment. Au pH intermédiaire, le dibloc PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH8 présente des profils de chauffage et refroidissement bien définis. Le comportement du copolymère à ce pH est différent des deux autres, il ne montre ni une (re)solubilisation difficile comme à pH de 11, ni des objets de petites tailles comme pour pH=5. Les valeurs de T_c extrapolées à vitesse nulle sont résumées dans Tableau 7 ci-dessous :

Tableau 7 Températures de point de trouble déterminées par spectroscopie UV-visible à 0.1%_{m/v} pour le copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ aux pHs 5-8-11

UV (0.1%)		
pH	T _c à 0 °C/min (°C)	
	heating	cooling
5	42,2	39,6
8	38,0	46,7
11	39,8	37,0

La T_c est diminuée de 42,2 °C à pH 5 à 39,8 °C à pH 11. Ceci est cohérent avec le caractère plus hydrophile de la PVAm sous forme ammonium que sous la forme amine et donc qui élève encore plus la T_c du dibloc. La T_c à pH 8 est inférieure aux deux autres pHs (38,0) ce qui témoigne d'un comportement plus complexe lorsque la PVAm est partiellement protonée et où des interactions électrostatiques coexistent avec les liaisons hydrogène inter et intramoléculaires.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Tout comme la turbidimétrie, la diffusion de la lumière met en évidence des différences significatives selon l'état de protonation du dibloc. La Figure 32 présente les fonctions d'autocorrélation à 25 °C et 45 °C des solutions à pHs 5, 8 et 11.

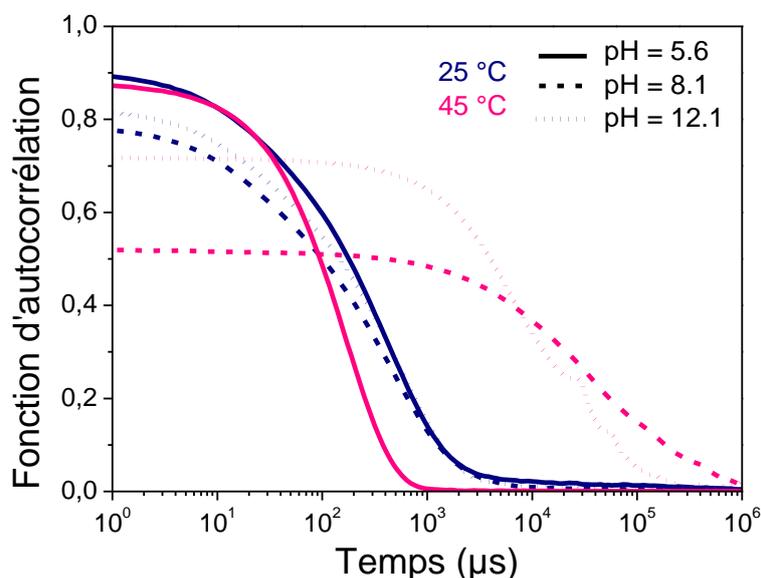


Figure 32 Fonctions d'autocorrélation à 25 °C (bleu) et 45 °C (rose) des PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH5 (trait plein), PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH8 (trait tirets) and PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH11 (trait pointillés);

Les échantillons PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀@pH8 et PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀@pH11 montrent la formation de gros agrégats entre 35 °C et 40 °C ce qui est en accord avec les mesures de transmittance. L'échantillon PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH5 a la particularité de voir sa dispersité s'affiner entre 25 °C et 45 °C. Les objets en solution passent donc d'un état assemblé mais désorganisé à 25 °C, à un système organisé d'objets à 45 °C. Une première estimation de la taille de ces assemblages autour

de 150 nm (D_h en Z-av), qu'ils soient organisés ou désorganisés, est obtenue. Ces mesures nécessitent cependant d'être précisées (voir section 4 de ce chapitre) à l'aide de techniques plus précises au regard de la dispersité des systèmes étudiés. Cette dernière induit une surestimation des tailles mesurées du fait de la présence d'objets de taille importante, biaisant le résultat de l'analyse réalisé. L'auto-assemblage spontané à température ambiante a été expliqué par Mori et ses collaborateurs par la forte capacité de la PVAm à former des liaisons hydrogène, sur elle-même, sur le PNIPAM et avec le solvant.⁸⁸ Les valeurs de T_c sont compilées dans le Tableau 8 ci-dessous :

Tableau 8 Températures de point de trouble déterminées par DLS à 1%_{m/v} pour le copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ aux pHs 5-8-11, les colonnes DCR et Z-av correspondent aux T_c déterminées respectivement en onset des mesures de Derived Count Rate et de Z-av en fonction de la température.

DLS (1%)				
pH	T_c, DCR (°C)		T_c, Z-av (°C)	
	<i>heating</i>	<i>cooling</i>	<i>heating</i>	<i>cooling</i>
5	37,5	36,8	37,0	37,0
8	33,8	33,8	35,0	30,0
11	36,0	36,5	37,5	35,0

L'influence du pH sur les valeurs de T_c n'est pas évidente, aucune tendance linéaire n'est observée. Tout comme la turbidimétrie, les mesures de DLS tendent à montrer des T_c inférieures au pH intermédiaire où le taux de protonation est d'environ de 0.4. Une T_c basse suggère une déshydratation plus facile du bloc PNIPAM qui serait attribuée à la protonation partielle de la PVAm : le PNIPAM n'étant pas affecté par le pH, il forme ses liaisons hydrogène avec le solvant et avec lui-même indépendamment du pH. La PVAm, en revanche, influence le comportement du dibloc. Tout comme les amines primaires, la PVAm peut être à la fois un donneur de liaisons hydrogène lorsqu'elle est sous forme ammonium, et un récepteur de liaisons hydrogène lorsqu'elle est déprotonée.

Analyse enthalpique différentielle (DSC)

La DSC aux différents pHs ne montre pas de différences importantes de T_c (Tableau 9) lors du chauffage.

Tableau 9 Températures de point de trouble déterminées par DSC à 5%_{m/v} pour le copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ aux pHs 5-8-11

DSC (5%)				
pH	T _c à 0 °C/min (°C)		dHm (J/g) par unité de NIPAM à 0 °C min	
	heating	cooling	heating	cooling
5	37,7	36,5	-8,14	8,07
8	38,3	34,1	-10,37	2,22
11	36,4	31,6	-2,98	0,13

Les enthalpies extrapolées à 0 °C/min mesurées par DSC révèlent des valeurs proches à pH 5 et 8 avec des valeurs de -8.14 J/g et -10.37 J/g respectivement. A pH 11, l'enthalpie est seulement de -2.98 J/g. Cette faible valeur suggère une moindre modification du niveau d'hydratation du PNIPAM à pH 11, probablement en lien avec des interactions existantes déjà forte entre la PVAm et le PNIPAM pour $T < T_c$, interactions d'autant plus fortes que le PVAm est sous forme non protonée. Par comparaison, le PNIPAM a une enthalpie de 25 J/g d'après la littérature.

Résonnance magnétique nucléaire (RMN)

Les RMN ¹H en température aux 3 pHs d'intérêt sont présentées dans la Figure 33 à 25 °C et 45 °C.

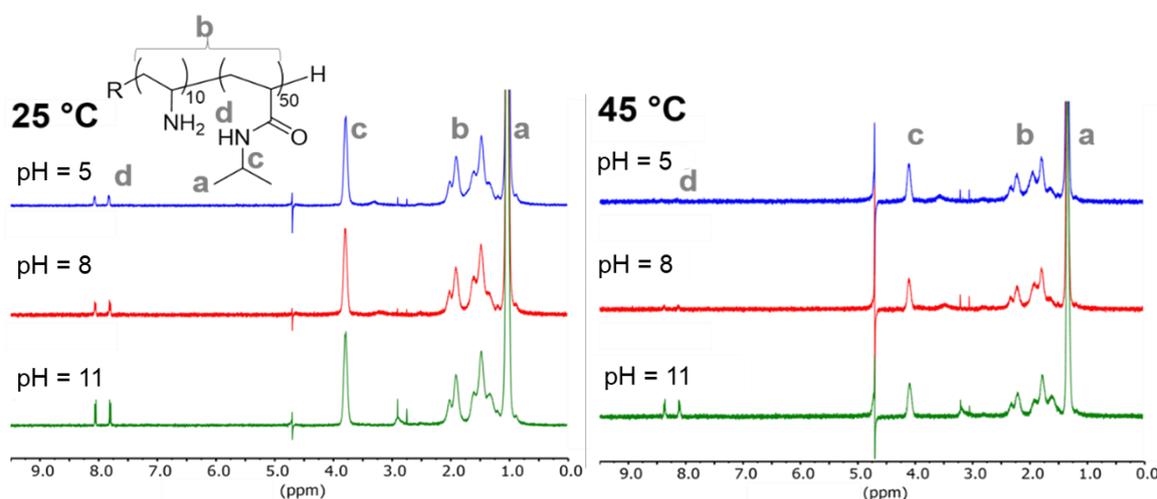


Figure 33 Spectres de RMN ¹H acquis à 400 MHz des échantillons PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH5 (bleu) PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH8 (rouge) and PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH11 (vert) dans le D₂O (pic du solvant résiduel à 4.79 ppm) à 25 °C et 45 °C.

Quelques différences sont observées dont une intensité plus élevée du proton amide du PNIPAM à 8 ppm à pH 11 et pour les deux températures. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'un proton à pH 5 dans ce système est en jeu dans un échange dynamique et qu'il est plus libre que ce même proton amide en milieu basique.

Zétamétrie

Les valeurs de potentiel- ζ reportées dans le Tableau 10 apportent des informations complémentaires aux caractérisations précédemment décrites.

Tableau 10 Potentiels- ζ déterminés à 1%_{m/v} pour le copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ aux pHs 5-8-11 à 25 °C et 45 °C

pH	Zeta potentiel (1%) (mV)	
	25 °C	45 °C
5	8,9 ± 0,6	27,4 ± 1,5
8	-0,97 ± 0,08	4,6 ± 0,5
11	-7,4 ± 0,8	-11,9 ± 1,8

En dessous de pKa, le potentiel- ζ augmente de manière significative entre 25 °C et 45 °C. Au cours de la transition, le PNIPAM se déshydrate et se recroqueville sur lui-même, exposant ainsi la PVAm cationique à sa surface extérieure. A pH 11, la transition du PNIPAM reste inchangée, mais dans ce cas les amines sont déprotonées et aucune variation de potentiel- ζ significative n'est mesurée. Au pH intermédiaire proche de pKa, le potentiel- ζ ne subit pas non plus de variation importante entre 25 °C et 45 °C.

Conclusion sur l'influence de l'état de protonation du copolymère sur la T_c

La température de point de trouble du copolymère a été étudiée en fonction de l'état de protonation du bloc PVAm, qu'il soit totalement protoné (pH 5), partiellement protoné (pH 8) ou totalement déprotoné (pH 11). Un tableau comportant l'ensemble des valeurs de T_c déterminées pour chacune des techniques aux 3 pHs est présenté en Annexe 6. Les T_c de ces échantillons ont été impactées par le pH comme attendu. De manière générale, les T_c à pH 5 sont toujours supérieures à celle à pH 11, ce qui était prévisible puisque les ammoniums ont une plus grande hydrophilicité que les amines primaires. Le comportement du pH intermédiaire est plus surprenant et difficile à interpréter puisqu'il présente une T_c souvent inférieure à celles des pH 5 et 11. Cela suggère un caractère moins hydrophile lorsque le bloc n'est pas totalement protoné.

6. Influence de la masse molaire sur T_c

Pour évaluer l'influence de la masse molaire sur le comportement physico-chimique en milieu aqueux des copolymères PVAm-b-PNIPAM, le copolymère PVAm₂₀-b-PNIPAM₁₀₀ a été étudié selon la même méthode que son homologue de faible masse, avec l'accent porté sur le pH > pKa. Il est important de rappeler que les deux copolymères sont de même composition, avec une balance hydrophile/hydrophobe qui est donc conservée, permettant ainsi une comparaison basée sur la seule différence de la masse molaire.

La spectroscopie UV-vis et la diffusion de la lumière apportent une première observation intéressante sur la transition en température du copolymère PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀@pH11 (Figure 34).

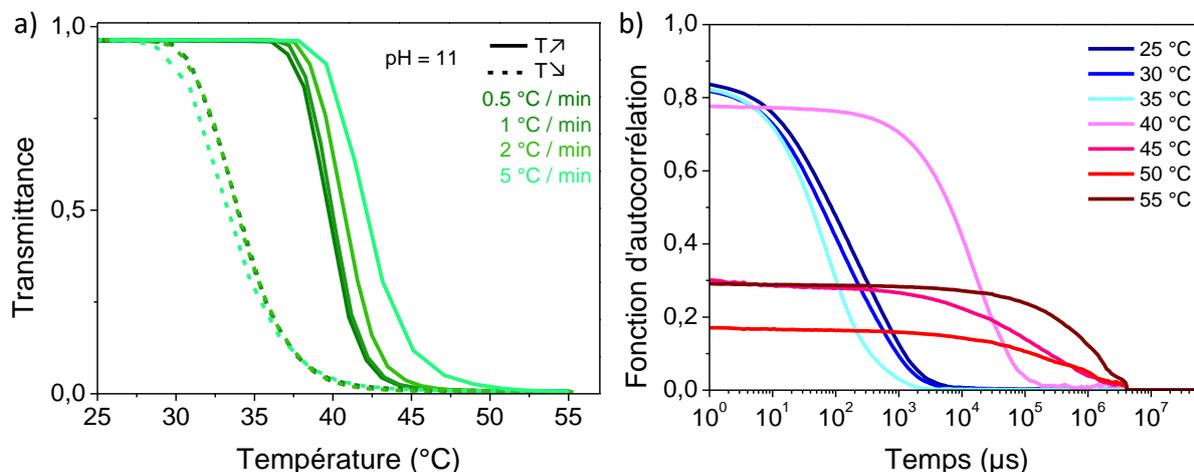


Figure 34 Caractérisation de l'échantillon PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀@pH11 avec a) les courbes de transmittance à 500 nm lors des rampes de chauffage et refroidissement à différentes vitesses (0.5 - 1 - 2 - 5 °C/min) et b) les fonctions d'autocorrélation de DLS lors de la rampe de chauffage de 25 °C à 55 °C

Alors que le copolymère PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀@pH11 présentait une lente resolubilisation, ce n'est pas le cas du copolymère PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀@pH11 dont le profil de refroidissement est net. Ce résultat est contre-intuitif puisqu'on aurait pu imaginer une solubilisation plus difficile du plus long bloc PNIPAM. La diffusion de la lumière ne met pas en évidence de comportements différents entre les deux analogues ; le copolymère PVAm₂₀-PNIPAM₁₀₀@pH11 sédimente au-delà de 35 °C avec la formation de gros agrégats. Les valeurs de T_c des différentes techniques des copolymères PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀@pH11 et PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀@pH11 sont explicitées dans le Tableau 11 pour évaluer l'influence de la masse molaire sur la T_c . Comme on peut le voir, toutes les valeurs de T_c et de potentiel- ζ (-4.1 et -7.4 mV pour PVAm₂₀-PNIPAM₁₀₀@pH11 et PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH11 respectivement) sont proches pour les deux copolymères, suggérant une faible influence de la masse molaire sur ces deux paramètres.

Tableau 11 Comparaison des T_c déterminées par UV, DLS, DSC et des potentiels- ζ déterminés à pH 11 pour les copolymères PVAm₁₀-PNIPAM₅₀ et PVAm₂₀-PNIPAM₁₀₀

	UV (0,1%)	DLS (1%)		DSC (5%)	Zétamétrie	
	T_c à 0 °C/min (°C)	T_c , DCR (°C)	T_c , Zav (°C)	T_c à 0 °C/min (°C)	Potentiel- ζ (mV)	
	heating	heating	heating	heating	25 °C	45 °C
PVAm₁₀-<i>b</i>-PNIPAM₅₀	39,8	36,0	37,5	36,4	-7,4 ± 0,8	-11,9 ± 1,8
PVAM₂₀-<i>b</i>-PNIPAM₁₀₀	40,1	37,3	35,0	35,4	-4,1 ± 0,4	-2,1 ± 0,4

La RMN en température ne présente pas non plus de différence majeure, ce qui était attendu du fait des compositions identiques de deux copolymères. Les spectres et l'évolution des ratios d'intégration sont très similaires comme illustré en Annexe 7.

Conclusion sur l'influence de la masse molaire

La comparaison à pH 11 des deux copolymères PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ et PVAMm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ n'a pas révélé de différences significatives, que ce soit sur les valeurs de T_c déterminées, les mesures de potentiels- ζ ou encore l'allure et l'évolution des spectres RMN. La composition identique entre les deux blocs, et le fait que le PNIPAM est un polymère LCST de type II dont les propriétés sont indépendantes de la masse molaire, permettent d'expliquer ces résultats très similaires.

7. Conclusion sur l'étude des T_c

Cette première partie de l'étude s'est attachée à décrire la transition en température des copolymères PVAm_m-*b*-PNIPAM_n en fonction de l'état de protonation du bloc PVAm, par le biais de la caractérisation du copolymère en solution à différents pHs : pH 5 pour une protonation totale, pH 8 pour une protonation partielle ($pK_a \sim 7,5$) et pH 11 pour une déprotonation totale. La caractérisation s'est appuyée sur une approche multi-échelle, en commençant par la détermination des T_c à partir de caractérisations macroscopiques (DLS, turbidimétrie, DSC) mais également moléculaires (RMN).

Cette étude étant très dense, un tableau simplifié des T_c est présenté ci-dessous (Tableau 12). La T_c donnée pour chaque pH est une valeur moyenne des T_c déterminées par spectroscopie UV-vis, DLS et DSC lors des phases de chauffage.

Tableau 12 Tableau récapitulatif des T_c moyennes des copolymères PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ et PVAMm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ aux 3 pHs d'intérêt

pH	T_c (°C)		
	5	8	11
PVAm₁₀-<i>b</i>-PNIPAM₅₀	38,6	36,2	37,4
PVAMm₂₀-<i>b</i>-PNIPAM₁₀₀	37,3	36,8	36,9

Il est important de retenir, à l'issue de cette étude, les points suivants :

- Les copolymères PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ et PVAM₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ présentent un comportement très similaire en ce qui concerne leur transition, ce qui n'est pas surprenant du fait des compositions identiques,
- Les valeurs de T_c sont plus grandes à pH 5 qu'à pH 11 puisque le copolymère est plus hydrophile du fait de la protonation du bloc PVAm,

- Le comportement à pH 8 est intermédiaire aux deux extrêmes, avec une T_c inférieure aux deux autres.

Ces valeurs seront celles mentionnées dans la suite de ces travaux, et notamment de l'étude des propriétés d'auto-assemblage des copolymères à blocs en fonction du pH et de la température.

4. Propriétés d'auto-assemblage des copolymères

La dernière partie de l'étude du comportement physico-chimique des copolymères PVAm_m-b-PNIPAM_n porte sur leurs propriétés d'auto-assemblage induit par le pH et la température. Il s'agit donc de caractériser, non pas la transition en température, mais ses conséquences en termes de formation d'objets colloïdaux ainsi que l'influence du pH sur leur formation. L'approche pour la caractérisation est la suivante. Dans un premier temps, la diffusion dynamique de la lumière a été réalisée afin d'estimer les tailles d'objets en solution. En parallèle, l'étude de la morphologie de ces objets par MET et SAXS a été menée dans le but d'établir un diagramme de phase simplifié du système pH et thermorépondant, en fonction des paramètres clés pKa et T_c .

1. Etude du copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ à pH 11

Dans un premier temps, des mesures de diffusion de la lumière sont réalisées sur le copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ à pH 11 et une concentration de 1%_{m/v}. Les diamètres hydrodynamiques (Z_{-av}) sont tout d'abord mesurés au cours d'une rampe de chauffage de 25 °C à 55 °C, afin d'évaluer l'évolution en taille des agrégats après la T_c (Figure 27). La qualité des mesures de Z_{-av} est pauvre puisque des agrégats de taille micronique (jusqu'à 20 μm) sont formés, ce qui dépasse la gamme d'analyse en DLS, d'autant plus qu'à cette concentration la diffusion est trop importante du fait de l'opacité de la suspension. Les mesures au-delà de T_c ne sont donc pas pertinentes ; en revanche à $T < T_c$, il est intéressant de remarquer la présence d'agrégats dont le Z_{-av} varie de 190 nm à 25 °C à 75 nm à 36 °C. Cela suggère donc une agrégation spontanée du dibloc double-hydrophile qui est neutre à ce pH et où la PVAm se lie facilement par le biais de liaisons hydrogène inter et intramoléculaires. Pour améliorer et affiner la mesure des diamètres hydrodynamiques, un échantillon de PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀@pH11 a été analysé en DLS multi-angle. Les mesures étant en cours, ces résultats ne seront pas présentés ici.

L'étude de la morphologie des agrégats est complétée par de la microscopie électronique à transmission. La préparation des échantillons est complexe ; il s'agit de comparer l'échantillon à 25 °C et à 45 °C. Pour cela, tout le matériel (grilles, pinces, solutions, etc) a été conditionné à température dans une enceinte contrôlée, puis le dépôt de la solution sur la grille a été réalisé et laissé à sécher dans l'enceinte. Un dépôt de solution de contrastant (acétate d'uranyle) a été fait dans les mêmes conditions. Le dépôt à 25 °C n'a pas permis l'obtention de clichés intéressants contrairement à l'échantillon déposé à 45 °C dont l'image est présentée en Figure 35.

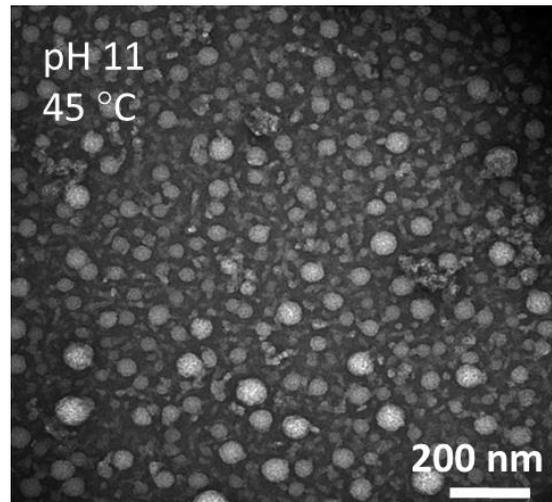


Figure 35 Images MET du copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀@pH11 déposé sur une grille cuivre-carbone à partir d'une solution à 0,1%_{m/v} à 45 °C (contrastant : acétate d'uranyle)

Des objets sphériques et bien définis sont observés, leurs diamètres ont été mesurés avec le logiciel ImageJ et moyennés sur une population d'une quarantaine d'objets. Le diamètre apparent moyen est de 58 ± 10 nm, la distribution est représentée en Annexe 8 et montre une population plutôt polydisperse.

La discussion sur la taille des agrégats est difficile car sur des objets polydisperses comme ceux-ci, le Z-av n'est pas une mesure précise du diamètre hydrodynamique. Les mesures de DLS multi-angle seront les plus pertinentes. Le diamètre apparent mesuré en MET est quant à lui bien inférieur aux Z-av car il s'agit d'objets déshydratés donc les diamètres sont logiquement plus petits.

Enfin, pour aller plus loin dans la compréhension du système, des analyses de diffusion de rayons X aux petits angles sont réalisées sur le copolymère, à une concentration de 1%_{m/v} et sur une gamme de température de 20 à 50 °C. Les profils de diffusion obtenus en fonction de la température (Figure 36) montrent une augmentation de l'intensité $I(q)$ entre 20 et 35 °C puis une diminution après la T_c .

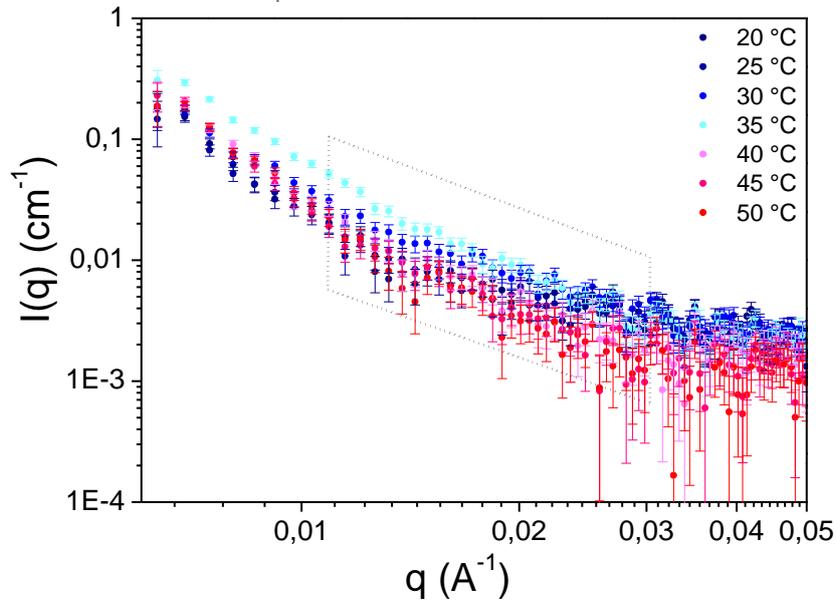


Figure 36 Mesures SAXS, avec $I(q)$ en fonction de q avec $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, de 20 °C et 50 °C sur l'échantillon PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ à pH 5 à 1%_m. La zone encadrée correspond à l'intervalle de q sur lequel la pente α de la loi de puissance $I(q) \sim q^{-\alpha}$ a été déterminée.

Dans la région des moyens q , $I(q)$ suit une loi de puissance $I(q) \sim q^{-\alpha}$ avec α qui est déterminé tel que la pente de l'intervalle encadré (Figure 36). L'évolution de α de 2.13 à 25 °C et 3.03 à 45 °C suggère une densification des agrégats au cours de la rampe en température. Cette observation est en accord avec les résultats de DLS qui ont montré l'agrégation au-delà de T_c d'agrégats déjà préexistants à $T < T_c$. De plus, le SAXS confirme le caractère incontrôlé de cette agrégation puisque les morphologies ne sont pas bien définies.

2. Etude du copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ à pH 5

La caractérisation du dibloc à pH 5, c'est-à-dire dans sa forme totalement protonée, a été réalisée selon la même méthode. Dans un premier temps, l'évolution des diamètres hydrodynamiques (Z -av) est étudiée en DLS à 1%_{m/v} (Figure 37). La cinétique d'agrégation a été étudiée en comparant les diamètres issus de rampe en température et ceux des mesures discrètes entre 25 °C et 55 °C. Les mesures discrètes correspondent aux mesures acquises après un retour à la température ambiante entre chaque température, contrairement à la rampe de température durant laquelle la température croît de façon continue.

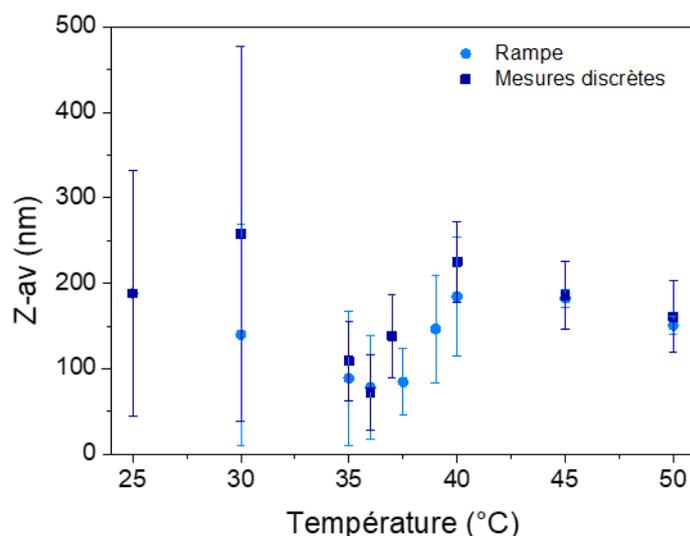


Figure 37 Mesures de diamètres hydrodynamiques ($Z\text{-}av$) par DLS de l'échantillon $PVAm_{10}\text{-}b\text{-}PNIPAM_{50}@pH5$ à $1\%_{m/v}$ lors d'une rampe (●) en température de 25 °C à 50 °C ou au cours de mesures discrètes (■) sur cette même gamme avec un retour à température ambiante entre chaque mesure

L'auto-assemblage du copolymère à pH 5 n'est pas sensiblement impacté par le type de chauffage. Dans les deux cas, une diminution de $Z\text{-}av$ est observée d'environ 180 nm à 25 °C à 80 nm à 36 °C , après quoi les objets recouvrent le $Z\text{-}av$ initial à 40 °C .

Les mesures plus précises de DLS multi-angle ont été réalisées (Figure 38). L'intérêt de la DLS multi-angle est de s'affranchir de la dépendance de la mesure « mono-angle » à l'angle à laquelle elle est réalisée. Si une mesure de diffusion à un seul angle est fiable pour une distribution monomodale, dans le cas d'une distribution plus complexe cette mesure peut induire de grandes imprécisions sur la détermination des diamètres hydrodynamiques. Des mesures à différentes températures ont été réalisées entre 25 et 55 °C de manière discrète uniquement, c'est à dire avec un retour à la température ambiante entre chaque température et non pas par une rampe de température durant laquelle la température croît de façon continue. Ce choix s'explique par le fait qu'à $T > T_c$, un phénomène de diffusion multiple est observé et fausse la mesure. Pour s'affranchir de la diffusion multiple, un paramétrage spécifique est nécessaire avant chaque acquisition et ne peut donc pas être ajusté lors d'une rampe.

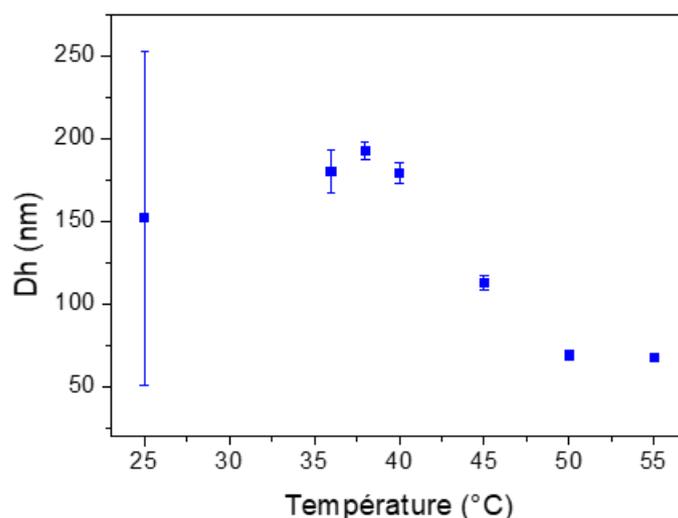


Figure 38 Mesures de diamètres hydrodynamiques (D_h) par DLS multi-angle de l'échantillon PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀@pH5 à 1%_{m/v} de 25 °C à 55 °C (mesures discrètes)

Quel que soit le type de mesures (monoangle : Figure 37 ou multiangle : Figure 38), le copolymère PVAm₁₀-PNIPAM₅₀@pH5 s'auto-assemble spontanément à 25 °C pour former des agrégats polydisperses avec un diamètre moyen de 150 nm. Au-delà de T_c , une diminution significative du D_h mesurée peut être observée : ainsi si des diamètres hydrodynamiques de 190 nm sont évalués à 38 °C, ceux-ci chutent autour de 60 nm au-delà de 50°C. Dans le même temps, une forte diminution de la dispersité est mesurée, le PDI passant de 0.7 à 25 °C à 0.06 à 45 °C. Ces dispersités observées sur la Figure 38 sont en accord avec les fonctions de corrélation présentées en Figure 32 montrant que la dispersité diminue lorsque la température augmente. Cela suggère un état des agrégats plus organisé au-delà de T_c et au contraire, désordonné et aléatoire en dessous de T_c .

En microscopie, des particules sphériques avec un diamètre apparent moyen de 19 ± 2 nm sont observées à 25 °C (Figure 39a). A 45 °C, les objets sont principalement sphériques avec un diamètre de 24 ± 3 nm (Figure 39b). Les distributions sont présentées en Annexe 8 et montrent des populations monodisperses aux deux températures.

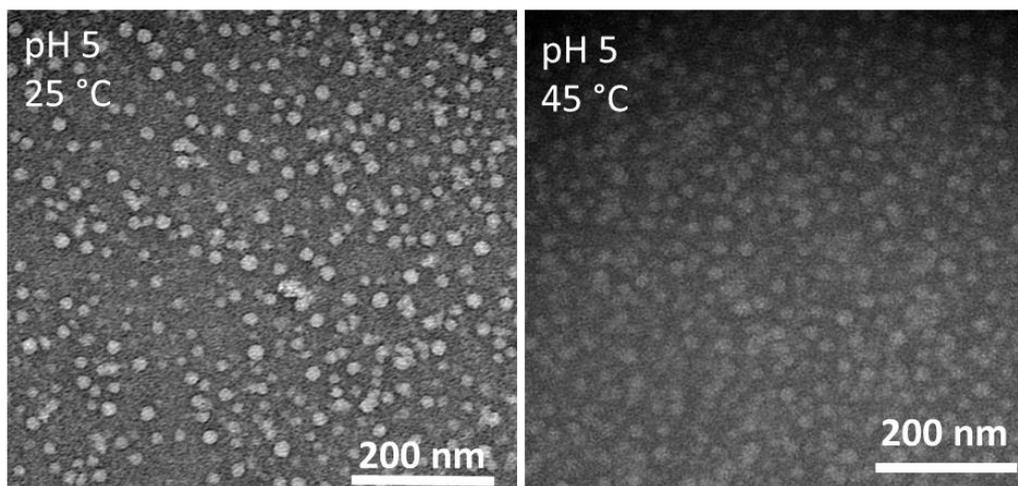


Figure 39 Images MET du copolymère PVA_{m10}-b-PNIPAM₅₀@pH5 déposé sur une grille cuivre-carbone à partir d'une solution à 0,1%_{m/v} à 25 °C (gauche) et à 45 °C (droite). (Contrastant : acétate d'uranyle)

La diminution de la dispersité des agrégats lors du chauffage n'a pas été constatée en MET, ce que l'on peut probablement attribuer au fait que les agrégats en solution n'ont pas le même comportement que ceux qui sont secs. De même, les D_{TEM} sont bien inférieurs aux D_h mesurés en DLS. Pour éviter ces différences et observer les particules figées en suspension, une campagne de Cryo-MET a été menée mais n'a pas permis d'obtenir de clichés satisfaisants. Des mesures de SAXS ont enfin été réalisées afin de compléter ces résultats : les profils SAXS montrent d'importantes différences entre $T < T_c$ et $T > T_c$ (Figure 40)

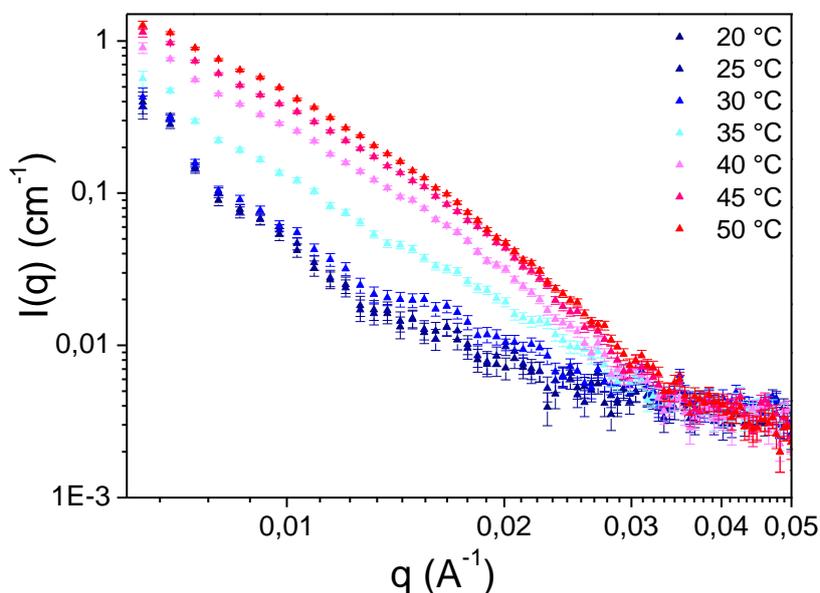


Figure 40 Mesures SAXS, avec $I(q)$ en fonction de q avec $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, de 20 °C et 50 °C sur l'échantillon PVA_{m10}-b-PNIPAM₅₀ à pH 5 à 1%_m

En effet, à $T < T_c$, les agrégats sont de types fractales, c'est-à-dire non-organisés, alors qu'à $T > T_c$, le profil de diffusion suggère plutôt des nano-objets structurés. Cependant, l'absence de

stabilisation de $I(q)$ dans la région des petits q indique la présence d'agrégats résiduels. Aux moyens q , $I(q)$ suit la loi de puissance $I(q) \sim q^{-\alpha}$, avec α estimé à 2,4 à 25 °C et 1,72 à 45 °C. Les profils de diffusion à pH 5 et 11, à 25 et 45 °C sont comparés dans la Figure 41 afin d'évaluer l'influence de l'état de protonation du bloc PVAm sur l'agrégation des objets en solution.

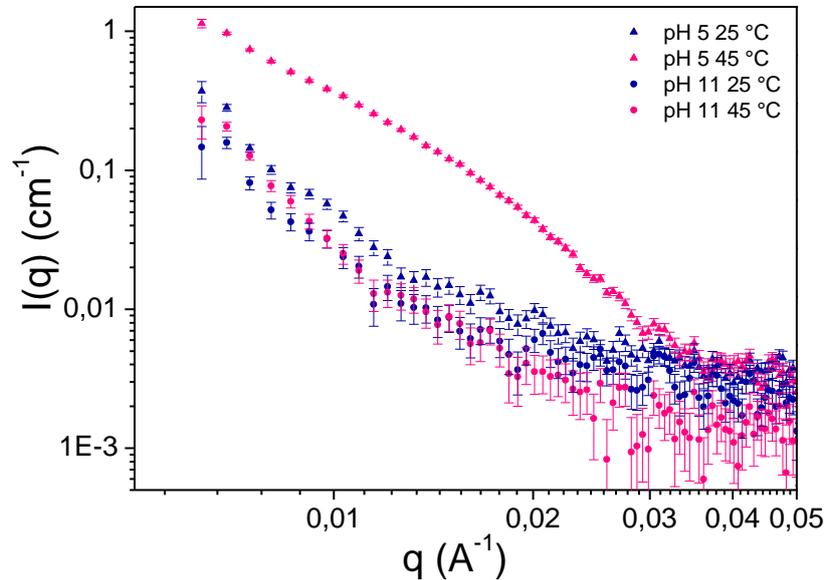


Figure 41 Mesures SAXS, avec $I(q)$ en fonction de q avec $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, sur les échantillons PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ à 1%_m à pH 5 (▲) et à pH 11 (●) à 25 °C (bleu) et 45 °C (rose)

On constate une claire différence entre le profil à pH 5 45 °C et les autres, ce qui est en accord avec l'ensemble des caractérisations préalablement réalisées. A pH 5, quand $T > T_c$ sont formés des nano-objets structurés. A 45 °C, en considérant un modèle de nano-objets cœur dense/couronne hydratée, et en faisant donc l'hypothèse que seul le PNIPAM contribue significativement au signal SAXS, un diamètre moyen de 30 nm est estimé pour le cœur déshydraté de PNIPAM (sur la base de la position des minimums observés sur ces courbes). En faisant l'hypothèse d'une densité de $\rho_{\text{PNIPAM}} = 1,1 \text{ g/cm}^3$ pour le cœur de PNIPAM déshydraté, le nombre d'agrégation N_{agg} peut être estimé dans ce cas, connaissant la dimension du cœur ($R_{\text{PNIPAM}} = 15 \text{ nm}$), la masse molaire de celui-ci (M_{PNIPAM}) et avec N_A : nombre d'Avogadro, en utilisant l'équation suivante :⁷⁴

$$N_{\text{agg}} = \frac{4\pi \cdot \rho_{\text{PNIPAM}} \cdot R_{\text{PNIPAM}}^3 \cdot N_A}{3M_{\text{PNIPAM}}}$$

Un nombre d'agrégation de 1600 macromolécules par objet est ainsi estimé.

L'étude SAXS a également été réalisée sur les solutions de copolymère PVAm₂₀-b-PNIPAM₁₀₀ et a montré un comportement très similaire avec des agrégats à 25 °C et 45 °C à pH 11, et une transition d'agrégats vers des nano-objets à pH 5 lorsque $T > T_c$. Les courbes de SAXS sont présentées en Annexe 9.

3. Diagramme de phase de l'auto-assemblage du copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ en fonction du pH et de la température

A l'issue de cette étude sur l'auto-assemblage du copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀, nous avons établi un diagramme de phase en fonction de paramètres pKa et T_c (Figure 42) :

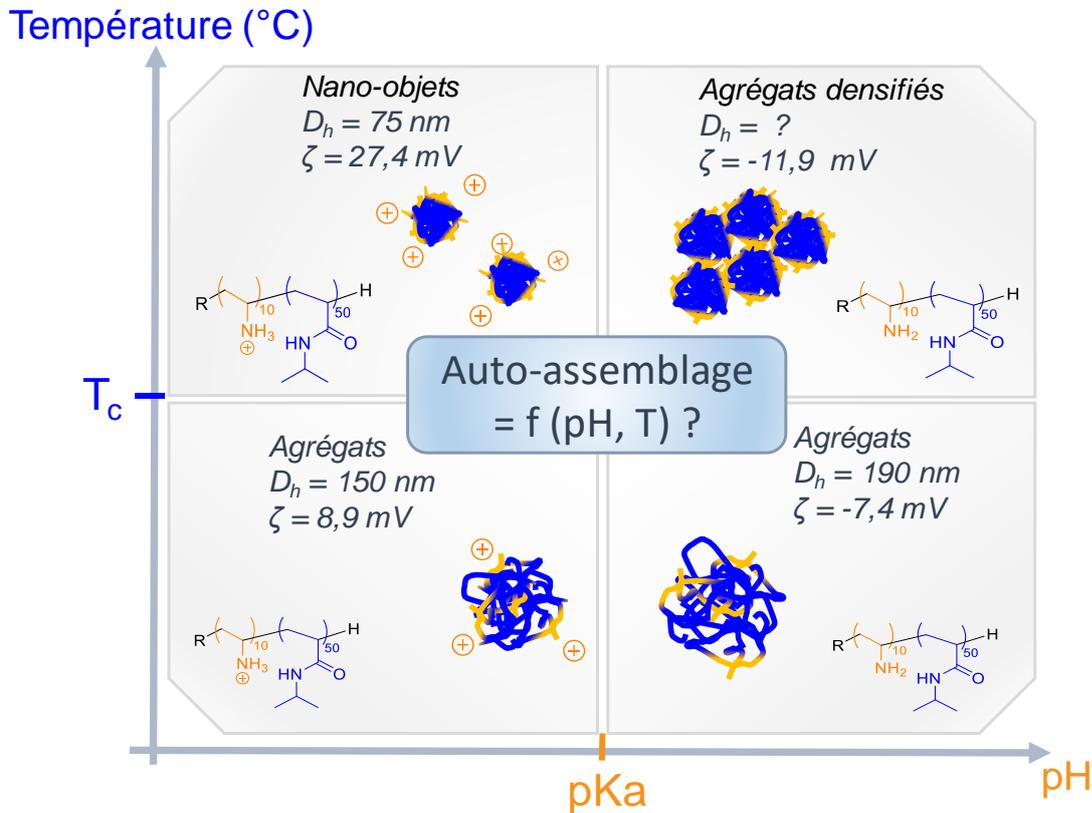


Figure 42 Représentation schématique du copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀ en fonction du pKa et de la T_c

A $T < T_c$, les objets se présentent sous la forme d'agrégats de diamètre hydrodynamique $> 150 \text{ nm}$. A $\text{pH} < \text{pKa}$, ceux-ci ont une charge de surface positive car le bloc PVAm est totalement protoné. Au-delà de T_c , sous l'effet de la déshydratation partielle du PNIPAM, les objets subissent une transition de morphologie qui dépend du pH.

A $\text{pH} > \text{pKa}$, l'étude SAXS indique que les agrégats se densifient et forment des agrégats d'agrégats. Des mesures de DLS multi-angle sont en cours pour la détermination du diamètre hydrodynamique.

A $\text{pH} < \text{pKa}$, le SAXS et la DLS tendent à montrer que des nano-objets structurés se forment. L'hypothèse faite est qu'il s'agit d'objets de type cœur dense/couronne hydratée, avec le PNIPAM au cœur et la PVAm en couronne. Ces objets sont stabilisés par répulsion électrostatique interparticulaire du fait de la charge positive de surface ($27,4 \text{ mV}$) apportée par la PVAm.

5. Conclusion de l'étude physico-chimique des diblocs PVAm_m-PNIPAM_n

L'objectif de ce chapitre a été d'étudier le caractère thermoassociatif des copolymères PVAm_m-*b*-PNIPAM_n synthétisés dans le Chapitre 2. Ces copolymères double-hydrophiles présentent à la fois une sensibilité au pH et à la température, ce qui leur confère des propriétés intéressantes d'auto-assemblage en solution qui n'avaient pas été étudiés en détail jusqu'ici dans la littérature.

Dans un premier temps, le pKa du dibloc a été estimé puis sa température de point de trouble a été déterminée à différents états de protonation du bloc polyaminé : pH 5 pour une protonation totale, pH 8 pour une protonation partielle (pKa ~ 7,5) et pH 11 pour une déprotonation totale. De manière générale, les valeurs de T_c déterminées par turbidimétrie, DLS et DSC sont plus grandes à pH 5 qu'à pH 11 puisque le copolymère est plus hydrophile du fait de la protonation du bloc PVAm.

Les copolymères PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ et PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ présentent un comportement très similaire en ce qui concerne leur transition, ce qui était attendu car le PNIPAM présente un LCST de type II qui n'est donc pas affecté par la masse molaire.

Dans la deuxième partie de l'étude, les tailles et morphologies des agrégats formés par le copolymère à T < T_c et T > T_c ont été caractérisées par DLS, DLS multi-angle, SAXS et MET. Cette étude a révélé que le copolymère s'auto-assemble de manière spontanée à température ambiante, à pH < pKa et pH > pKa. Les agrégats formés ont un diamètre de l'ordre de 150-200 nm et sont polydisperses. Au-delà de la T_c, le comportement du dibloc diffère en fonction de l'état de protonation. En effet, à pH < pKa, lorsque le dibloc est neutre, une densification des agrégats préexistants à 25 °C a été observée à 45 °C en DLS et en SAXS. Au contraire, à pH 5, lorsque la PVAm est chargée, une transition de morphologie d'agrégats vers des nano-objets a été caractérisée par DLS et SAXS. Une diminution de la polydispersité a confirmé ce résultat. Une première interprétation des profils de diffusion des rayons X a permis de faire l'hypothèse que ces nano-objets se présentent sous la forme de particules cœur-couronne, avec un cœur dense de PNIPAM d'environ 30 nm et une couronne hydratée de PVAm.

En conclusion, cette étude a bien permis de mettre en avant la complexité du comportement des diblocs PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ et PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ en solution aqueuse. Dans le cadre de ce projet, ces résultats nous indiquent que le copolymère sera toujours sous la forme d'agrégats ou de nano-objets en solution et qu'il est important de prendre cette agrégation en compte pour la modification de surface des particules à base de polysaccharide avec ce polymère.

De manière plus globale, cette étude physico-chimique permet de renforcer l'intérêt pour ce copolymère cationique thermorépondant qui a un grand potentiel pour des applications biomédicales.¹⁸

P1 – Chapitre 4 : Matériel et méthodes

Dans ce chapitre seront présentés les protocoles mis au point et utilisés dans l'ensemble de la Partie 1. Dans un premier temps, les réactifs seront listés, puis la partie expérimentale liée à la synthèse des copolymères à blocs PVAm_m-b-PNIPAM_n sera décrite. Enfin, les techniques analytiques utilisées lors de l'étude des propriétés physico-chimiques des copolymères seront brièvement explicitées.

1. Réactifs et matériel

Les réactifs N-Vinylphthalimide (NVPI, 99%, Acros Organics), N-Isopropylacrylamide (NIPAM, 97%, Aldrich), hydrazine monohydrate (98%, Sigma Aldrich), peroxyde de dilauroyle (LPO, 99%, Acros Organics) ainsi que les solvants méthanol (99.9%, Sigma-Aldrich), N-N-diméthylformamide (DMF, 99.9%, Sigma-Aldrich), éther diéthylique (99.9% Sigma-Aldrich), 1,4-dioxane (VWR) ont été utilisés sans purification préalable.

L'amorceur thermique de polymérisation radicalaire, 2,2-Azobisisobutyronitrile (AIBN, 98%, Acros Organics) a été purifié par recristallisation dans le méthanol. L'agent de transfert de polymérisation MADIX O-ethyl-S-(1-méthoxycarbonyl) ethyldithiocarbonate (xanthate XA1), a été synthétisé au sein de l'équipe P3R du laboratoire des IMRCP par un protocole préalablement mis au point et décrit dans la littérature.⁸⁹

L'eau ultra-pure (Elga Purelab Flex) utilisée pour la solubilisation des copolymères lors de l'étude physico-chimique a une résistivité inférieure à 18 MΩ/cm.

2. Synthèse des copolymères PVAm_m-b-PNIPAM_n

1. Polymérisation RAFT/MADIX du macro-CTA PVPI_m-X

La synthèse des macro-CTA PVPI₁₀-X et PVPI₂₀-X a été adaptée de Mori *et al.*² Le ratio $[M]_0/[CTA]_0$ a été adapté de manière à obtenir le degré de polymérisation moyen en nombre (DP_n) souhaité. Le protocole usuel de la synthèse des macro-CTA PVPI_n-X est le suivant : dans un tube de Schlenk sont introduits le monomère N-vinyl phthalimide, le xanthate XA1, l'amorceur AIBN et le DMF. La solution est dégazée par 4 cycles de congélation-évacuation sous vide. Le réacteur est alors mis sous argon, avant d'être introduit dans un bain d'huile à 60 °C pour 24 h sous agitation. La polymérisation est stoppée par refroidissement brutal dans l'azote liquide. Le mélange réactionnel obtenu est visqueux, de couleur jaune pâle ; un échantillon est prélevé pour une analyse RMN ¹H dans le DMSO-d₆, afin de déterminer la conversion du monomère. Finalement, le polymère est obtenu par précipitation dans l'éther diéthylique sous vive agitation, puis filtré et séché sous vide. Des analyses SEC et RMN ¹H sont réalisées pour déterminer respectivement les valeurs de $M_{n,MALS}$ et $M_{n,RMN}$.

2. Copolymérisation RAFT/MADIX des copolymères à blocs PVPI_m-b-PNIPAM_n-X

En réacteur fermé

La procédure typique de copolymérisation à blocs des copolymères PVPI_m-b-PNIPAM_n-X est la suivante : dans un tube de Schlenk sont introduits le macro-CTA PVPI_m-X précédemment synthétisé, le monomère NIPAM, l'AIBN et le DMF (4 mL). Les réactifs sont solubilisés puis la solution est dégazée par 4 cycles de congélation-évacuation sous vide. Le réacteur est alors mis sous argon avant d'être introduit dans un bain d'huile à 65 °C pendant 17 h sous agitation. La polymérisation est stoppée par refroidissement brutal dans l'azote liquide. Un échantillon est prélevé pour une analyse RMN dans le DMSO-d₆ afin de déterminer la conversion du monomère. Finalement, le polymère est obtenu par précipitation dans l'éther diéthylique sous vive agitation, puis filtré et séché sous vide. Des analyses SEC et RMN ¹H sont réalisées pour déterminer respectivement les valeurs de $M_{n,MALS}$ et $M_{n,RMN}$.

En réacteur semi-fermé

La polymérisation en réacteur semi-fermé ou semi-batch consiste à apporter un réactif tout au long de la polymérisation. En pratique, ce procédé se réalise grâce à un montage de pousse seringue qui permet de contrôler la vitesse d'ajout de la solution via un septum dans le réacteur. Les conditions expérimentales sont adaptées pour être les plus similaires possibles aux conditions de la polymérisation de PVPI₁₀-b-PNIPAM₅₀-X en batch. Dans un tube de Schlenk sont introduits l'AIBN, le macro-CTA PVPI₁₀-X et le DMF tel que la fraction massique de macro-CTA dans le mélange représente 30%_m. Une solution de 5 mL de NIPAM à 30%_m dans le DMF est introduite dans la seringue. Les deux solutions sont dégazées par 4 cycles de congélation-évacuation sous vide. Le réacteur est introduit dans un bain d'huile à 65 °C, 4 mL de la solution de monomère sont ajoutés avec un débit de 0.5 g/h, ce qui représente une durée d'introduction de 8 h. La réaction est maintenue 30 min à 65 °C après la fin de l'ajout de monomère. Des prélèvements dans le milieu réactionnel sont réalisés à intervalles de temps réguliers et sont analysés en RMN ¹H et en SEC. Finalement, le polymère est obtenu par précipitation du brut réactionnel dans l'éther diéthylique sous vive agitation, puis filtré et séché sous vide. Des analyses SEC et RMN ¹H sont réalisées pour déterminer respectivement les valeurs de $M_{n,MALS}$ et $M_{n,RMN}$.

3. Désactivation du xanthate en bout de chaîne

L'étape d'élimination du bout de chaîne xanthaté est réalisée selon un protocole de réduction radicalaire décrit dans la littérature.⁷⁶ Le copolymère PVPI_m-b-PNIPAM_n-X est introduit dans un tube de Schlenk en présence de LPO dans une solution de propane-2-ol. La solution est dégazée par 4 cycles de congélation-évacuation sous vide, puis le réacteur est mis sous argon avant d'être placé dans un bain d'huile à 80 °C. Le mélange réactionnel est maintenu à 80 °C pendant 10 h ; un volume prédéfini de solution de LPO dans le propane-2-ol préalablement dégazé

a été ajouté toutes les 2 h. Le solvant a ensuite été évaporé sous vide et le copolymère résiduel solubilisé dans le DMF avant d'être précipité dans l'éther diéthylique. Finalement le copolymère est précipité, filtré et séché sous vide.

4. Hydrazinolyse des copolymères PVPI_m-b-PNIPAM_n-H

La déprotection du bloc PVPI est réalisée par hydrazinolyse selon le protocole de Mori *et al.*³ L'hydrazine étant un composé CMR extrêmement toxique, des précautions supplémentaires ont été prises dans la manipulation de ce produit ainsi que des déchets générés par cette étape.

Le copolymère PVPI_m-b-PNIPAM_n-H est solubilisé dans un ballon dans un mélange de méthanol/dioxane en proportions volumiques 2/1. L'hydrazine est introduite à la seringue dans la solution. Le mélange est dégazé par bullage sous Ar pendant 1 h. Le ballon est ensuite équipé d'un condenseur et connecté à la rampe d'Ar. Le mélange est porté à reflux (85 °C) sous un flux constant d'Ar pendant 6 h. Les solvants sont alors évaporés sous vide, le polymère restant est solubilisé dans un mélange MeOH/HCl_{aq}(0.5M) en proportions volumiques 2/1. Le copolymère PVAm_m-b-PNIPAM_n est alors précipité dans l'éther diéthylique, filtré et séché sous vide. Enfin, une dialyse du copolymère en solution à pH > 9 est réalisée dans une membrane de dialyse de seuil de coupure de 1 kDa (GE Healthcare Bio-Sciences Corp) contre un grand volume d'eau ultrapure renouvelé 3 fois par jour pendant 4 jours. Le copolymère est finalement isolé par lyophilisation (Christ Alpha 2-4 LSC basic) et utilisé tel quel pour l'étude physico-chimique.

5. Caractérisations de la partie synthèse

Détermination de la conversion du monomère par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ¹H ont été acquis sur un spectromètre Bruker Advance 300 MHz. La conversion du NVPI lors de la polymérisation du premier bloc est déterminée grâce au prélèvement du brut réactionnel dilué dans du DMSO-d₆. L'attribution et l'intégration des signaux sont représentés dans la Figure 43 ci-dessous et donne lieu à la formule :

$$\% \text{ conversion NVPI} = 100 * [1 - 5 * H_{\text{NVPI}, 5.1 \text{ ppm}} / (H_{\text{massif}, 7.5 \text{ ppm}} - H_{\text{DMF}, 2.7 \text{ ppm}} / 3)]$$

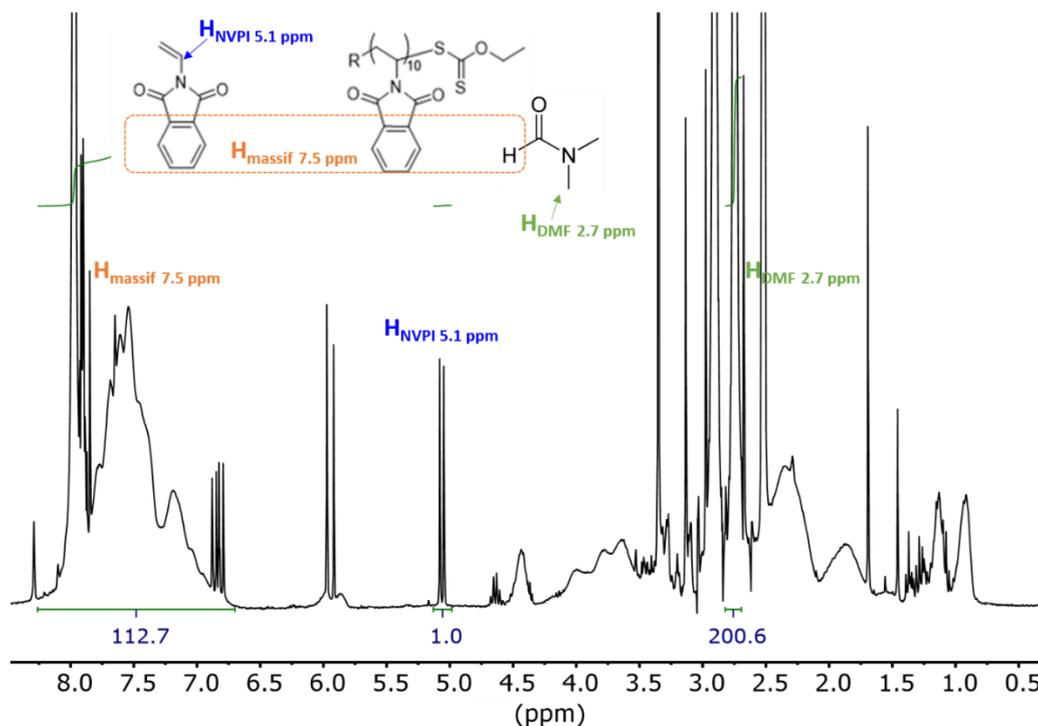


Figure 43 Détermination de la conversion du NVPI, spectre RMN 1H acquis à 300 MHz du brut réactionnel à $t = 24$ h

La conversion du NIPAM lors de la copolymérisation du dibloc est déterminée à partir du brut réactionnel telle que :

$$\% \text{conv NIPAM} = 100 * [1 - (\text{H}_{\text{vinylique}}, 5.5 \text{ ppm} / \text{H}_{\text{isopropyl-CH}}, 3.8 \text{ ppm})]$$

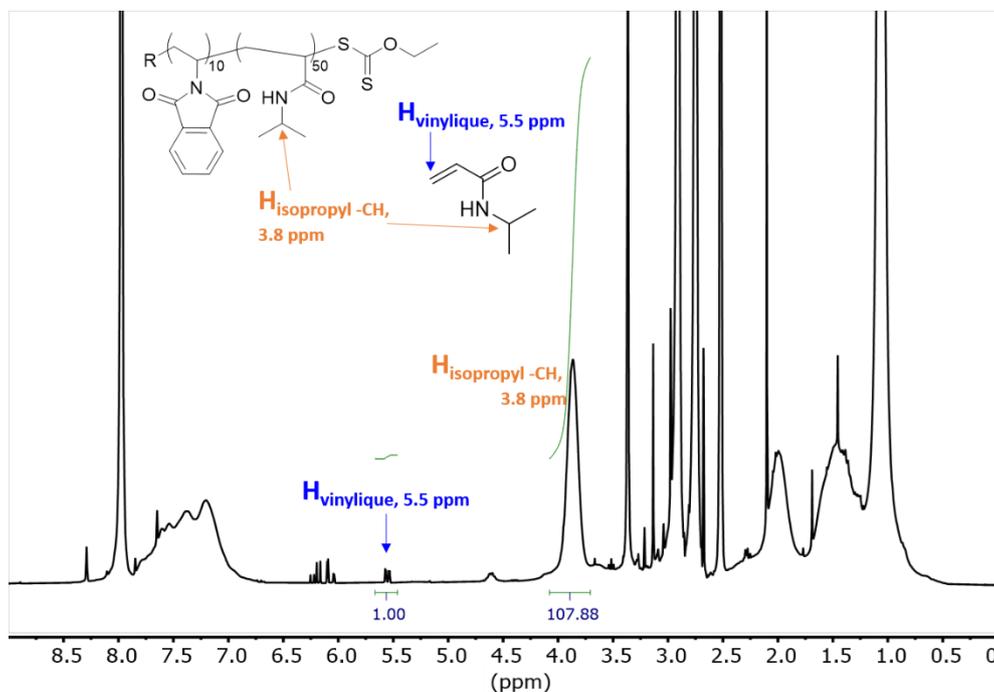


Figure 44 Détermination de la conversion du NIPAM, spectre RMN 1H acquis à 300 MHz du brut réactionnel à $t = 17$ h

Détermination de l'incrément d'indice de réfraction dn/dc

La valeur de dn/dc du polymère PVPI_m-X dans le DMF-LiBr (10 mM) a été mesurée grâce à un détecteur d'indice de réfraction (DnDc 2012 PSS) thermostaté à 35 °C, à une longueur d'onde de 620 nm. La valeur $dn/dc_{(PVPI, DMF LiBr 10 mM)}$ est 0.153 mL/g.

Le dn/dc du copolymère PVPI_n-*b*-PNIPAM_m a été calculé via la relation linéaire suivante : $dn/dc_{(A-bloc-B)} = F_A * dn/dc_A + F_B * dn/dc_B$ avec F_A et F_B les fractions massiques des blocs A et B respectivement. Selon des travaux antérieurs⁹⁰ décrivant que $dn/dc_{(PNIPAM, DMF LiBr 10 mM)} = 0.087$ mL/g, nous estimons que $dn/dc_{(PVPI-b-PNIPAM)} = 0.103$ mL/g.

Détermination des M_n et dispersités par chromatographie d'exclusion stérique (Size Exclusion Chromatography, SEC)

Les échantillons de polymères sont préparés dans du DMF contenant 10 mM de LiBr à une concentration de 5 mg/mL, puis filtrés sur filtre PTFE 0.45 µm. Les solutions sont injectées à un débit de 1 mL/min par une pompe Dionex UltiMate 3000 UHPLC de Thermo Scientific et éluées à travers deux colonnes Tosoh (α -2500, 8.0 x 300 mm and α -3000, 8.0 x 300 mm). Les colonnes sont thermostatées à 55 °C. Une multi-détection est permise grâce à un détecteur d'indice de réfraction (RI) Wyatt Optilab rEX, un détecteur UV Varian ProStar 325 UV et un détecteur de diffusion multiple de la lumière (Multiangle Light Scattering, MALS) Wyatt MiniDawn TREOS. Le détecteur MALS permet d'accéder à des valeurs absolues de M_n grâce aux valeurs de dn/dc . Le traitement des données SEC a été réalisé sur le logiciel Astra7 de Wyatt Technology.

3. Etude physico-chimique des copolymères PVAm_m-b-PNIPAM_n

1. Préparation des solutions

Les solutions de copolymères sont préparées dans l'eau ultrapure, les pH sont ajustés par des ajouts de NaOH 1M et HCl 1M. Les concentrations et pH étudiés avec chaque technique sont résumés dans le Tableau 1 ci-dessous :

Tableau 13 Concentrations des échantillons selon les techniques et pH étudiés

Caractérisation	Concentration	Copo.	pH	Copo.	pH
Spectroscopie UV-vis, Cryo-MET	0.1 % _{m/v}	PVAm ₁₀ -b-PNIPAM ₅₀	5.7	PVAm ₂₀ -b-PNIPAM ₁₀₀	4.6
			7.7		7.5
			11.0		9.3
DLS, Zétamétrie	1 % _{m/v}		5.6		3.7
			8.1		7.4
			12.1		11.0
RMN 1H	1% _{m/v} D ₂ O		6,3		4.9
			8,1		7.5
			12,1		11.2
DSC	5% _{m/v}		1,4		1,2
		8,0	-		
		10,8	12,5		
SAXS	10% _{m/v}	6,3	6,3		
		9,5	9,3		

2. Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS)

Les mesures de DLS sont réalisées sur un appareil Malvern ZetaSizer Nano ZS doté d'un laser He-Ne émettant à 633 nm. Pour chaque analyse, un temps de stabilisation de 120 est appliqué. 5 mesures de 10 réplicas de 10 secondes chacun sont enregistrées tous les 0.5 °C sur une gamme de température allant de 25 °C à 55 °C pendant les phases de chauffage, et de 55 °C à 25 °C pendant les phases de refroidissement.

Le principe des mesures de diffusion de la lumière est présenté en Annexe 10.

3. Spectroscopie UV-visible

Les mesures de turbidité en fonction de la température ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-vis (VARIAN CARY 100 BIO) à l'aide du mode Thermal du logiciel Cary Win UV.

L'échantillon de référence est de l'eau ultrapure. La température est contrôlée par une sonde dans un second échantillon de référence contenant de l'eau ultrapure. Pour la détermination des températures de point de trouble, des rampes de chauffage et refroidissement successives à

différentes vitesses (0.5, 1, 2, 5 °C/min) ont été appliquées. L'absorbance a été mesurée à 500 nm avec un pas de 1 °C entre 25 °C et 55 °C. Le point de trouble a été défini pour chaque rampe tel que le point d'inflexion des courbes de transmittance en fonction de la température, puis extrapolé à 0 °C/min par une régression linéaire. La réversibilité de la transition LCST a été vérifiée par 6 cycles de chauffage et refroidissement successifs à 1 °C/min entre 25 °C et 45 °C.

4. Analyse enthalpique différentielle (Differential Scanning Calorimetry, DSC)

Les analyses calorimétriques ont été réalisées par un appareil de DSC (FRS, Mettler Toledo) dans des creusets moyenne pression contenant 100 µL de solution de polymère. La séquence d'analyse est composée d'un premier cycle de chauffage/refroidissement à 10 °C/min, puis de 4 cycles successifs à 10-5-2-1 °C/min entre 20 °C et 55 °C. Un isotherme de 3 minutes est maintenu entre chaque rampe. Les températures de point de trouble pour chaque rampe sont déterminées à l'aide du logiciel Star-e par intégration des pics exothermiques liés à la LCST du PNIPAM. Finalement, les T_c sont extrapolées à 0 °C/min.

5. Zétamétrie

Les mesures de potentiels- ζ sont réalisées sur un appareil Malvern ZetaSizer Nano ZS doté d'un laser He-Ne émettant à 633 nm. Pour chaque analyse, un temps de stabilisation de 120 est appliqué. 3 mesures d'un minimum de 15 répliques chacune sont enregistrées à 25 °C et 45 °C. La valeur moyenne de ces 3 mesures est associée à son écart-type.

6. RMN en température

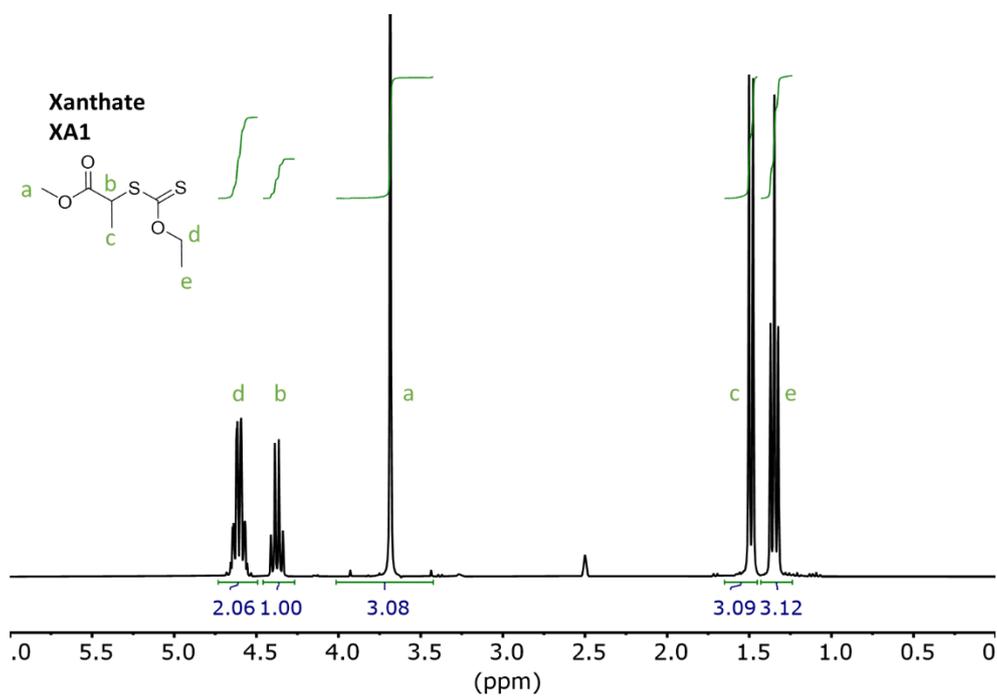
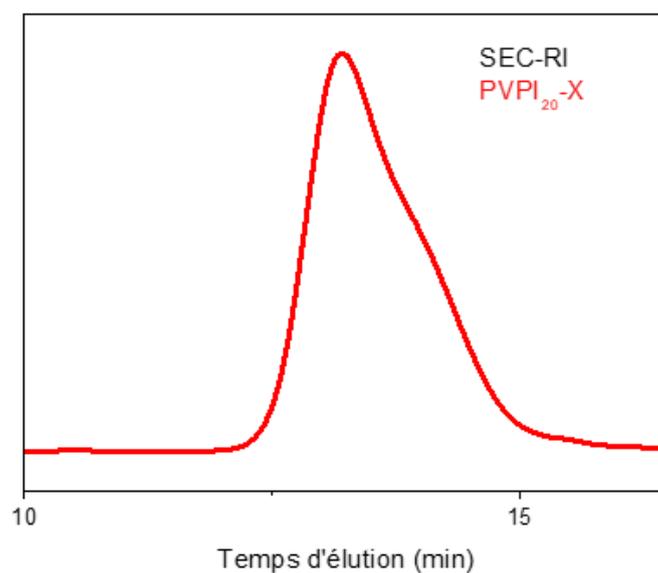
Les spectres de RMN¹H ont été acquis sur un spectromètre Bruker Advance 400 MHz à différentes températures allant de 20 ° à 55 °C. Les échantillons sont préparés dans le D₂O à environ 30 mg/mL. Le traitement des données est effectué grâce au logiciel MestReNova.

7. SAXS

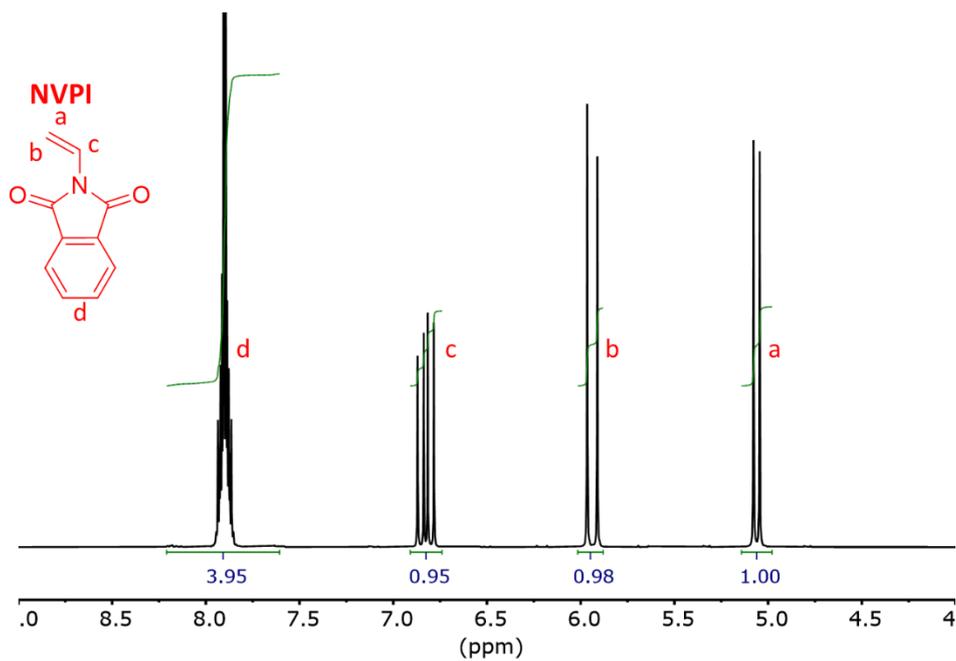
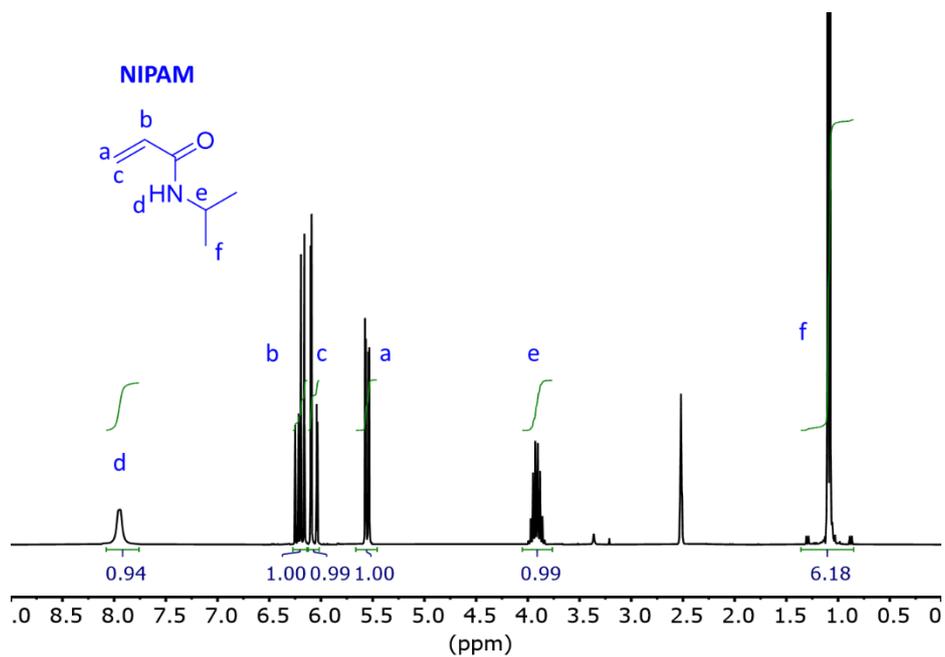
Les analyses de diffusion de rayonnement X aux petits angles (SAXS) ont été réalisées sur un banc XEUSS 2.0 équipé d'une source interne au cuivre qui permet de produire un faisceau de rayons X d'énergie de 8 keV. Les échantillons ont été préparés à une concentration de 10 %_{m/v} à pHs 5 et 11. Les mesures ont été acquises au cours d'une rampe en température entre 20 et 50 °C.

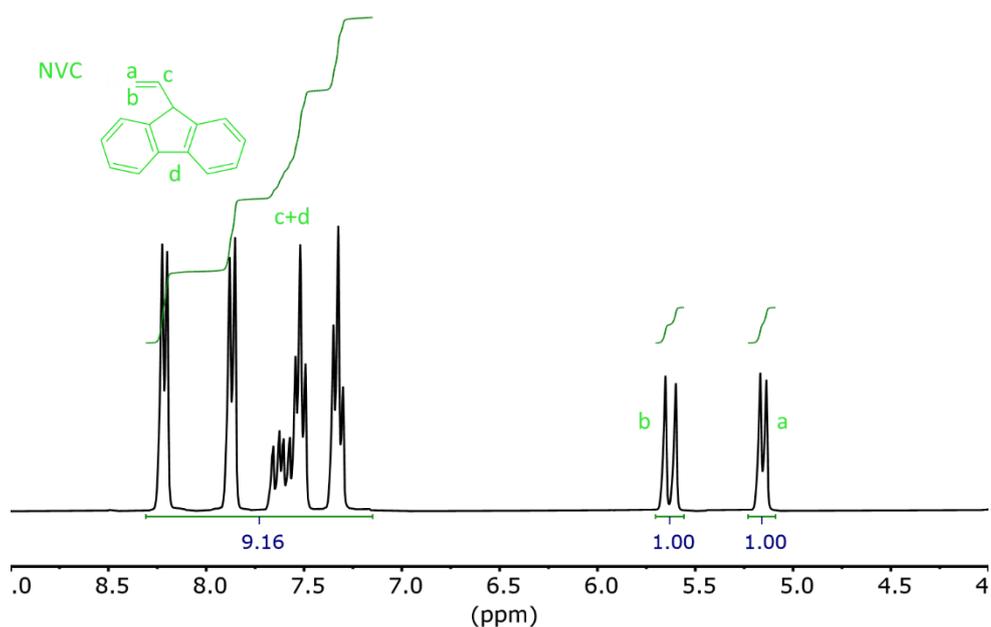
Le principe des mesures de diffusion des rayons X aux petits angles est présenté en Annexe 10.

Annexes de la Partie 1

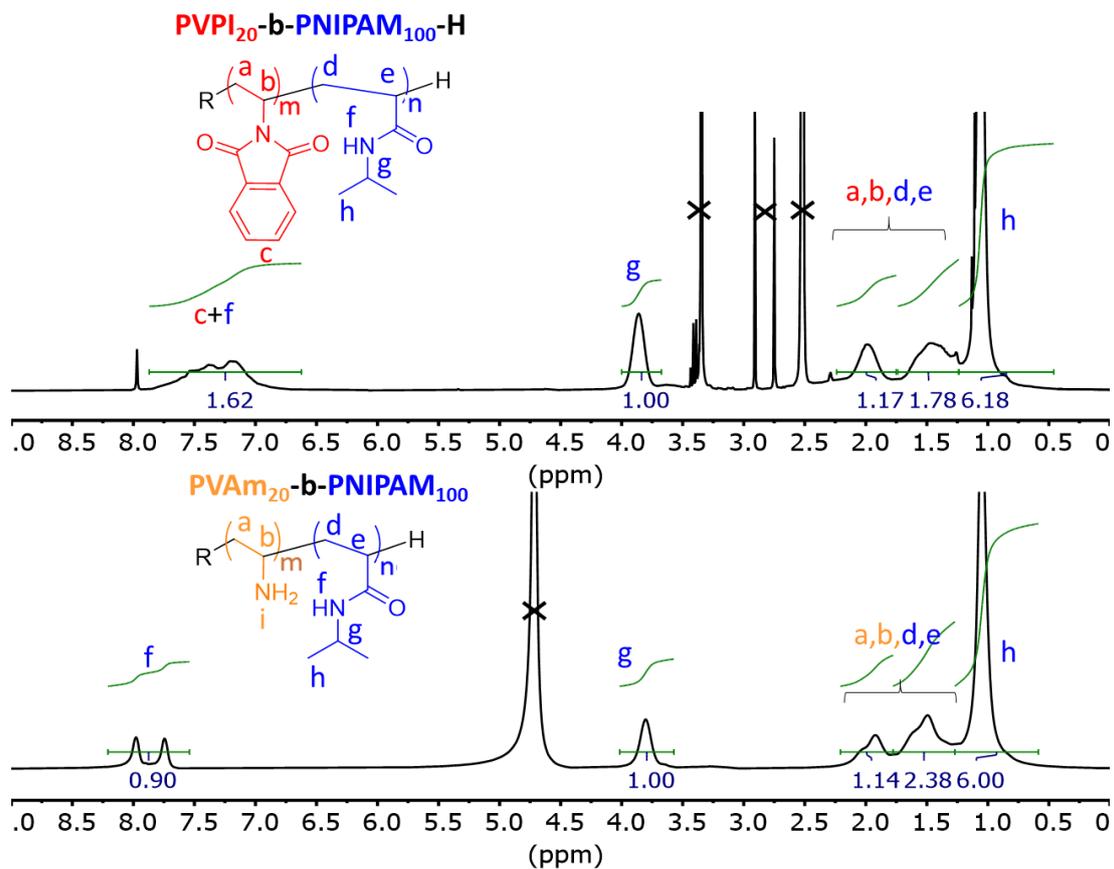
Annexe 1 : RMN ^1H du xanthate XA1 et attribution des protonsAnnexe 2 : Chromatogramme SEC-RI du macro-CTA PVPI₂₀-X

Annexe 3 : Spectre RMN ^1H à 300 MHz dans le DMSO- d_6 des monomères NIPAM, NVPI, NVC et attribution des signaux

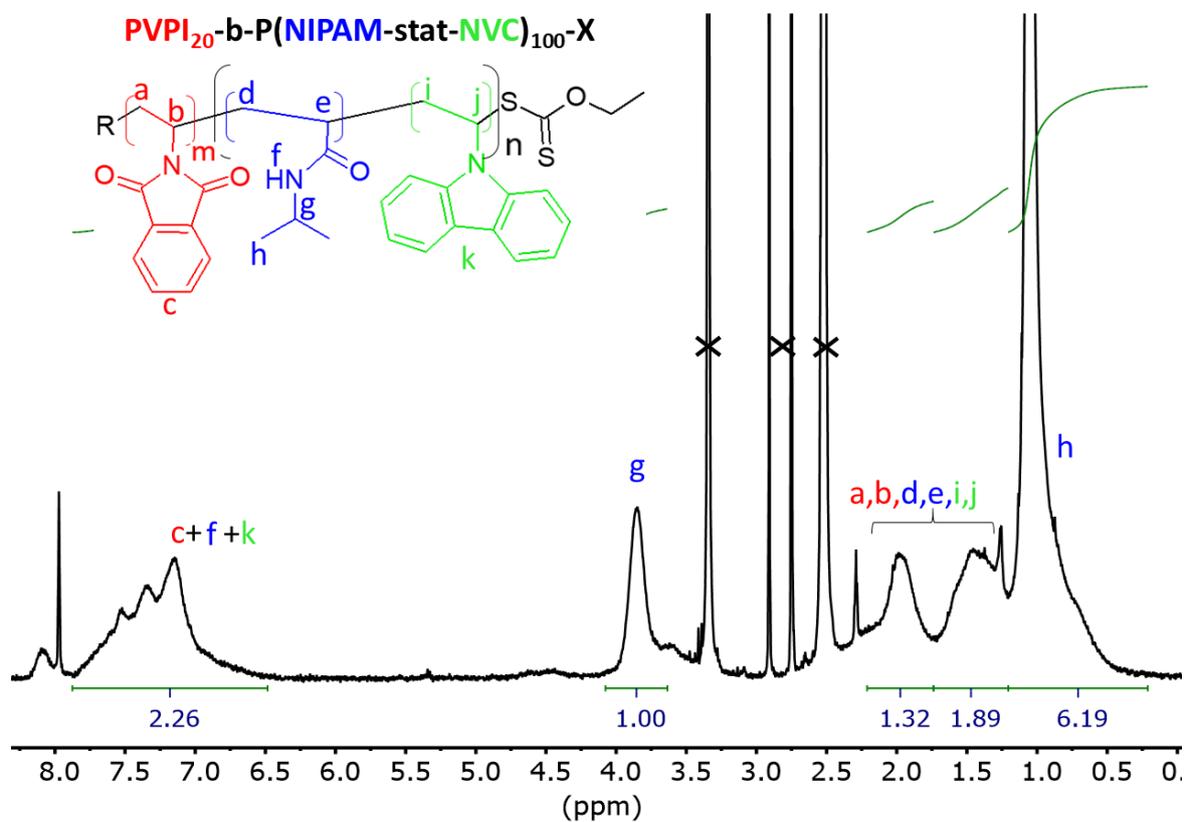




Annexe 4 : Spectre RMN ^1H à 300 MHz du copolymère $\text{PVPI}_{20}\text{-}b\text{-PNIPAM}_{100}\text{-X}$ dans le DMSO-d_6 et du copolymère $\text{PVAm}_{20}\text{-}b\text{-PNIPAM}_{100}$ dans le D_2O



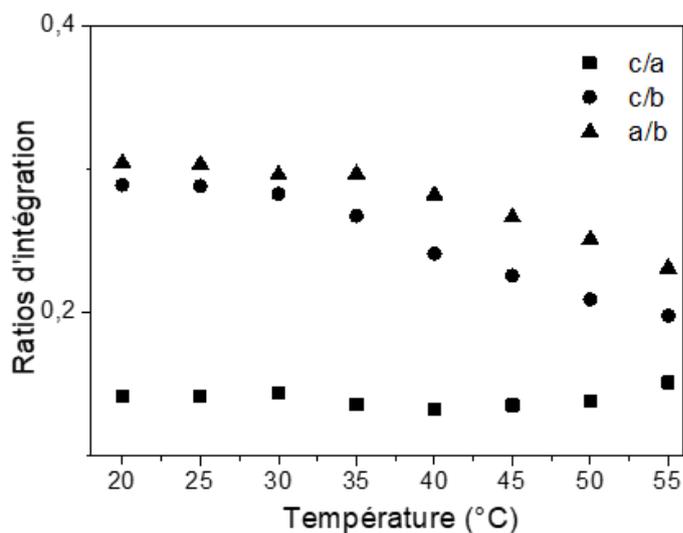
Annexe 5 : Spectres RMN ^1H à 300 MHz dans le DMSO- d_6 du copolymère PVPI $_{20}$ - b -P(NIPAM-*stat*-NVC) $_{100-X}$



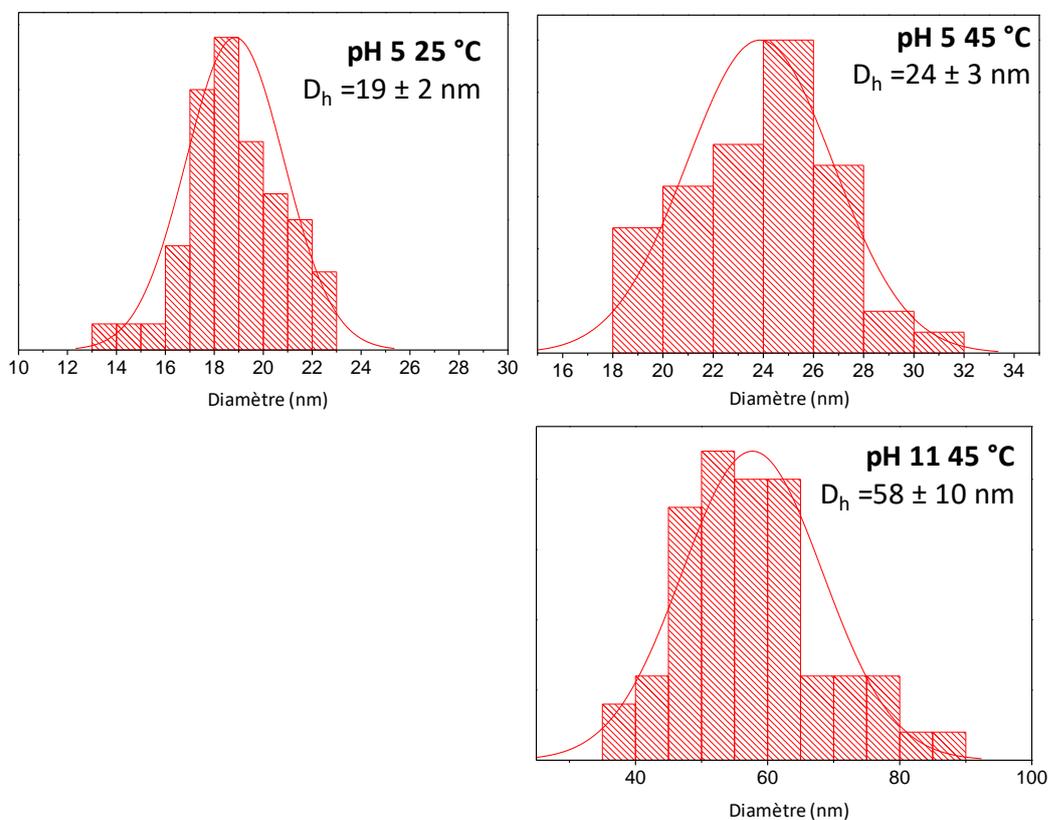
Annexe 6 : Valeurs des T_c déterminées par UV-vis, DLS, DSC et mesures des potentiels- ζ aux 3 pHs d'intérêt pour les copolymères PVAm_m-*b*-PNIPAM_n

	UV (0.1%)			DLS (1%)				DSC (5%)					Zétamétrie (1%)			
	pH	T_c à 0 °C/min (°C)		pH	T_c , DCR (°C)		T_c , Zav (°C)		pH	T_c à 0 °C/min (°C)		dHm (J/g) par unité NIPAM à 0 °C/min		pH	Potentiels- ζ (mV)	
		<i>heating</i>	<i>cooling</i>		<i>heating</i>	<i>cooling</i>	<i>heating</i>	<i>cooling</i>		<i>heating</i>	<i>cooling</i>	<i>heating</i>	<i>cooling</i>		25 °C	45 °C
PVAm ₁₀ -PNIPAM ₅₀	5.7	42,2	39,6	5.6	37,5	36,8	37,0	37,0	1,4	37,7	36,5	-8,14	8,07	5.6	8,9 ± 0,6	27,4 ± 1,5
	7.7	38,0	46,7	8.1	33,8	33,8	35,0	30,0	8,0	38,3	34,1	-10,37	2,22	8.1	-0,97 ± 0,08	4,6 ± 0,5
	11.0	39,8	37,0	12.1	36,0	36,5	37,5	35,0	10,8	36,4	31,6	-2,98	0,13	12.1	-7,4 ± 0,8	-11,9 ± 1,8
PVAm ₂₀ -PNIPAM ₁₀₀	4.6	39,1	40,7	3.7	42,0	32,0	34,7	31,3	1,2	33,6	38,7	-8,24	3,98	3.7	18,4 ± 1,1	34,6 ± 2,1
	7.5	39,9	40,9	7.4	36,0	34,9	34,9	30,3	-	-	-	-	-	7.4	4,2 ± 0,5	20,2 ± 2,0
	9.3	40,1	33,9	11.0	37,3	41,9	35,0	37,2	12,5	35,4	42,1	2,71	2,76	11.0	-4,1 ± 0,4	-2,1 ± 0,4

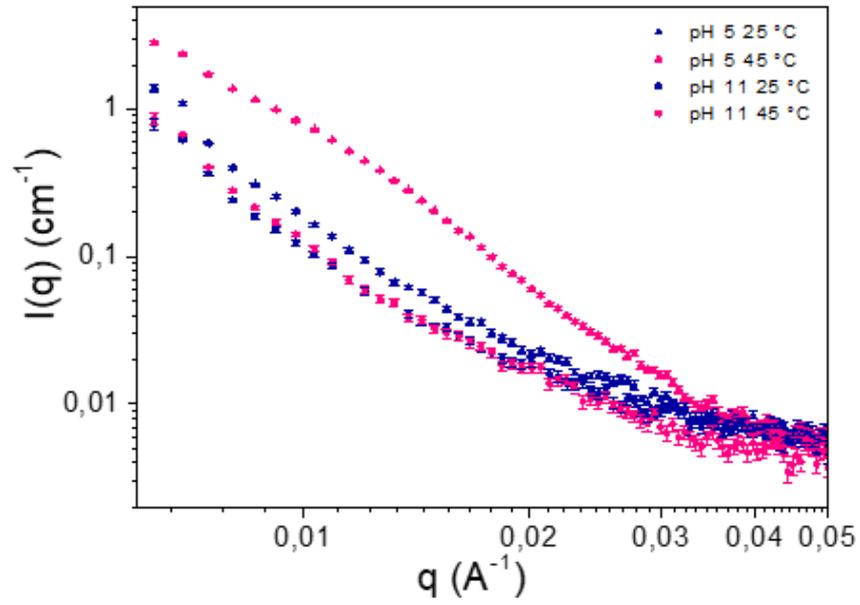
Annexe 7 : Evolution des ratios d'intégration des spectres de RMN ^1H en température acquis à 400 MHz entre 20 °C et 55 °C du copolymère PVAm₂₀-PNIPAM₁₀₀ à pH 11 dans le D₂O en fonction de la température avec : ▲ ratio a/b, ● ratio c/b, ■ ratio c/a



Annexe 8 : Distribution des diamètres mesurés à partir des images MET du copolymère PVAm₁₀-b-PNIPAM₅₀@pH5 et @pH11 à 25 °C et 45 °C



Annexe 9 : Profils SAXS avec $I(q)$ en fonction de q avec $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, sur les échantillons PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ à 1%_m à pH 5 (▲) et à pH 11 (●) à 25 °C (bleu) et 45 °C (rose)



Annexe 10 : Principe des mesures de diffusion des rayonnements pour la caractérisation de polymères

Les techniques de diffusion les plus utilisées pour la caractérisation de polymères en solution sont la diffusion statique et dynamique de la lumière (*static/dynamic light scattering*, SLS/DLS) et la diffusion aux petits angles de neutrons et de rayons X (*Small angle neutron/X-ray scattering*, SANS/SAXS). Le principe général de la diffusion de rayonnements est d'irradier un échantillon de polymère en solution à une longueur d'onde connue et de collecter sur un détecteur l'intensité diffusée par les objets en solution. Les techniques de DLS et SAXS qui ont été utilisées dans ces travaux seront présentées de manière plus détaillée ici.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La mesure de DLS est basée sur l'évaluation du mouvement Brownien des particules en solution. Le mouvement Brownien est défini comme le mouvement des particules qui est dû à l'agitation thermique et les collisions aléatoires qui en découlent entre les particules et les molécules du liquide dans lesquelles elles sont dispersées. En fonction de leur taille, les particules ne sont pas soumises au même mouvement (Figure 1a), ainsi l'intensité de la lumière diffusée ne fluctue pas de la même manière. Plus les particules sont grosses, plus leur mouvement Brownien est lent et plus les fluctuations d'intensités sont faibles, et inversement pour les petites particules. Ces variations d'intensités sont corrélées à un temps caractéristique de relaxation, inversement proportionnel au coefficient de diffusion des particules: $\frac{1}{\tau} = 2Dq^2$ avec τ le temps de relaxation (s^{-1}), q le vecteur d'onde (m^{-1}) et D le coefficient de diffusion (m^2/s). Par la relation de Stokes-Einstein, et en faisant l'hypothèse de particules sphériques rigides, on obtient le diamètre hydrodynamique: $D_h = \frac{KT}{3\pi\eta D}$ avec D_h le diamètre hydrodynamique (m), K la constante de Boltzmann (J/K), T la température (K), et η la viscosité du solvant (kg/m.s)

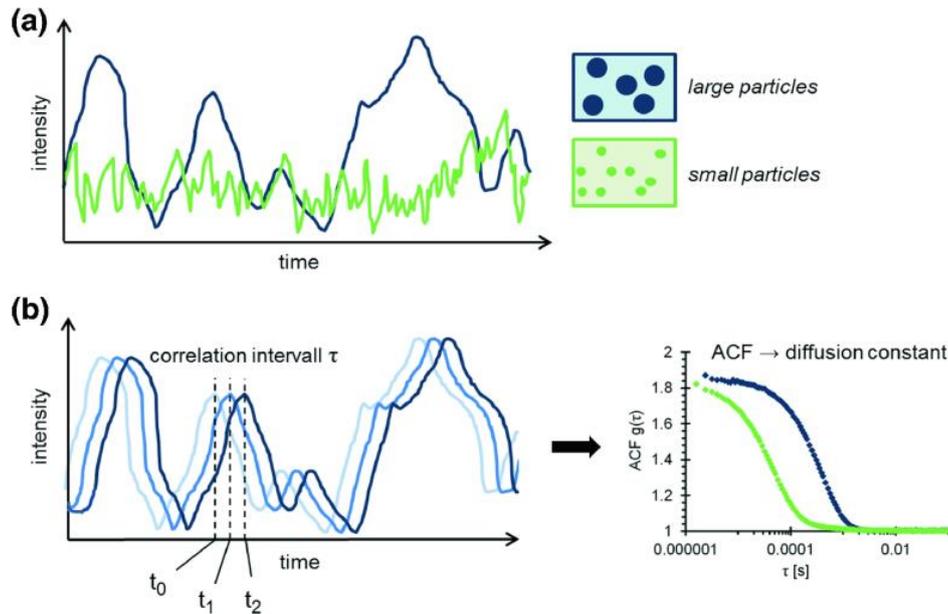


Figure 1 a) Fluctuation de l'intensité diffusée en fonction de la taille des particules, b) transformation des signaux d'intensité par autocorrélation afin d'obtenir la fonction d'autocorrélation

La dimension temporelle est importante en DLS puisque les particules sont en mouvement constant. La fluctuation d'intensité diffusée est analysée par un traitement mathématique appelé autocorrélation et qui donne une fonction d'autocorrélation (Auto-Correlation Function, ACF) (Figure 1b). La fonction d'autocorrélation est une comparaison dans le temps du signal détecté par rapport à lui-même. A un temps initial t_0 , les particules ont une position donnée, mais leur mouvement permanent fait que leur diffusion est à chaque instant plus différente de l'instant initial. Cela se traduit par une fonction de corrélation qui est toujours décroissante. Plus cette décroissance est rapide dans le temps, plus les particules sont petites (car elles se sont très vite déplacées). Au contraire, si la décroissance arrive après un certain temps de latence, cela traduit de plus gros objets dont le mouvement Brownien est plus lent. Dans le cas d'un échantillon monodisperse, la fonction d'autocorrélation est une fonction exponentielle caractérisée par son unique temps de relaxation. Une analyse cumulative permet alors d'obtenir des informations sur la distribution de taille : le diamètre hydrodynamique moyen (Z-average) et la polydispersité de la distribution (PDI).

A noter qu'en DLS conventionnelle, le signal détecté correspond à l'intensité rétrodiffusée (173°) et un seul angle est analysé : les mesures sont donc dépendantes de ce paramètre qui a une influence sur la taille des objets mesurés. Pour s'affranchir de ce paramètre, la DLS multi-angle consiste à réaliser des mesures de diffusion à différents angles.

Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

Le SAXS consiste à irradier l'échantillon en solution par un faisceau de rayons X de longueur d'onde λ et à collecter le rayonnement diffusé sur une gamme de petits angles. La gamme de taille des objets pouvant être observés s'étend de 1 à 100 nm. En dessous du nanomètre, la WAXS (*Wide-angle X-ray Scattering*) est la technique de choix.

Du fait de la diffusion par les objets en solution, les rayons X sont détectés avec un décalage de phase qui se traduit par des interférences constructives et destructives. Ces interférences permettent d'obtenir un figure de diffusion représentée telle que $I(q) = f(q)$ avec $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$ le vecteur d'onde de diffusion. $I(q)$ est dans l'espace réciproque ; ainsi, aux petits q sont observées les grandes dimensions de l'objet, et inversement aux grands q . De manière générale, $I(q) \propto M C (\rho_1 - \rho_2)^2 F(q)^2 S(q)$ avec M la masse moléculaire, C la concentration, ρ la densité de diffusion des particules 1 et du solvant 2, $F(q)$ le facteur de forme, $S(q)$ le facteur de structure. Un profil de diffusion pour des particules sphériques est représenté en Figure 2 :

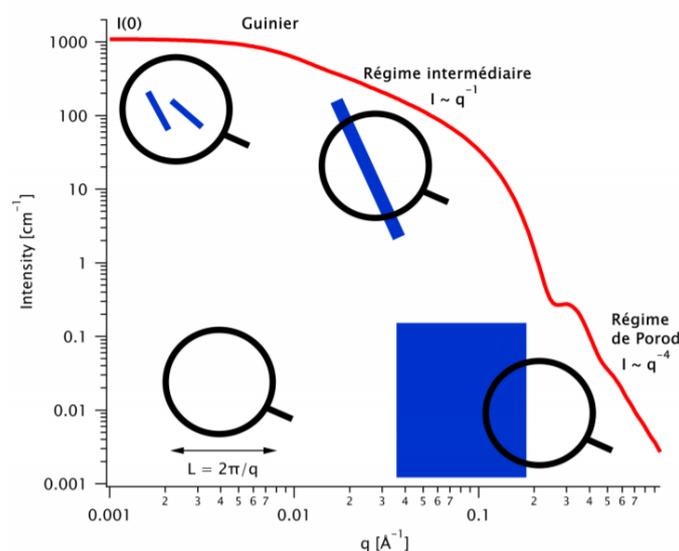


Figure 2 : Profil de diffusion $I(q) = f(q)$ pour des particules sphériques. Reproduit du cours sur la diffusion aux petits angles de D. Constantin (2018) accessible en ligne.

Plusieurs régions sont particulièrement intéressantes et donnent des informations sur le système. Dans la région de Guinier, lorsque q tend vers 0, les valeurs de rayons de giration peuvent être déterminées.

Dans le régime intermédiaire et la région de Porod, $I(q)$ suit une loi de puissance $I(q) \propto q^{-\alpha}$ où α est un paramètre donnant des informations sur la morphologie des objets. En effet, pour $\alpha=2$, les macromolécules sont en conformation gaussienne, alors que pour $\alpha > 2$ la conformation est plus compacte. Pour les polymères en conformation globulaire (particules sphériques), α est compris entre 3 et 4.

Dans le cas de particules sphériques, on peut estimer leur diamètre tel que : $D = 2\pi / q$.

Références

1. Tatemoto, M., & Nakagawa, T. (1978). German patent 2,729,671. In Chem. Abstr (Vol. 88, p. 137374)
2. David, G. *et al.* Use of Iodocompounds in Radical Polymerization. *Chem. Rev.* **106**, 3936–3962 (2006).
3. Georges, M. K., Veregin, R. P. N., Kazmaier, P. M. & Hamer, G. K. Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process. *Macromolecules* **26**, 2987–2988 (1993).
4. Wayland, B. B., Poszmik, G., Mukerjee, S. L. & Fryd, M. Living Radical Polymerization of Acrylates by Organocobalt Porphyrin Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7943–7944 (1994).
5. Wang, J.-S. & Matyjaszewski, K. Controlled/"living" radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5614–5615 (1995).
6. Kato, M., Kamigaito, M., Sawamoto, M. & Higashimura, T. Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization. *Macromolecules* **28**, 1721–1723 (1995).
7. Chiefari, J. *et al.* Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules* **31**, 5559–5562 (1998).
8. Charlot, D. *et al.* Controlled radical polymerization in dispersed media. *Macromol. Symp.* **150**, 23–32 (2000).
9. Hill, M. R., Carmean, R. N. & Sumerlin, B. S. Expanding the Scope of RAFT Polymerization: Recent Advances and New Horizons. *Macromolecules* **48**, 5459–5469 (2015).
10. McKenzie, T. G., Costa, L. P. da M., Fu, Q., Dunstan, D. E. & Qiao, G. G. Investigation into the photolytic stability of RAFT agents and the implications for photopolymerization reactions. *Polym. Chem.* **7**, 4246–4253 (2016).
11. Cabannes-Boué, B., Yang, Q., Lalevée, J., Morlet-Savary, F. & Poly, J. Investigation into the mechanism of photo-mediated RAFT polymerization involving the reversible photolysis of the chain-transfer agent. *Polym. Chem.* **8**, 1760–1770 (2017).
12. Li, S., Han, G. & Zhang, W. Photoregulated reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. *Polym. Chem.* **11**, 1830–1844 (2020).
13. Nakabayashi, K. & Mori, H. Recent progress in controlled radical polymerization of N-vinyl monomers. *Eur. Polym. J.* **49**, 2808–2838 (2013).
14. Moad, G. & Barner-Kowollik, C. The Mechanism and Kinetics of the RAFT Process: Overview, Rates, Stabilities, Side Reactions, Product Spectrum and Outstanding Challenges. in *Handbook of RAFT Polymerization* 51–104 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
15. Pound, G. *et al.* Unexpected reactions associated with the xanthate-mediated polymerization of N-vinylpyrrolidone. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **46**, 6575–6593 (2008).
16. Chong,) Y. K., Le, T. P. T., Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S. H. A More Versatile Route to Block Copolymers and Other Polymers of Complex Architecture by Living Radical Polymerization: The RAFT Process. *Macromolecules* **32**, 2071–2074 (1999).
17. Rizzardo, E., Chiefari, J., Mayadunne, R., Moad, G. & Thang, S. Tailored polymer architectures by reversible addition-fragmentation chain transfer. *Macromol. Symp.* **174**, 209–212 (2001).
18. Stenzel, M. H. Complex Architecture Design via the RAFT Process: Scope, Strengths and Limitations. in *Handbook of RAFT Polymerization* 315–372 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
19. Chong,) Y. K. *et al.* Thiocarbonylthio Compounds [SC(Ph)S–R] in Free Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization). Role of the Free-Radical Leaving Group (R). *Macromolecules* **36**, 2256–2272 (2003).
20. Novak, B. M. & Cafmeyer, J. T. Meta-Stable Enamines: Synthesis of Simple Enamines via Catalytic Isomerization of Allylic Amine Substrates and Their Polymerization Behavior. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11083–11084 (2001).
21. Pelton, R. Polyvinylamine: A Tool for Engineering Interfaces. *Langmuir* **30**, 15373–15382 (2014).
22. Dréan, M., Guégan, P., Jérôme, C., Rieger, J. & Debuigne, A. Far beyond primary poly(vinylamine)s through free radical copolymerization and amide hydrolysis. *Polym. Chem.* **7**, 69–78 (2016).

23. Dréan, M. *et al.* Use of Primary and Secondary Polyvinylamines for Efficient Gene Transfection. *Biomacromolecules* **18**, 440–451 (2017).
24. Maki, Y., Mori, H. & Endo, T. Controlled RAFT Polymerization of N-Vinylphthalimide and its Hydrazinolysis to Poly(vinyl amine). *Macromol. Chem. Phys.* **208**, 2589–2599 (2007).
25. Maki, Y., Mori, H. & Endo, T. Controlled Synthesis of Alternating Copolymers by RAFT Copolymerization of N-Vinylphthalimide with N-Isopropylacrylamide. *Macromol. Chem. Phys.* **211**, 1137–1147 (2010).
26. Maki, Y., Mori, H. & Endo, T. Synthesis of Amphiphilic and Double-Hydrophilic Block Copolymers Containing Poly(vinyl amine) Segments by RAFT Polymerization of N-Vinylphthalimide. *Macromol. Chem. Phys.* **211**, 45–56 (2010).
27. Dréan, M., Guégan, P., Jérôme, C., Rieger, J. & Debuigne, A. Far beyond primary poly(vinylamine)s through free radical copolymerization and amide hydrolysis. *Polym. Chem.* **7**, 69–78 (2015).
28. Nakabayashi, K., Noda, D., Takahashi, T. & Mori, H. Design of stimuli-responsive nanoparticles with optoelectronic cores by post-assembly cross-linking and self-assembly of functionalized block copolymers. *Polymer* **86**, 56–68 (2016).
29. Kanto, R. *et al.* Mixed Polyplex Micelles with Thermoresponsive and Lysine-Based Zwitterionic Shells Derived from Two Poly(vinyl amine)-Based Block Copolymers. *Langmuir* **37**, 3001–3014 (2021).
30. Liu, J. *et al.* Gold nanorods coated with a thermo-responsive poly(ethylene glycol)-b-poly(N-vinylcaprolactam) corona as drug delivery systems for remotely near infrared-triggered release. *Polym. Chem.* **5**, 799–813 (2013).
31. Etchenausia, L., Khoukh, A., Lejeune, E. D. & Save, M. RAFT/MADIX emulsion copolymerization of vinyl acetate and N -vinylcaprolactam: towards waterborne physically crosslinked thermoresponsive particles. *Polym. Chem.* **8**, 2244–2256 (2017).
32. Wan, D., Zhou, Q., Pu, H. & Yang, G. Controlled radical polymerization of N-vinylcaprolactam mediated by xanthate or dithiocarbamate. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **46**, 3756–3765 (2008).
33. Liang, X. *et al.* Synthesis and self-assembly of thermosensitive double-hydrophilic poly(N-vinylcaprolactam)-b-poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) diblock copolymers. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **52**, 2725–2737 (2014).
34. Hou, L. & Wu, P. LCST transition of PNIPAM- b -PVCL in water: cooperative aggregation of two distinct thermally responsive segments. *Soft Matter* **10**, 3578–3586 (2014).
35. Wang, Z., Lai, H. & Wu, P. Influence of PIL segment on solution properties of poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(ionic liquid) copolymer: micelles, thermal phase behavior and microdynamics. *Soft Matter* **8**, 11644–11653 (2012).
36. Suchao-in, N., Chirachanchai, S. & Perrier, S. pH- and thermo-multi-responsive fluorescent micelles from block copolymers via reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. *Polymer* **50**, 4151–4158 (2009).
37. Findenegg, G. H. J. N. Israelachvili: Intermolecular and Surface Forces (With Applications to Colloidal and Biological Systems). Academic Press, London, Orlando, San Diego, New York, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo 1985. 296 Seiten, Preis: \$ 65.00. *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.* **90**, 1241–1242 (1986).
38. Blanazs, A., Armes, S. P. & Ryan, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological Applications. *Macromol. Rapid Commun.* **30**, 267–277 (2009).
39. Li, C. *et al.* Self-assembly of block copolymers towards mesoporous materials for energy storage and conversion systems. *Chem. Soc. Rev.* **49**, 4681–4736 (2020).
40. Gohy, J.-F. Stimuli-Responsive Block Copolymer Assemblies. in *Block Copolymers in Nanoscience* 91–116 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
41. Wei, M., Gao, Y., Li, X. & Serpe, M. J. Stimuli-responsive polymers and their applications. *Polym. Chem.* **8**, 127–143 (2016).
42. Khimani, M., Patel, H., Patel, V., Parekh, P. & Vekariya, R. L. Self-assembly of stimuli-responsive block copolymers in aqueous solutions: an overview. *Polym. Bull.* (2019) doi:10.1007/s00289-019-03046-w.

43. Constantinou, A. P. & Georgiou, T. K. Thermoresponsive Multiblock Copolymers: Chemistry, Properties and Applications. in *Temperature-Responsive Polymers* 35–65 (John Wiley & Sons, Ltd, 2018).
44. Bordat, A., Boissenot, T., Nicolas, J. & Tsapis, N. Thermoresponsive polymer nanocarriers for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **138**, 167–192 (2019).
45. El Jundi, A., Buwalda, S. J., Bakkour, Y., Garric, X. & Nottelet, B. Double hydrophilic block copolymers self-assemblies in biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **283**, 102213 (2020).
46. Gibson, M. I. & O'Reilly, R. K. To aggregate, or not to aggregate? considerations in the design and application of polymeric thermally-responsive nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7204–7213 (2013).
47. Hoogenboom, R. Chapter 2 - Temperature-Responsive Polymers: Properties, Synthesis, and Applications. in *Smart Polymers and their Applications (Second Edition)* (eds. Aguilar, M. R. & San Román, J.) 13–44 (Woodhead Publishing, 2019). doi:10.1016/B978-0-08-102416-4.00002-8.
48. Cortez-Lemus, N. A. & Licea-Claverie, A. Poly(N-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular. *Prog. Polym. Sci.* **53**, 1–51 (2016).
49. Chen, S., Wang, K. & Zhang, W. A new thermoresponsive polymer of poly(N-acryloylsarcosine methyl ester) with a tunable LCST. *Polym. Chem.* **8**, 3090–3101 (2017).
50. Constantinou, A. P. & Georgiou, T. K. Thermoresponsive gels based on ABC triblock copolymers: effect of the length of the PEG side group. *Polym. Chem.* **7**, 2045–2056 (2016).
51. Steinhauer, W., Hoogenboom, R., Keul, H. & Moeller, M. Block and Gradient Copolymers of 2-Hydroxyethyl Acrylate and 2-Methoxyethyl Acrylate via RAFT: Polymerization Kinetics, Thermoresponsive Properties, and Micellization. *Macromolecules* **46**, 1447–1460 (2013).
52. Miasnikova, A. *et al.* Thermoresponsive Hydrogels from Symmetrical Triblock Copolymers Poly(styrene-block-(methoxy diethylene glycol acrylate)-block-styrene). *Langmuir* **28**, 4479–4490 (2012).
53. Xiang, X., Ding, X., Chen, N., Zhang, B. & Heiden, P. A. End group polarity and block symmetry effects on cloud point and hydrodynamic diameter of thermoresponsive block copolymers. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **53**, 2838–2848 (2015).
54. Laschewsky, A., Rekaï, E. D. & Wischerhoff, E. Tailoring of Stimuli-Responsive Water Soluble Acrylamide and Methacrylamide Polymers. *Macromol. Chem. Phys.* **202**, 276–286 (2001).
55. Beija, M., Marty, J.-D. & Destarac, M. Thermoresponsive poly(N-vinyl caprolactam)-coated gold nanoparticles: sharp reversible response and easy tunability. *Chem. Commun.* **47**, 2826–2828 (2011).
56. Halperin, A., Kröger, M. & Winnik, F. M. Poly(N-isopropylacrylamide) Phase Diagrams: Fifty Years of Research. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 15342–15367 (2015).
57. Hales, K. & Pochan, D. J. Using polyelectrolyte block copolymers to tune nanostructure assembly. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 330–336 (2006).
58. Kocak, G., Tuncer, C. & Bütün, V. pH-Responsive polymers. *Polym. Chem.* **8**, 144–176 (2017).
59. Felber, A. E., Dufresne, M.-H. & Leroux, J.-C. pH-sensitive vesicles, polymeric micelles, and nanospheres prepared with polycarboxylates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 979–992 (2012).
60. Gabaston, L. I., Furlong, S. A., Jackson, R. A. & Armes, S. P. Direct synthesis of novel acidic and zwitterionic block copolymers via TEMPO-mediated living free-radical polymerization. *Polymer* **40**, 4505–4514 (1999).
61. Monge, S., Canniccioni, B., David, G. & Robin, J.-J. CHAPTER 1: Polymerization of Phosphorus-Containing (Meth)acrylate Monomers. in *Phosphorus-Based Polymers* 1–18 (2014)
62. Guan, Y. & Zhang, Y. Boronic acid-containing hydrogels: synthesis and their applications. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 8106–8121 (2013).
63. Cotanda, P., Wright, D. B., Tyler, M. & O'Reilly, R. K. A comparative study of the stimuli-responsive properties of DMAEA and DMAEMA containing polymers. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **51**, 3333–3338 (2013).
64. Reyes-Ortega, F. 3 - pH-responsive polymers: properties, synthesis and applications. in *Smart Polymers and their Applications* (eds. Aguilar, M. R. & San Román, J.) 45–92 (Woodhead Publishing, 2014).

65. Zhuang, J., R. Gordon, M., Ventura, J., Li, L. & Thayumanavan, S. Multi-stimuli responsive macromolecules and their assemblies. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7421–7435 (2013).
66. Fu, X., Hosta-Rigau, L., Chandrawati, R. & Cui, J. Multi-Stimuli-Responsive Polymer Particles, Films, and Hydrogels for Drug Delivery. *Chem* **4**, 2084–2107 (2018).
67. Etchenausia, L., Deniau, E., Brûlet, A., Forcada, J. & Save, M. Cationic Thermoresponsive Poly(N-vinylcaprolactam) Microgels Synthesized by Emulsion Polymerization Using a Reactive Cationic Macro-RAFT Agent. *Macromolecules* **51**, 2551–2563 (2018).
68. Giaouzi, D. & Pispas, S. PNIPAM-b-PDMAEA double stimuli responsive copolymers: Effects of composition, end groups and chemical modification on solution self-assembly. *Eur. Polym. J.* **135**, 109867 (2020).
69. Read, E. *et al.* Mechanistic insights into the formation of polyion complex aggregates from cationic thermoresponsive diblock copolymers. *J. Colloid Interface Sci.* **590**, 268–276 (2021).
70. Nakabayashi, K., Noda, D., Watanabe, Y. & Mori, H. Rylene bisimide-based nanoparticles with cross-linked core and thermoresponsive shell using poly(vinyl amine)-based block copolymers. *Polymer* **68**, 17–24 (2015).
71. Taton, D., Destarac, M. & Zard, S. Z. Macromolecular Design by Interchange of Xanthates: Background, Design, Scope and Applications. in *Handbook of RAFT Polymerization* 373–421 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
72. Zhao, X. *et al.* Effect of copolymer composition of RAFT/MADIX-derived N-vinylcaprolactam/N-vinylpyrrolidone statistical copolymers on their thermoresponsive behavior and hydrogel properties. *Polym. Chem.* **6**, 5233–5243 (2015).
73. Yin, F. *et al.* Effect of the microstructure of n-butyl acrylate/N-isopropylacrylamide copolymers on their thermo-responsiveness, self-organization and gel properties in water. *J. Colloid Interface Sci.* **578**, 685–697 (2020).
74. Sistach, S. *et al.* Thermoresponsive Amphiphilic Diblock Copolymers Synthesized by MADIX/RAFT: Properties in Aqueous Solutions and Use for the Preparation and Stabilization of Gold Nanoparticles. *Chem. Mater.* **22**, 3712–3724 (2010).
75. Ilchev, A., Pfkwa, R., Hlalele, L., Smit, M. & Klumperman, B. Improved control through a semi-batch process in RAFT-mediated polymerization utilizing relatively poor leaving groups. *Polym. Chem.* **6**, 7945–7948 (2015).
76. Glaria, A., Beija, M., Bordes, R., Destarac, M. & Marty, J.-D. Understanding the Role of ω -End Groups and Molecular Weight in the Interaction of PNIPAM with Gold Surfaces. *Chem. Mater.* **25**, 1868–1876 (2013).
77. Kobayashi, S., Suh, K. D. & Shirokura, Y. Chelating ability of poly(vinylamine): effects of polyamine structure on chelation. *Macromolecules* **22**, 2363–2366 (1989).
78. Kirwan, L. J., Papastavrou, G., Borkovec, M. & Behrens, S. H. Imaging the Coil-to-Globule Conformational Transition of a Weak Polyelectrolyte by Tuning the Polyelectrolyte Charge Density. *Nano Lett.* **4**, 149–152 (2004).
79. Wang, Y., Chen, X. & Pelton, R. Interactions of Hydrophobically Modified Polyvinylamine with Pluronic Triblock Copolymer Micelles. *Langmuir* **22**, 4952–4958 (2006).
80. Heskins, M. & Guillet, J. E. Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Part - Chem.* **2**, 1441–1455 (1968).
81. Lanzalaco, S. & Armelin, E. Poly(N-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications. *Gels* **3**, 36 (2017).
82. Xiao, Z.-P., Cai, Z.-H., Liang, H. & Lu, J. Amphiphilic block copolymers with aldehyde and ferrocene-functionalized hydrophobic block and their redox-responsive micelles. *J. Mater. Chem.* **20**, 8375–8381 (2010).
83. Henderson, L. J. Concerning the relationship between the strength of acids and their capacity to preserve neutrality. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* **21**, 173–179 (1908).
84. Boutris, C., Chatzi, E. G. & Kiparissides, C. Characterization of the LCST behaviour of aqueous poly(N-isopropylacrylamide) solutions by thermal and cloud point techniques. *Polymer* **38**, 2567–2570 (1997).

85. Tokuhiro, T., Amiya, T., Mamada, A. & Tanaka, T. NMR study of poly(N-isopropylacrylamide) gels near phase transition. *Macromolecules* **24**, 2936–2943 (1991).
86. Burba, C. M., Carter, S. M., Meyer, K. J. & Rice, C. V. Salt Effects on Poly(N-isopropylacrylamide) Phase Transition Thermodynamics from NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **112**, 10399–10404 (2008).
87. Spěváček, J. Application of NMR Spectroscopy to Study Thermoresponsive Polymers. in *Temperature-Responsive Polymers* 225–247 (John Wiley & Sons, Ltd, 2018).
88. Mixed Polyplex Micelles with Thermoresponsive and Lysine-Based Zwitterionic Shells Derived from Two Poly(vinyl amine)-Based Block Copolymers | *Langmuir*.
89. Liu, X. *et al.* Enhanced Solubility of Polyvinyl Esters in scCO₂ by Means of Vinyl Trifluorobutyrate Monomer. *ACS Macro Lett.* **4**, 89–93 (2015).
90. Despax, L., Fitremann, J., Destarac, M. & Harrisson, S. Low concentration thermoresponsive hydrogels from readily accessible triblock copolymers. *Polym. Chem.* **7**, 3375–3377 (2016).

Partie 2

Mise en forme et modification de surface de nanoparticules à base d'hydrogel

Introduction.....	115
1. Généralités sur les polysaccharides	115
2. NPs composites cœur-couronne à base de polysaccharides	119
3. Stratégie de la Partie 2	122
P2 – Chapitre 1: Mise en forme de nanoparticules à base d'hydrogel	125
1. Introduction.....	125
2. Caractérisation des polysaccharides	125
3. Mise en forme des nanoparticules cœur/couronne à base de polysaccharides	131
4. Conclusion	147
P2- Chapitre 2 : Modification de surface des nanoparticules coeur-couronne et mise en évidence des propriétés thermosensibles	149
1. Introduction.....	149
2. Stratégie de modification de surface	150
3. Modification de surface des SiNP@CS/ALG et caractérisation du greffage	159
4. Mise en évidence des propriétés thermosensibles.....	172
5. Conclusion	180
P2- Chapitre 3 : Matériel et méthodes	183
1. Réactifs et matériel	183
2. Caractérisation des polysaccharides	183
3. Mise en forme des nanoparticules SiNP@CS/ALG	185
4. Modification chimique de surface des nanoparticules SiNP@CS/ALG	186
5. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules	187
Annexes de la partie 2	191
Références	201

Partie 2 : Mise en forme et modification de surface de nanoparticules à base d'hydrogel

La Partie 2 de ce manuscrit s'attache à décrire la mise en forme des nanoparticules composées d'une couronne de polysaccharides ainsi que leur modification de surface avec le copolymère thermorépondant. Elle s'organise également en 3 chapitres qui suivent une introduction sur la mise en forme de particules cœur-couronne à base de polysaccharides. Le Chapitre 1 porte sur la mise en forme de particules composées d'une couronne de polysaccharides. Le Chapitre 2 décrit la modification de surface de ces particules avec le copolymère étudié dans la Partie 1 et l'étude des propriétés thermosensibles des biomatériaux ainsi formés. Enfin, le Chapitre 3 contient la partie expérimentale des deux chapitres précédents.

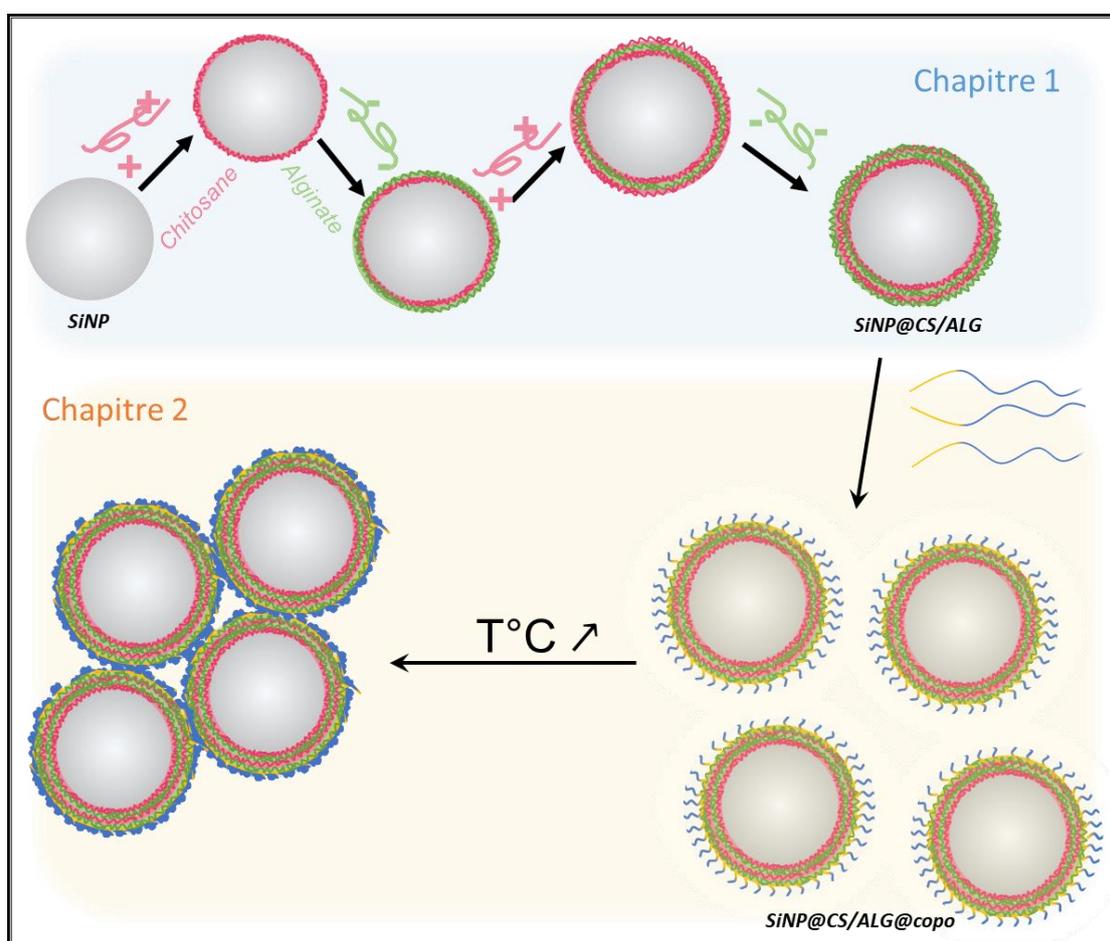


Schéma 1 Résumé graphique de la Partie 2 : Chapitre 1 : mise en forme des nanoparticules SiNP@CS/ALG, Chapitre 2 : modification de surface et étude des propriétés thermosensibles des nanoparticules modifiées

Introduction

La mise en forme de nanoparticules (NPs) pour des applications biomédicales, doit respecter un certain nombre de critères comme la non-toxicité.¹⁻³ Idéalement les NPs doivent également être résistantes aux dégradations chimiques ou enzymatiques non désirées. Enfin, dans le cas d'utilisation en tant que vecteurs d'agents bioactifs, les NPs doivent permettre un temps de vie dans la circulation sanguine important, un chargement en agents thérapeutiques et une libération efficace sur le site ciblé. Pour répondre à ce cahier des charges, l'une des approches possibles est la mise en forme de nanoparticules cœur-couronne. Le choix du matériau utilisé pour la couronne est alors essentiel car celle-ci constitue l'interface avec le milieu physiologique dans lequel évoluent les nanoparticules. Les polysaccharides (pSac) présentent de nombreux atouts pour la fonctionnalisation de surface de NPs, notamment une grande fonctionnalité chimique et dans certains cas des propriétés stimuli-répondantes. La mise en forme de particules uniquement composées de pSac peut cependant être contraignante, et pour des raisons pratiques, dans ce projet nous nous sommes intéressés à des particules modèles, composées d'un cœur de silice et qui seraient recouvertes de pSac.

Cette introduction bibliographique s'attachera à décrire dans un premier temps les polysaccharides de manière générale, puis la mise en forme de NPs cœur-couronne avec une couronne à base de polysaccharides.

1. Généralités sur les polysaccharides

La mise en forme de biomatériaux fonctionnels est un domaine de recherche en constante évolution. De nombreux travaux portent notamment sur les biomatériaux à base de polymères, qu'ils soient naturels ou synthétiques, et sous différentes formes. Les nanoparticules de polymères sont largement étudiées, elles se présentent sous la forme de micelles, de microgels, de liposomes ou encore de dendrimères.⁴ Les polymères synthétiques offrent un contrôle de l'architecture macromoléculaire (structure, composition, masse molaire, etc), des propriétés mécaniques adaptables et une bonne reproductibilité. Les polymères naturels, dont font partie les polysaccharides, ont quant à eux des propriétés très intéressantes pour les applications biomédicales (Figure 1) : ils sont en effet biocompatibles et biodégradables, deux propriétés essentielles en ingénierie tissulaire.⁵⁻⁷

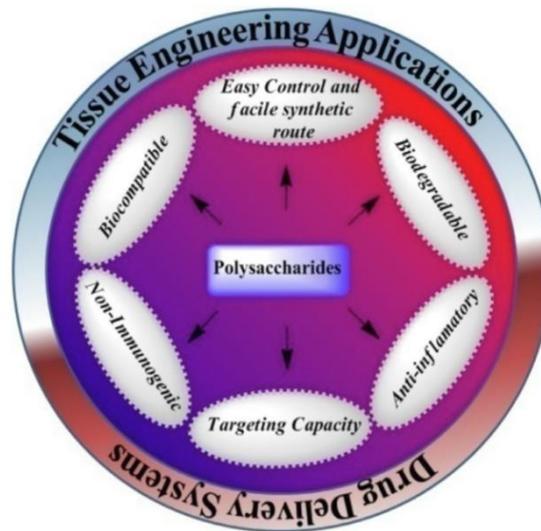


Figure 1 Représentation schématique des propriétés des polysaccharides en médecine régénérative.
Reproduit de Sood et al.⁷

Les polysaccharides sont constitués d'un enchaînement de monosaccharides connectés par des liaisons O-glucosidiques. De nombreux paramètres liés à leur composition, masse molaire, structure ou encore leur origine jouent sur leurs propriétés qui sont donc très variées. Les pSac sont abondamment présents dans la nature, les principales ressources sont les animaux (chitine, héparine, chondroïtine, hyaluronane), les plantes (cellulose, amidon, pectine), les microorganismes (gomme xanthane, dextrane, pullulane) ou encore les algues (alginate, agarose, carraghénane). Une sélection de polysaccharides utilisés dans le domaine des biomatériaux ainsi que leurs caractéristiques en termes de structure, origine, etc, sont listés dans le Tableau 1. Des exemples de mise en forme de NPs sont associés à chaque polysaccharide afin de mettre en avant leur grande polyvalence. Parmi les pSac les plus utilisés dans le domaine des biomatériaux, le chitosane, l'alginate, l'acide hyaluronique et l'héparine sont particulièrement intéressants.

Tableau 1 Structure, origine, caractéristiques et exemples de mise en forme de NPs de polysaccharides

	Structure/Origine	Caractéristiques	Exemples de mise en forme de NPs et applications
Chitosane (CS)	<ul style="list-style-type: none"> • Copolymère linéaire statistique de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine • Issu de la déacétylation de la chitine, ou extrait de certains champignons^{8,9} 	<ul style="list-style-type: none"> • Cationique du fait de ses fonctions amines, soluble uniquement dans l'eau à pH acide • Modification chimique possible par ses fonctions -NH₂, -OH.¹⁰⁻¹² • Propriétés analgésiques, antibactériennes, antifongiques, mucoadhésives^{13,14} 	<ul style="list-style-type: none"> • NPs de CS-tripolyphosphate encapsulant des protéines pour la thérapie du cancer¹⁵ • NPs de CS avec encapsulation de Rampipril pour des applications transdermiques¹⁶ • Nanomicelles de CS-mannose-acide stéarique pour l'immunothérapie¹⁷
Acide hyaluronique (HA)	<ul style="list-style-type: none"> • Copolymère linéaire alterné d'unités d'acide glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine reliées par des liaisons $\beta(1-3)$ • Composant de la matrice extracellulaire chez les animaux 	<ul style="list-style-type: none"> • Anionique car porteur de groupes carboxyliques • Modification chimique possible par amidification de ses fonctions carboxyliques et estérification des hydroxyles^{18,19} • Capacité de gonflement/absorption d'eau, anti-inflammatoire, immunosuppresseur^{20,21} 	<ul style="list-style-type: none"> • Micelles d'HA pour la thérapie photothermique²² • Liposomes à base d'HA pour des applications en oncologie²³ • Micelles d'HA pH-sensibles pour la libération d'actifs anticancéreux²⁴

Héparine (Hep)	<ul style="list-style-type: none"> • Copolymère linéaire composé majoritairement des disaccharides acide iduronique 2-O-sulfaté et glucosamine 6-O-sulfaté N-sulfaté • Produite par les cellules de nombreuses sources terrestres et marines 	<ul style="list-style-type: none"> • Anionique car porteur de groupements sulfates • Modification chimique possible par amidification de ses fonctions carboxyliques et estérification des hydroxyles ²⁵⁻²⁸ • Forte capacité d'interaction avec les protéines et peptides positivement chargés, dont l'antithrombine (anti-coagulant)²⁹ 	<ul style="list-style-type: none"> • Nanogels d'Hep contenant de la Doxorubicin pour le traitement du cancer³⁰ • Nanoéponges d'Hep pour la libération contrôlée de facteurs de croissance ³¹
Alginate (ALG)	<ul style="list-style-type: none"> • Copolymère à bloc linéaire d'acide manuronique (bloc M) et d'acide α-L-guluronique (bloc G) • Issu principalement d'algues brunes ou de souches bactériennes³² 	<ul style="list-style-type: none"> • Anionique car porteur de groupes carboxyliques • Modification chimique possible par amidification de ses fonctions carboxyliques et estérification des hydroxyles³³⁻³⁶ • Capacité de gonflement 	<ul style="list-style-type: none"> • Nanosphères et vésicules d'ALG pour la thérapie du cancer³⁷ • NPs d'ALG pour la délivrance d'actifs³⁸

En complément au Tableau 1, il paraît important de préciser que des nanoparticules composées de plusieurs de ces pSac ont également été formulées mais ne feront pas l'objet de cette étude.³⁹ Les polymères naturels décrits dans le Tableau 1 sont tous des polyélectrolytes car porteurs de fonctions acides carboxyliques, sulfates ou amines. En plus des propriétés intrinsèques, comme le caractère antibactérien des amines, qui sont apportées par ces groupements, ces derniers offrent de nombreuses voies de modifications, qu'elles soient physiques ou chimiques.⁴⁰ Les polysaccharides peuvent être modifiés chimiquement avant leur mise en forme ou être utilisés pour modifier la surface de structures préexistantes. Ce dernier cas de figure nous intéresse particulièrement car permet la mise en forme de structures composites, et dans le cas de nanoparticules, de composites cœur-couronne.

2. NPs composites cœur-couronne à base de pSac

Les nanoparticules composites cœur-couronne sont, comme leur nom l'indique, composées d'un cœur et d'une couronne de nature différente. Dans certaines communautés scientifiques, une distinction est faite entre un système composite et un système hybride,^{41,42} ici nous ne ferons pas cette distinction. Dans cette revue de littérature, nous nous intéresserons aux nanoparticules au sens large, ce qui peut inclure des nanosphères, nanotubes, etc, et dont la couronne est composée de polysaccharides. Ces systèmes seront classifiés en fonction de la structure de la couronne polysaccharidique, mono ou multicouche, et de la nature du cœur qui peut être en polymère (synthétique ou naturel), en métal ou être un matériau inorganique. Les procédés de mise en forme ne seront volontairement pas décrits.

1. *Systèmes composites monocouches*

Tout comme les NPs de polysaccharides, les composites cœur-couronne sont particulièrement développés dans le domaine biomédical, plus spécialement pour des applications en nanomédecine. En effet, de nombreuses thérapies s'appuient sur les propriétés intrinsèques de nanoparticules, par exemple les NPs magnétiques pour l'hyperthermie magnétique, ou encore les NPs métalliques utilisées pour la thérapie photothermique.^{43,44} Une des difficultés souvent rencontrées avec ce type de nanoparticules est leur interaction avec un système biologique, qui révèle parfois une mauvaise biocompatibilité et engendrent des réactions immunitaires et inflammatoires.⁴⁵ Pour s'affranchir de ces inconvénients, une stratégie souvent décrite dans la littérature est de modifier en surface ces cœurs fonctionnels par une couche de polymère.⁴⁶ Les couronnes de polymères naturels comme les polysaccharides sont particulièrement adaptées puisque ces polymères sont biocompatibles et ont souvent eux-mêmes des propriétés intrinsèques intéressantes pour le design d'une biointerface fonctionnelle. Parmi, les systèmes cœur-couronne avec une couronne de pSac, tous les types de cœur ont été décrits dans la littérature.

Concernant les composites polymères/pSac, Liu *et al.*, Lee *et al.*, et Chung *et al.* ont notamment fonctionnalisé des NPs de PLGA par une couronne de HA, CS et d'Hep respectivement.⁴⁷⁻⁴⁹ Les NPs PLGA/HA mises en forme sont composées d'un cœur positivement chargé en surface à base de PLGA et d'un lipide cationique, autour duquel est déposée la couronne du polyanion acide hyaluronique.⁴⁷ Ces NPs d'environ 200 nm de diamètre ont permis d'encapsuler des antigènes et il a été montré que la présence d'HA améliore la charge d'encapsulation, ce qui fait de ces NPs un nanovaccin prometteur. Les cœurs de PLGA recouverts d'une couronne de CS, d'un diamètre d'environ 200 nm également, ont été utilisés pour la délivrance transdermique d'ADN.⁴⁸ Dans ce système, l'intérêt du CS est sa capacité d'interaction avec l'ADN contrairement au PLGA qui manque de fonctions chimiques disponibles en surface. Un système pSac-pSac a également été décrit pour la délivrance d'actifs anti-tumoraux.⁵⁰ Il s'agit d'un cœur de CS contenant l'actif, encapsulé dans une couronne d'HA dont l'une des fonctions est de prolonger la circulation systémique des particules.

Si les cœurs à base de polymères sont souvent utilisés pour la mise en forme de particules cœur-couronne, c'est également le cas de nombreux métaux et oxydes métalliques. Les plus cités sont certainement les cœurs d'oxydes magnétiques qui sont intéressants pour la libération contrôlée d'actifs par hyperthermie magnétique.^{51,52} Les NPs d'or sont également intéressantes pour l'imagerie ou la thérapie photothermique,⁵³ des systèmes Au-CS,⁵⁴ Au-ALG,⁵⁵ Au-HA⁵⁶ ont notamment été rapportés.

Enfin, les cœurs inorganiques sont également des candidats de choix pour une modification de surface avec des pSac comme le prouvent les nombreux travaux à ce sujet. Naz *et al.* et Hu *et al.* décrivent notamment des nanoparticules de silice (SiNPs) mésoporeuses avec un revêtement d'acide hyaluronique.^{57,58} Les travaux des premiers consistent en l'adsorption d'HA à la surface de SiNP-NH₂ mésoporeuses chargées en actifs et fonctionnalisées par un ligand capable de cibler les mitochondries.⁵⁷ Le rôle double de l'HA est alors de fermer les pores de la silice (*gatekeeper*), retenir les actifs au cours du transport et de cibler les cellules cancéreuses. Hu *et al.* utilisent des SiNP chargées en anti-tumoraux enrobées d'acide hyaluronique pour la capacité de l'HA à cibler les cellules cancéreuses également.⁵⁸

Les polyanions héparine et ALG ont également été utilisés comme couronne d'hydrogel autour de cœurs de silice. Dans le cas des particules SiNP-Hep, l'héparine permet encore une fois l'encapsulation des actifs incorporés dans la porosité des SiNPs, et apporte ses propriétés de biocompatibilité et d'amélioration de la circulation.⁵⁹ De même, l'ALG enrobant les particules SiNP-ALG des travaux de Yuan *et al.* joue le rôle de *gatekeeper*,⁶⁰ tout comme le CS dans les particules composites SiNP-CS servant à la thérapie ciblée du cancer colorectal.⁶¹

D'autres exemples de cœurs inorganiques peuvent être cités, comme les travaux de Liang *et al.* qui mettent en forme des cœurs d'hydroxyapatite recouverts d'une couronne d'ALG pour la délivrance d'actifs encapsulés dans l'hydroxyapatite.⁶²

De manière générale, dans ces systèmes monocouches, le pSac a soit le rôle de *gatekeeper* lorsqu'un actif est encapsulé dans le cœur, soit un rôle de biocompatibilisant ou d'adjuvant à la circulation systémique des particules.

2. Systèmes composites multicouches

La littérature décrit également un certain nombre de systèmes multicouches, c'est à dire composés d'un assemblage de plusieurs couches de pSac. Les pSac ciblés dans cette revue étant tous des polyélectrolytes, les assemblages décrits dans cette partie sont tous formés par *layer-by-layer* (LbL). L'assemblage LbL développé par Decher *et al.* dans les années 1990, consiste en la formation d'un revêtement multicouche de polyélectrolytes.⁶³ En pratique, un substrat est introduit successivement dans des solutions de polyélectrolytes de charges opposées (polyanion et polycation) de manière à ce que le polymère de charge opposée à la surface soit adsorbé. La charge de surface s'inverse donc entre chaque étape. L'adsorption est régulée par la répulsion électrostatique entre le polymère nouvellement adsorbé et celui en excès dans la solution.

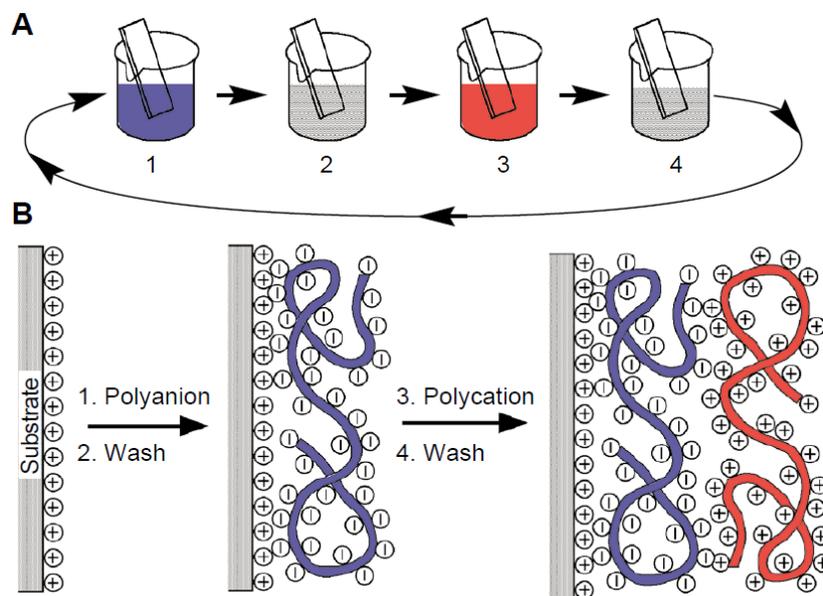


Figure 2 Principe de l'assemblage layer-by-layer, A) représentation du procédé, les étapes 2 et 4 correspondant à des lavages pour éliminer le polymère en excès. B) représentation schématique de l'adsorption successive d'un polyanion et d'un polycation sur une surface cationique.

Reproduit de Decher *et al.*⁶³

Bien qu'initialement cet assemblage repose sur des interactions électrostatiques, des exemples décrivent la formation de films LbL par des liaisons hydrogènes,⁶⁴ liaisons covalentes,⁶⁵ ou encore des interactions hydrophobes.⁶⁶ De même, le procédé LbL a été développé sur des substrats plans et réalisé par la suite sur des objets tridimensionnels comme des nanoparticules.⁶⁷⁻⁷⁰

Les assemblages LbL ont montré un potentiel certain dans le domaine biomédical. Parmi les polymères les plus utilisés, on retrouve les polyélectrolytes synthétiques comme les polycations poly(chlorure de diallyldiméthylammonium), poly(hydrochlorure d'allylamine), ou polyéthylèneimine et les polyanions poly(styrène sulfonate), poly(vinyl sulfate), ou l'acide polyacrylique.⁷¹ Concernant les polyélectrolytes naturels, sont utilisées notamment des biomacromolécules comme des protéines,^{72,73} des polypeptides,⁷⁴ ou encore l'ADN.⁷⁵ Les pSac comme le CS (polycation) et l'ALG (polyanion) ont également été utilisés pour recouvrir différents cœurs de natures chimiques variées.⁷⁶⁻⁷⁸ Un assemblage LbL d'ALG et de CS a été réalisé autour de nanoparticules de ferrite de manganèse ($MnFe_2O_4$).⁷⁹ Deux bicouches successives ont été déposées ce qui a permis d'obtenir des particules de 200 nm. L'intérêt de ce système multicouche est l'incorporation dans les couches de CS de curcumine, un actif ayant des interactions spécifiques avec le CS.

De même, un assemblage multicouche de CS et d'ALG a permis d'enrober des cœurs de PLGA chargés en actif anti-tumoral.⁸⁰ Quatre bicouches sont déposées successivement, une étude de la libération en fonction du nombre de couches a permis de montrer que la libération brutale (*burst release*) initiale d'actifs diminue avec l'épaisseur de la couronne. Ce résultat est particulièrement intéressant pour les applications où l'effet de *burst release* est problématique en terme de toxicité et d'efficacité.

Sur ce même principe, plusieurs travaux rapportent la modification de surface par LbL de particules silice avec de l'ALG et du CS. Feng *et al.* décrit des silices mésoporeuses chargées en Doxorubicin et enrobées de ces polysaccharides dont le rôle est d'agir en tant que *gatekeepers* pH-sensibles.⁷⁷ Yang *et al.* ont réalisé ce même assemblage CS et ALG sur des nanotubes de silice pour des applications de libération contrôlée en fonction du pH également.⁷⁶ C'est sur ces derniers travaux que s'est appuyée la stratégie de mise en forme des nanoparticules utilisées dans cette partie.

3. Stratégie de la Partie 2

La revue bibliographique a permis d'illustrer la mise en forme de nanoparticules cœur-couronne à base de polysaccharides. Dans notre stratégie, la formulation de nanoparticules cœur-couronne avec une couronne à base d'hydrogel de pSac repose sur le revêtement d'un cœur inorganique par *layer-by-layer* (LbL). Dans un premier temps, les cœurs de silice SiNP seront synthétisés par polymérisation inorganique Stöber et caractérisés, avant d'être enrobés d'un assemblage multicouche à base de deux polyélectrolytes naturels de charges opposées, le CS et l'ALG, pour obtenir les particules SiNP@CS/ALG. La construction de cet assemblage sera caractérisé étape par étape.

Dans un deuxième temps, la modification de surface des particules cœur-couronne sera étudiée : il s'agit du greffage de brosses de copolymères thermorépondants à la surface des particules cœur-couronne par *grafting to*. Le copolymère thermorépondant PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ a été synthétisé et caractérisé dans la première partie de ce manuscrit. Son bloc polyaminé sera utilisé comme point d'ancrage à la surface des particules composites dont la surface est recouverte d'ALG. Le bloc thermorépondant sera exposé à l'interface.

L'objectif final de cette partie est d'étudier comment les propriétés thermorépondantes du copolymère influent sur les propriétés des particules. Est-ce que la surface des particules deviendra hydrophobe lorsque la température sera supérieure à la température critique du copolymère ? Est-ce que des interactions hydrophobes inter-particulaires seront observées ? Quelles sont les conséquences de telles interactions sur le système, va-t-il gélifier, se déstabiliser ?

La Partie 2 s'attache donc à répondre à ces interrogations. Le Chapitre 1 décrit la mise en forme des nanoparticules SiNP@CS/ALG ainsi que leur caractérisation. Le Chapitre 2 est consacré à la modification de surface par *grafting to* des particules SiNP@CS/ALG pour obtenir les particules thermosensibles (Schéma 1). L'accent est porté sur la mise en évidence du copolymère à la surface des particules par une étude utilisant différentes techniques de caractérisation, dont l'XPS, la RMN et la spectrofluorimétrie. Enfin, la thermosensibilité des particules modifiées sera investiguée afin de répondre à la problématique de ce travail : **Est-ce que la modification de surface de nanoparticules à base de polysaccharides par un copolymère thermorépondant induit chez les particules une thermosensibilité ?**

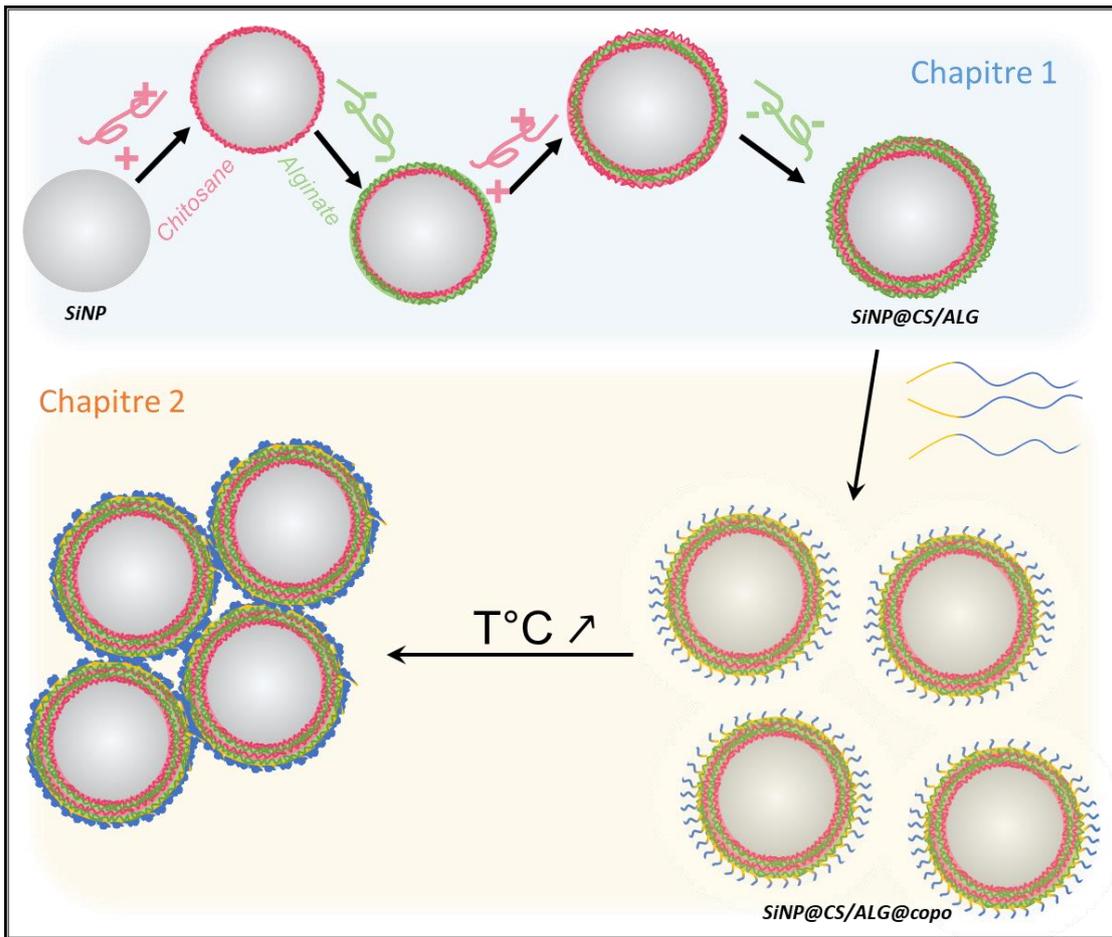


Schéma 2 Résumé graphique de la Partie 2 : Chapitre 1 : mise en forme des nanoparticules SiNP@CS/ALG, Chapitre 2 : modification de surface et étude des propriétés thermosensibles des nanoparticules modifiées

P2 – Chapitre 1: Mise en forme de nanoparticules à base d'hydrogel

1. Introduction

La revue bibliographique a permis d'illustrer la mise en forme de nanoparticules constituées d'une couronne de polysaccharides. Dans notre stratégie, la formulation de nanoparticules cœur-couronne repose sur le revêtement d'un cœur inorganique par *layer-by-layer* (LbL) de pSac. Dans un premier temps, les pSac seront caractérisés, puis la mise en forme des particules cœur-couronne sera décrite et discutée.

2. Caractérisation des polysaccharides

1. Chitosane

Le CS est un polymère naturel, issu de la déacétylation de la chitine, elle-même extraite des carapaces de crustacés (crevettes, crabes) ou de champignons. C'est un copolymère linéaire statistique composés d'unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine liées par des liaisons glucosidiques $\beta(1-4)$, sa structure est rappelée en Figure 3.

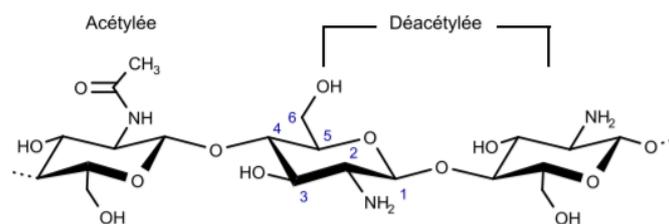


Figure 3 Structure chimique du CS

Selon son origine, la masse molaire du CS peut aller de 50 à 800 kDa. La composition entre les deux unités glucosaminées joue un rôle très important sur les propriétés du CS. Elle est caractérisée par le degré de déacétylation (DDA) qui est défini tel que la fraction des unités déacétylées. Par convention, on ne parle de CS que lorsque le DDA est supérieur à 50 %, en deçà on considère que le polymère est toujours de la chitine. Le DDA est un paramètre de choix en fonction de l'application souhaitée. Les chitosanes dont les DDA sont grands permettent notamment de favoriser la prolifération et l'adhésion cellulaire.⁸¹ La cristallinité du CS joue aussi un rôle sur les propriétés physico-chimiques du polymère, ce paramètre ne fera pas l'objet de ces travaux et n'a pas été déterminé. Indépendamment de sa masse et de son DDA, le CS est biocompatible, non toxique, et biodégradable grâce à ses liaisons $\beta(1-4)$ qui sont hydrolysées par les lysozymes chez les mammifères.^{82,83} La structure du CS comporte des fonctions amines et hydroxyles qui permettent la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires. Les amines primaires du CS sont réactives et ont souvent été le support de modifications chimiques, notamment par le biais de couplage peptidique.^{84,85} Les amines apportent par ailleurs son

caractère pH-sensible au CS puisqu'elles peuvent capter un proton pour former des fonctions ammonium chargées positivement. Le CS est souvent associé au polyanion ALG pour former des complexes polyélectrolytes (PEC).^{86,87} Le pKa du CS est d'environ 6,5, il est intéressant de noter qu'à pH supérieur de pKa, c'est-à-dire que lorsqu'une majorité des amines sont déprotonées, le CS est insoluble dans l'eau.

Dans le cadre de ces travaux, un unique lot commercial de CS a été utilisé, ce CS est dérivé de chitine extraite de carapaces de crevettes. Les polymères naturels présentant d'importantes différences inter-lots, il est nécessaire de les caractériser avant utilisation afin de connaître leur masse molaire et leur DDA. Une technique de choix pour la détermination de la masse molaire du CS est la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en milieu aqueux. Cependant, le CS est difficile à solubiliser dans les tampons usuels de SEC, d'autant plus qu'aux concentrations usuelles d'injection, les solutions de CS sont très visqueuses et donc difficiles à injecter. Des chromatogrammes ont été obtenus sur le lot de CS étudié et ont révélé la présence d'agrégats et par conséquent la masse molaire M_w obtenue n'est pas correcte. Du fait de ces difficultés, qui sont couramment décrites dans la littérature,^{88,89} les polymères naturels sont souvent caractérisés par leur masse molaire viscosimétrique.

Détermination de la masse molaire moyenne viscosimétrique M_v

La détermination de la M_v s'effectue typiquement par viscosimétrie capillaire ou par des mesures rhéologiques, ces dernières étant plus rapides à mettre en œuvre. En effet, la M_v d'un polymère est reliée à sa viscosité intrinsèque par la relation de Mark-Houwink-Sakurada :

$$[\eta] = K \cdot M_v^\alpha$$

Les mesures rhéologiques ont donc pour but de déterminer $[\eta]$, la méthodologie détaillée est décrite dans le Chapitre 3 (page 183). Les paramètres K et α ont des valeurs tabulées pour des couples solvant/polymère à des températures données.

Dans le cas du CS, des solutions dans un milieu aqueux à 0,1 M d'acide acétique et 0,2 M de NaCl ont été préparées à des concentrations de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 %. A ces concentrations, le CS, qui présente généralement un comportement rhéofluidifiant,⁹⁰ a un comportement Newtonien où la viscosité ne dépend pas de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ et où la relation $\mu_{\text{solution}} = \tau / \dot{\gamma}$ s'applique, avec μ_{solution} la viscosité de la solution et τ la contrainte de cisaillement. L'étude rhéologique a été réalisée en rotation avec des cylindres coaxiaux. Pour chacune des solutions, un balayage en taux de cisaillement est réalisé afin de mesurer l'évolution linéaire de la contrainte et d'en déterminer la pente μ_{solution} pour chaque concentration (Figure 4).

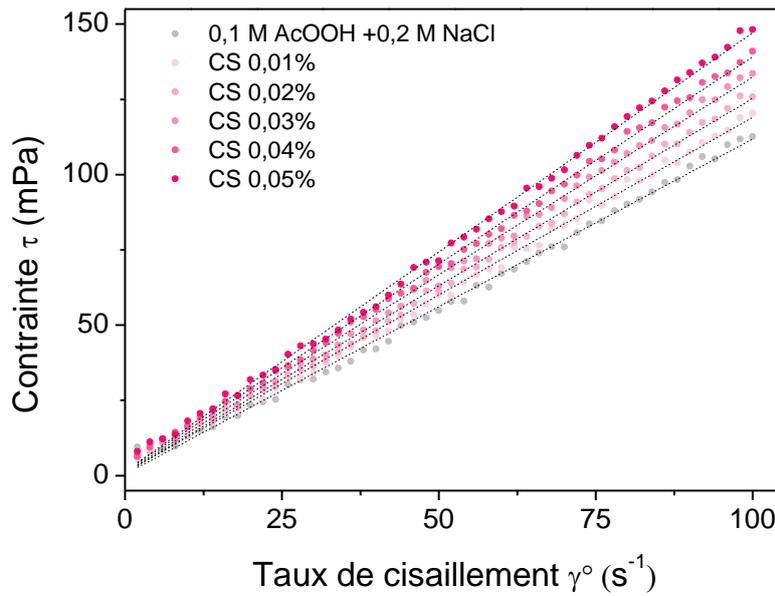


Figure 4 Mesures de contrainte en écoulement (cylindres coaxiaux) à différents taux de cisaillement pour la détermination des viscosités μ_{solution} des solutions de CS de 0,01% à 0,05% et μ_{solvant} de la solution aqueuse NaCl 0.2 M + 0,1 M acide acétique

De même, la viscosité du solvant μ_{solvant} est déterminée, permettant de calculer la viscosité relative. Les viscosités inhérentes et réduites sont calculées d'après les relations explicitées dans le Chapitre 3 (page 183). La viscosité intrinsèque est déterminée par projection, lorsque la concentration tend vers 0, des mesures de viscosités inhérentes et réduites en fonction de la concentration (Figure 5).

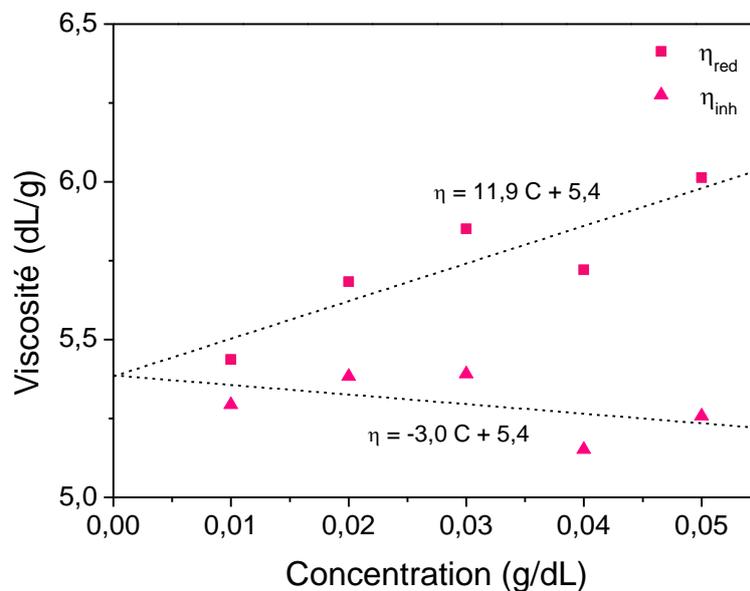


Figure 5 Extrapolation à concentration nulle des viscosités inhérentes (▲) et réduites (■) en fonction de la concentration en CS

Une valeur moyenne de ces deux extrapolations est calculée et vaut 5.38 dL/g. Connaissant $K = 1.81 \cdot 10^{-5}$ mL/g et $\alpha = 0.93$ pour un milieu aqueux à 0.1 M d'acide acétique et 0.1 M NaCl,⁹¹ la M_v calculée du lot de CS étudié est de 770 kDa.

Détermination du degré de déacétylation (DDA)

La détermination du degré de déacétylation du CS peut être réalisée par plusieurs méthodes dont la spectroscopie UV-visible,⁹² l'IRTF^{93,94} ou encore la RMN.^{95,96} La RMN est cependant considérée comme la plus fiable de ces méthodes et donc celle qui a été utilisée ici. En l'occurrence pour la détermination du DDA, il s'agit de spectroscopie ^{13}C en mode quantitatif CP MAS (Figure 6). Le calcul du DDA est simplement basé sur le rapport d'intégration des carbones de l'acétyle par rapport aux carbones du cycle, la formule est la suivante :^{95,96}

$$DDA = 1 - \frac{I_{CH_3}}{(I_{C1} + I_{C2} + I_{C3} + I_{C4} + I_{C5} + I_{C6})/6}$$

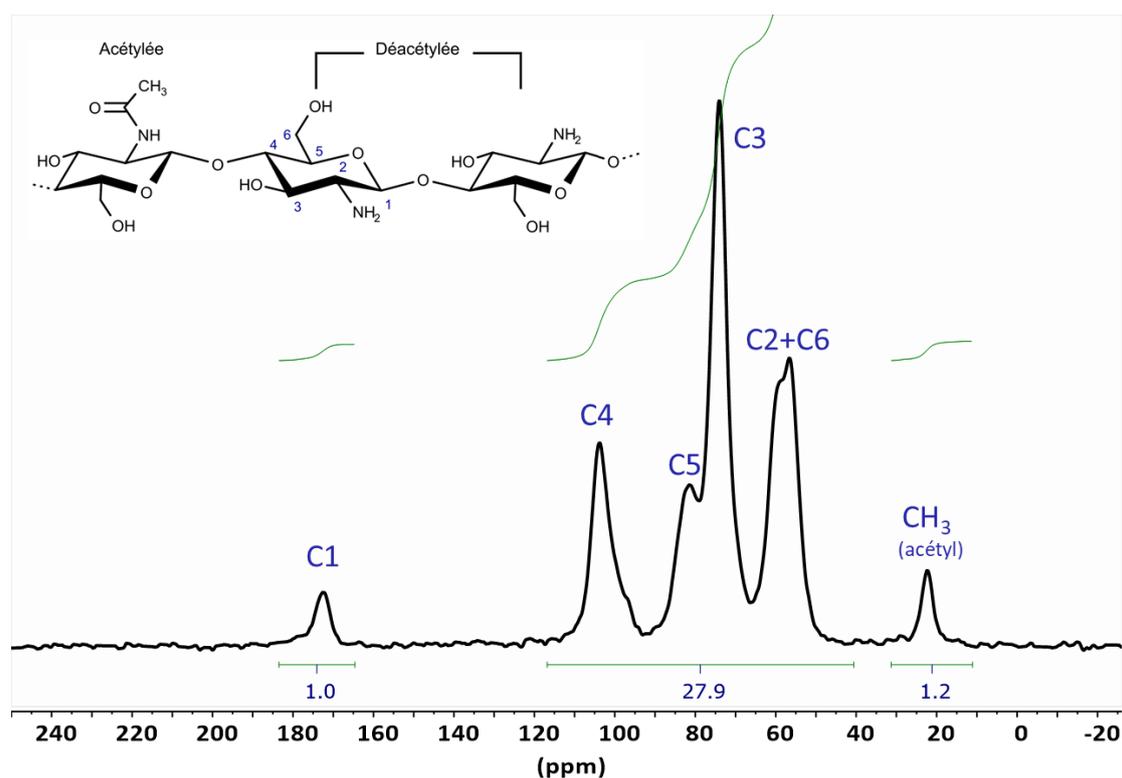


Figure 6 Spectre RMN ^{13}C (CP MAS) du CS avec intégrations et attributions des différents carbones d'après sa structure chimique et les travaux de Heux et al⁹⁵

Le DDA calculé est de 73 %. Bien qu'il soit nécessaire de connaître cette caractéristique du CS puisqu'elle peut avoir une influence sur les propriétés des assemblages LbL faits à partir de CS,⁹⁷ l'influence du DDA n'est pas étudiée dans ce travail car un unique lot de CS a été utilisé. L'étude de Rocha Neto *et al.* montre cependant que l'influence du DDA sur l'épaisseur de film multicouche

assemblé par LbL dépend surtout du pH. A pH 7,2 le DDA impacte forcément l'épaisseur mais à pH 4,5 celle-ci est beaucoup moins influencée par le DDA.

3. Alginate de sodium

L'ALG est un polysaccharide extrait principalement des algues et dont les caractéristiques dépendent, comme pour le CS, de son origine. Les caractéristiques de l'ALG sont principalement sa masse molaire et son rapport M/G. L'ALG est en effet un copolymère linéaire d'unités guluroniques (G) et mannuroniques (M), reliées par des liaisons $\beta(1-4)$ dont la composition et l'enchaînement varient. L'alternance des conformations G et M peut former trois types de blocs : G, M, et MG (Figure 7).³²

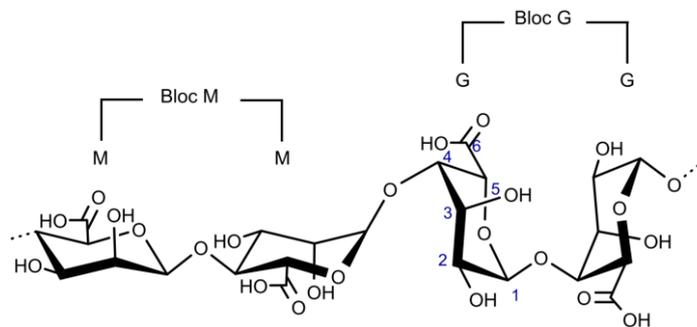


Figure 7 Structure chimique de l'ALG

La composition entre ces blocs a une influence sur les propriétés de l'ALG et sur les propriétés des matériaux mis en forme avec cet ALG. Par exemple, pour la réticulation de l'ALG par des cations Ca^{2+} , il peut être intéressant de privilégier un ALG avec une importante proportion de blocs GG car ceux-ci forment des interactions ioniques fortes.⁹⁸

Commercialement, l'ALG se trouve sous la forme d'ALG de sodium. Il est soluble dans l'eau sous la forme de carboxylate, le pKa de ce polyanion est entre 3,4 et 4,5 selon les caractéristiques du polymère.⁹⁹ Le pKa du lot étudié n'ayant pas été déterminé expérimentalement, une valeur moyenne de 4 sera considérée. Comme pour le CS, les deux caractéristiques principales de l'ALG de sodium utilisé dans cette étude ont été déterminées : la masse molaire moyenne viscosimétrique et le ratio M/G.

Détermination de la masse molaire moyenne viscosimétrique M_v

La M_v du lot d'ALG étudié, qui est issu d'algues brunes, est déterminée selon le même protocole que celle du CS, à la différence que les solutions sont préparées dans un milieu salin à 0,1 M de NaCl. La Figure 8a présente la contrainte mesurée en fonction du taux de cisaillement pour chacune des solutions.

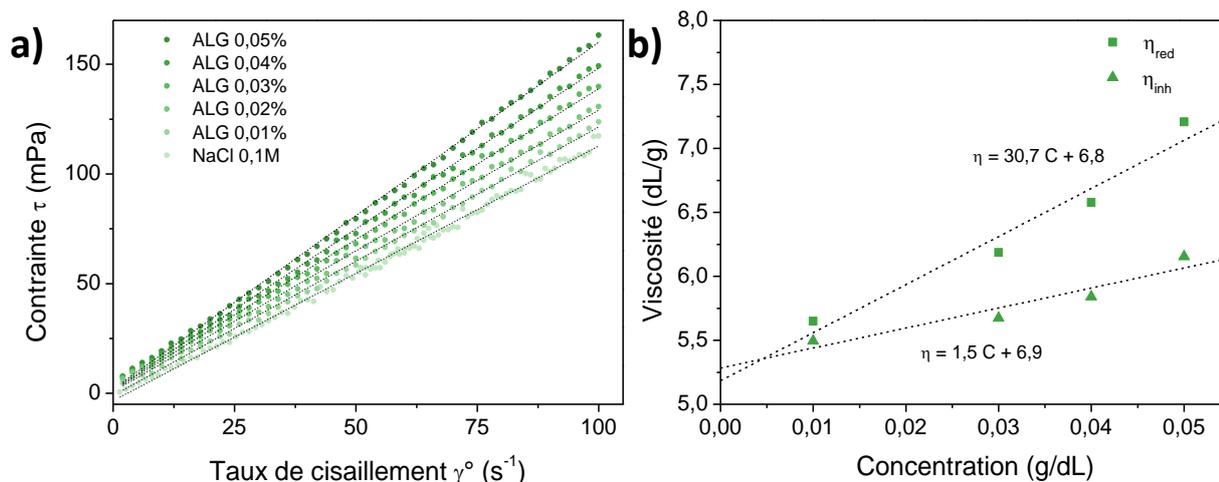


Figure 8 a) Mesures de contrainte en écoulement (cylindres coaxiaux) à différents taux de cisaillement pour la détermination des viscosités μ_{solution} des solutions d'ALG de 0,01% à 0,05% et μ_{solvant} de la solution aqueuse NaCl 0,1 M, b) Extrapolation à concentration nulle des viscosités inhérentes (\blacktriangle) et réduites (\blacksquare) en fonction de la concentration en ALG

Il s'agit à nouveau d'un comportement Newtonien qui s'explique par la faible concentration des solutions puisque l'ALG présente habituellement un comportement rhéofluidifiant.¹⁰⁰ La Figure 8b représente la projection des viscosités inhérentes et réduites à concentration nulle qui permet la détermination d'une viscosité intrinsèque de $[\eta]=4.48$ dL/g. Avec $K=6.9 \cdot 10^{-6}$ mL/g et $a=1,13$,^{101,102} la M_v est calculée selon l'équation de Mark-Houwink-Sakurada et vaut 150 kDa.

Détermination du ratio M/G

Comme explicité précédemment, le ratio M/G est une des caractéristiques de l'ALG. La méthode de choix pour sa détermination est la RMN ^1H où l'on s'intéresse particulièrement aux protons anomériques. En effet, ces derniers vont voir leur environnement chimique être fortement impacté par les conformations M et G des unités voisines. L'obtention d'un spectre bien résolu sur la zone anomérique d'une solution aqueuse d'ALG peut être compliquée d'un point de vue expérimental car d'une part, l'eau résiduelle résonne aux mêmes déplacements que les protons anomériques, et d'autre part car la viscosité des solutions d'ALG ne permet pas une bonne résolution. L'une des stratégies mise au point par Prieto *et al.*¹⁰³ consiste à réaliser un spectre DOSY à haute température d'une solution aqueuse diluée d'ALG, ce qui permet de mieux distinguer le signal du polymère et de réduire celui de l'eau. L'élévation de la température permet à la fois de réduire la viscosité de la solution, et de décaler le signal de l'eau vers des déplacements chimiques plus faibles, hors de la zone d'intérêt.^{104,105} Le spectre DOSY de l'ALG est présenté en Figure 9 ainsi que l'attribution des différents protons selon Grasdalen *et al.*¹⁰⁵

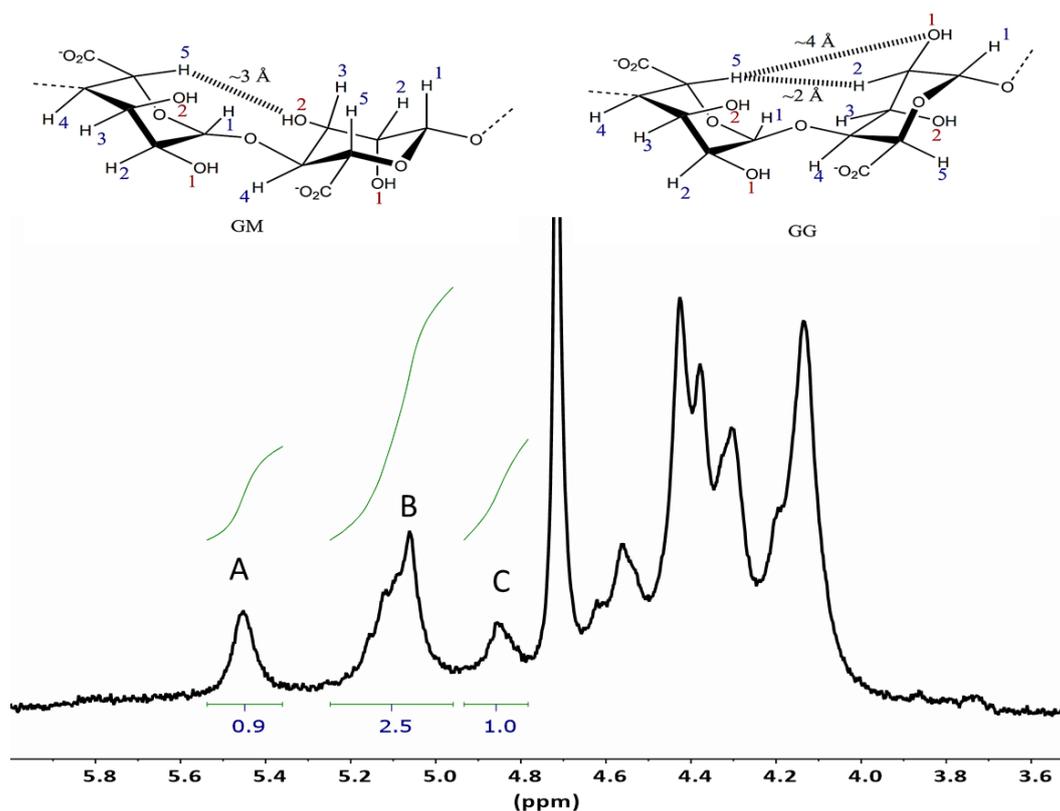


Figure 9 Spectre RMN ^1H DOSY de l'ALG à 70 °C et attribution des différents signaux à l'aide des représentations des conformations GM et GG selon Grasdalen et al. et Vilén et al.^{105,106} Le signal A correspond aux protons G-H1 ; B inclut les protons GGM-H5, MGM-H5, MG-H1, MM-H1, et le signal C correspond aux protons GG-H5

Le ratio M/G de l'ALG est déterminé à partir de rapports entre les intégrales des signaux A, B, C tel que : $\text{Ratio } M/G = \frac{F_M}{F_G}$ où $F_G = \frac{I_A}{I_B + I_C}$ et $F_G + F_M = 1$.¹⁰⁴ Pour le lot d'ALG étudié, une valeur de 2,9 a été déterminée. Il s'agit d'un ALG riche en unités M puisque le ratio moyen des alginate commerciaux a été estimé à 1,3 lors d'une étude.¹⁰⁷ Le ratio M/G ne devrait cependant pas avoir d'influence sur la complexation de l'ALG avec le CS lors du procédé LbL.¹⁰⁸

3. Mise en forme des nanoparticules cœur/couronne à base de pSac

1. Synthèse du cœur de silice SiNP

Les nanoparticules synthétiques de silice (SiNPs) amorphes sont des matériaux couramment utilisés dans le domaine biomédical. Deux voies de synthèses principales sont décrites, les silices pyrogéniques et les silices colloïdales (Figure 10).¹⁰⁹

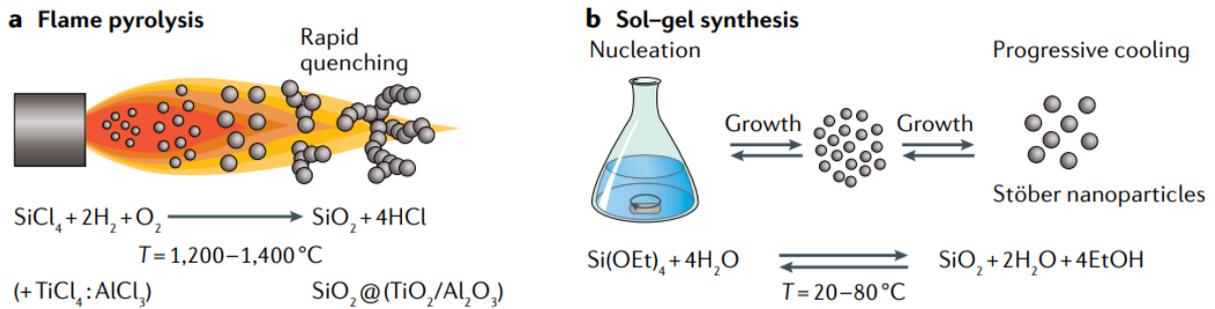


Figure 10 Représentation des deux voies principales de mise en forme de nanoparticules de silice. Reproduit de Croissant et al.¹⁰⁹

Il existe en effet les SiNPs pyrogéniques qui sont formées à haute température par pyrolyse du précurseur SiCl_4 et refroidies rapidement à température ambiante. Les SiNPs synthétisées par cette technique présentent cependant des silanols de surface isolés ou géminaux (Figure 11) qui peuvent être cytotoxiques et qui sont susceptibles de générer des dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*) induisant une grande toxicité.

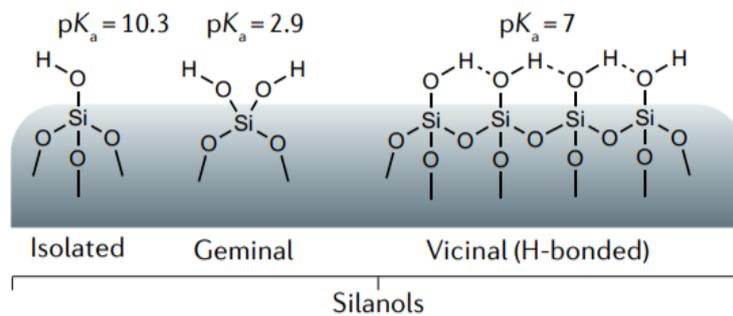


Figure 11 Représentation des différents types de silanols en surface des nanoparticules de silice et leurs pK_a respectifs. Reproduit de Croissant et al.¹⁰⁹

Les silices colloïdales, sont obtenues par l'équilibre de réactions d'hydrolyse et de condensation, on parle de voie sol-gel. Les SiNPs obtenues par sol-gel présentent des silanols de surface vicinaux et sont beaucoup moins toxiques que les silices pyrogéniques. Bien qu'historiquement les premières silices colloïdales ont été les silices précipitées (LUDOX de DuPont) et les silices dites Stöber, depuis les années 1990 une majorité des travaux sur les silices colloïdales décrivent des silices dites mésoporeuses. Ces dernières présentent une porosité de diamètre compris entre 2 et 50 nm selon IUPAC.¹¹⁰ Ces SiNPs mésoporeuses (MSiNPs) sont obtenues par l'introduction du précurseur de silice dans un système auto-assemblé de tensioactif ou de copolymère à bloc amphiphile (*Structure-directing agent*). Les réactions d'hydrolyse et de condensation ont lieu autour des mésophases formées par le tensioactif (hexagonales, cubiques, worm-like, etc). Après l'élimination du tensioactif, par extraction par solvant ou traitement thermique, les MSiNPs présentent une mésoporosité qui réplique la morphologie des tensioactifs auto-assemblés. Ce type de NPs est particulièrement intéressant pour le domaine biomédical où leur grande surface

spécifique et leur mésoporosité sont des atouts pour le design de nouveaux systèmes d'encapsulation et de libération d'actifs.¹¹¹

Dans nos travaux, les particules cœur-couronne à base de silice sont avant tout des particules modèles, c'est pourquoi les SiNPs synthétisées sont des silices Stöber condensées qui ne présentent pas de mésoporosité. Cette différence a pour conséquence une surface spécifique inférieure à celles des MSiNPs, mais en terme de synthèse le procédé est simplifié puisqu'il ne nécessite pas l'utilisation d'un surfactant ni son élimination.

Les SiNPs ont donc été synthétisées par voie sol-gel en milieu hydroalcoolique alcalin, selon une adaptation du procédé Stöber. La synthèse a été reproduite des travaux de thèse de P. Lagarrigue dans l'équipe PPB du CIRIMAT.¹¹² Typiquement, le précurseur tétraéthylorthosilicate (TEOS) est introduit dans un mélange d'éthanol absolu et de solution aqueuse d'ammoniaque. L'équilibre entre l'hydrolyse des alcoxy-silanes du TEOS en silanols (1) et la condensation des silanols entre eux (2a) ou avec un alcoxy-silane (2b) commence (Figure 12). Visuellement, le passage d'une solution limpide et transparente à une suspension laiteuse et opaque est observé au cours de cette réaction qui est laissée sous agitation à température ambiante pendant 16 h.

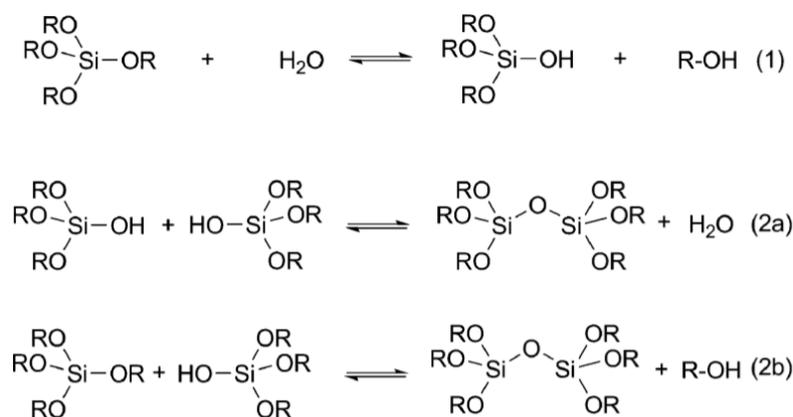


Figure 12 Mécanisme de l'équilibre hydrolyse/condensation à partir d'un précurseur de type $\text{Si}(\text{OR})_4$ menant à la nucléation et la croissance de nanoparticules de silice. Reproduit de Hoffman et al.¹¹³

Deux formats de synthèse ont été réalisés, le premier visant un lot de 2 g de SiNP (lot A), et le second 10 g (lot B). Au vu des volumes de suspension dans ces deux synthèses, les nanoparticules du lot A ont été isolées par centrifugation, trempées à l'azote puis lyophilisées. Les particules du lot B, en suspension dans un volume total 600 mL ont été, quant à elles, filtrées sur une membrane 0.2 μm puis trempées et lyophilisées. De manière surprenante, cette différence sur le procédé de récupération des particules a eu une influence sur leur taille, ce paramètre sera discuté dans la section suivante.

2. Caractérisations des SiNPs

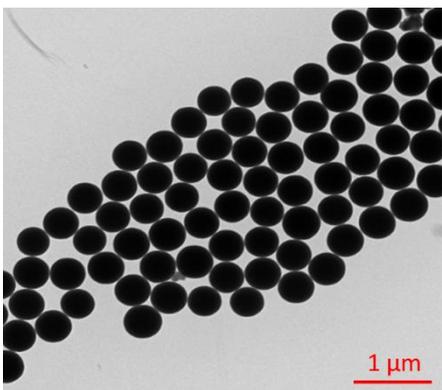
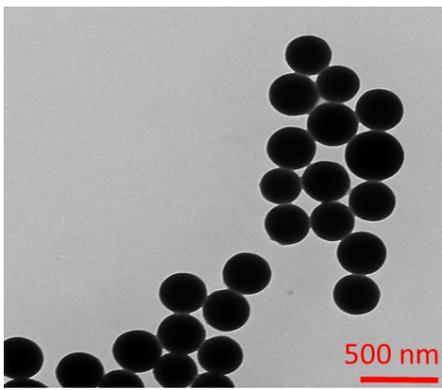
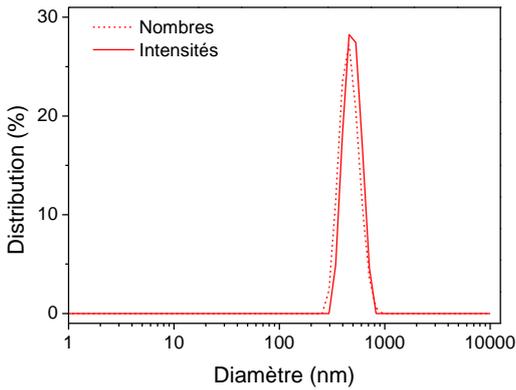
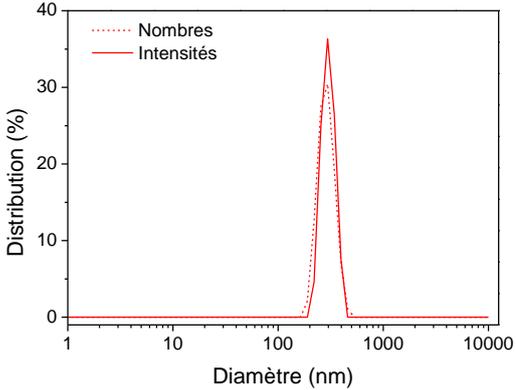
Les lots A et B de nanoparticules ont été caractérisés par MET et par DLS afin d'en déterminer respectivement les diamètres apparents D_{TEM} et diamètres hydrodynamiques D_h . Le potentiel- ζ a également été mesuré, ainsi que la surface spécifique du lot B. Les résultats sont comparés dans le Tableau 2.

La MET confirme, pour les deux lots A et B, que les silices colloïdales sont sphériques, monodisperses et non poreuses conformément aux attentes pour une synthèse Stöber en catalyse basique. Les diamètres apparents ont été mesurés sur un nombre de particules supérieur à 70.

Les expériences de diffusion de la lumière ont également apporté la confirmation de la monodispersité des lots A et B, avec une dispersité (PDI) particulièrement faible pour le lot A. Les distributions en nombres et en intensités sont superposées et ne révèlent pas la présence de sous-population dans l'échantillon. Les diamètres hydrodynamiques (Z-av) mesurés sont de 490 et 359 nm pour les lots A et B respectivement. Une différence significative sur le diamètre est donc observée à l'issue de ces deux synthèses, dont le seul paramètre différent est la méthode d'isolation des particules. Une première hypothèse concerne les volumes de solutions que représentent les lots A et B, et donc les conditions d'agitation qui ont pu être différentes. On pourrait supposer que l'agitation du lot B ait été relativement plus vive, ce qui aurait abouti à limiter la croissance des particules. La deuxième explication repose sur le principe même de la séparation par centrifugation qui est basée sur des différences de densité. Il est possible que dans le lot A, seules les plus grosses particules aient été récupérées dans le culot et que la population de diamètre inférieur soit restée en suspension dans le surnageant. Cette explication coïncide avec les dispersités puisque la dispersité du lot A est très faible (0.02), alors que celle du lot B, dans lequel l'ensemble des particules (de diamètre supérieur au seuil de coupure du filtre de 0,2 μm) ont été filtrées, est de 0,4. La différence de diamètre observée sur ces deux lots est toutefois jugée acceptable. Les potentiels- ζ sont négatifs comme attendu à un pH d'environ 7, puisque le point isoélectrique des silices amorphes est de 3.¹⁰⁹

Enfin, la surface spécifique des nanoparticules du lot B a été déterminée par la méthode B.E.T et vaut 14 m^2/g , ce qui est largement inférieur aux silices mésoporeuses dont les surfaces spécifiques peuvent dépasser 1000 m^2/g mais en accord avec les particules précédemment synthétisées avec ce protocole.¹¹⁴

Tableau 2 Comparaison des spécificités des lots A et B de SiNPs et leur caractérisation physico-chimique

	Lot A (2 g)	Lot B (10 g)
Méthode de récupération des SiNPs	Centrifugation + lyophilisation	Filtration sur 0,2 μm + lyophilisation
Masse récupérée	1,8 g	8,9 g
TEM		
DLS		
D_{TEM}	$477 \pm 20 \text{ nm}$ (n = 112)	$312 \pm 25 \text{ nm}$ (n=70)
D_h (Z-av) 0,5 mg/mL eau	490 nm	359 nm
PDI	0,02	0,4
Potentiel- ζ 0,5 mg/mL eau	$-46,1 \pm 0,3 \text{ mV}$	-38,6 mV
Surface spécifique	-	14,48 m ² /g

Les SiNPs du lot A seront utilisées pour l'optimisation du protocole de mise en forme des particules cœur-couronne SiNP@CS/ALG, alors que celles du lot B seront utilisées pour la production des lots utilisés pour la modification de surface dans la suite de ce manuscrit.

3. Mise en forme des nanoparticules cœur-couronne SiNP@CS/ALG

Les cœurs de silice colloïdale sont très souvent utilisés pour la formation de nanoparticules cœur-couronne, leur fonctionnalité de surface avec les silanols permettant à la fois une modification chimique covalente ou une modification physique par adsorption électrostatique de molécules positivement chargées. La modification par LbL est donc propice à ce matériau. Le CS, un polycation de pKa 6,5 et l'ALG, polyanion de pKa 4, sont parfaitement adaptés pour la réalisation de multicouches puisqu'ils sont très souvent associés pour former des complexes polyélectrolytes (PEC). La mise en forme de nanoparticules à base d'un cœur de silice et d'une couronne de CS et d'ALG par LbL a déjà été décrite sur différents types de particules de silice. En effet, les travaux de Du *et al.* et Feng *et al.* décrivent le revêtement de nanoparticules de silice mésoporeuse avec un LbL de CS et d'ALG, alors que Yang *et al.* ont réalisé un revêtement identique mais sur des nanotubes de silice mésoporeuse.⁷⁶⁻⁷⁸ Ces travaux décrivent la mise en forme de leurs systèmes composites et leur caractérisation par différentes techniques (IRTF, ATG, DLS, zétamétrie, etc). Un protocole a été mis à point en s'appuyant sur ces travaux pour mettre en forme des nanoparticules cœur-couronne composées de silice et d'une couronne de polyélectrolytes. La mise en forme est schématisée ci-dessous (Schéma 3)

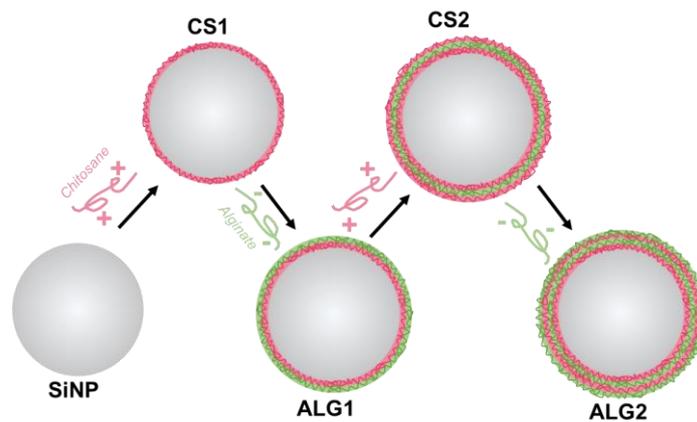


Schéma 3 Représentation schématique de la mise en forme des nanoparticules SiNP@CS/ALG (ALG2) par assemblage LbL de deux bicouches de CS et d'ALG sur les SiNPs

Dans cette partie, la mise en forme des nanoparticules SiNP@CS/ALG sera décrite en expliquant tout d'abord l'optimisation du protocole, sa reproduction et la caractérisation des particules obtenues.

Concernant la nomenclature utilisée dans cette partie, pour plus de clarté sur l'assemblage LbL, chaque couche a été numérotée, soit CS1, ALG1, CS2, ALG2. Au cours de l'assemblage, elles seront désignées ainsi. De manière générale, pour désigner les particules cœur-couronne « finales », le terme utilisé sera SiNP@CS/ALG.

Optimisation du protocole de mise en forme

Bien que décrit dans la littérature, la mise en place du protocole de LbL nécessite de prendre en compte un certain nombre de paramètres. Ceux-ci sont listés dans la Figure 13 ci-dessous :

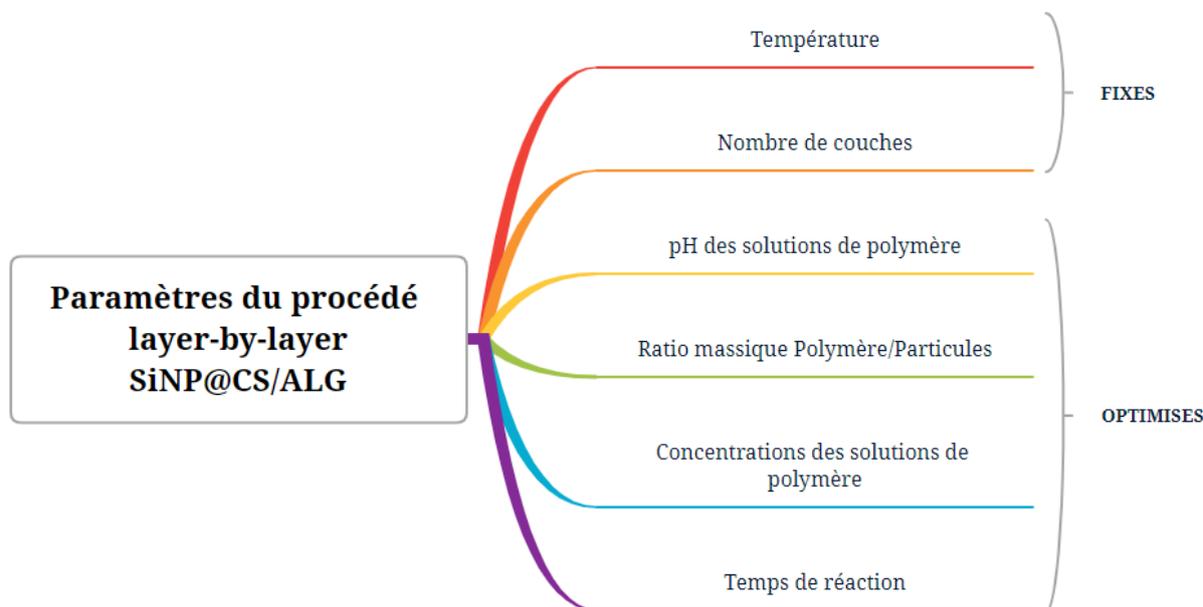


Figure 13 Représentation schématisée des paramètres fixés et optimisés dans le procédé LbL

Les paramètres fixés seront brièvement justifiés puis les résultats associés à l'optimisation des paramètres suivants seront donnés pour montrer la démarche ayant permis d'aboutir au protocole optimisé.

Température

Au vu des protocoles existants de LbL CS/ALG sur des particules de silice, travailler à température ambiante paraît tout à fait cohérent.

Nombre de couches

En s'appuyant sur les travaux de Du *et al.* et Feng *et al.*, nous avons décidé de réaliser deux bicouches de CS et d'ALG, les articles rapportant quant à eux respectivement trois et deux bicouches.^{77,115} Dans les travaux de Yang *et al.*, quatre bicouches CS/ALG sont réalisées sur des nanotubes de silices mésoporeuses.⁷⁶ Un nombre trop important de couches rend cependant la mise en forme longue et contraignante d'un point de vue expérimental, d'autant plus que l'intérêt d'un si grand nombre de couches n'est pas explicitement justifié. De plus, l'objectif dans cette étude est la mise en forme de particules modèles qui seront par la suite remplacées par des nanoparticules homogènes de pSac. Deux bicouches semblent donc être un bon compromis entre

la difficulté expérimentale et le fait d'avoir un PEC avec des interactions électrostatiques suffisamment fortes pour qu'il soit bien cohésif.

pH des solutions de polymères et choix du ratio polymères/particules

L'optimisation de ces deux paramètres a été réalisée en parallèle sur une même série de revêtement de la première couche de CS sur les SiNPs. Des solutions de CS à pH 4 et 6 à 1%_{m/v} ont été préparées, ainsi qu'une suspension de SiNPs à 50 mg/mL dans l'eau dispersée par ultrasonication.

Des volumes de suspension de SiNPs ont été ajoutés dans les solutions de CS tels que les ratios SiNP:CS soient de 1:1 et 1:10. Les suspensions sont laissées sous agitation à température ambiante pendant une nuit, après quoi les particules CS1 ont été isolées par centrifugation et lavées à l'eau. La comparaison de ces différents échantillons a été réalisée par ATG (Figure 14) et par zétabilité (Tableau 3) :

Tableau 3: Mesures des potentiels- ζ des particules et de leur fraction massique en hydrogel déterminée par ATG

	ZP (mV)	% _m hydrogel
SiNP	-37,1 ± 0,4	0,0
pH 4 1/1	-3,9 ± 1,0	2,9
pH 4 1/10	24,8 ± 0,4	4,6
pH 6 1/1	-1,7 ± 0,4	3,0
pH 6 1/10	33,9 ± 1,2	5,0

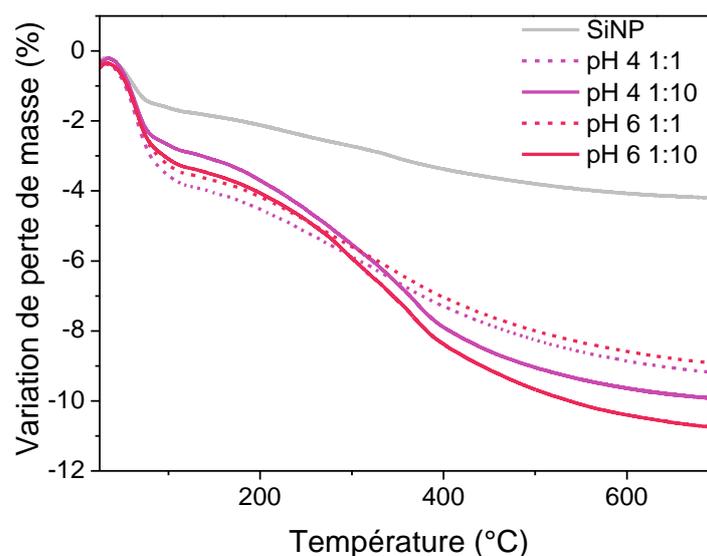


Figure 14 Thermogrammes des particules CS1 mises en forme à pH 4 (violet) ou 6 (rose) et avec des ratios SiNP:CS de 1:1 (trait pointillé) ou 1:10 (trait plein)

Concernant l'influence du pH, les valeurs de potentiels- ζ à pH 4 sont toutes les deux très proches, tout comme les deux valeurs des échantillons à pH 6. Le pH ne semble pas avoir impacté le revêtement, contrairement au ratio SiNP :CS.

Les valeurs de potentiel- ζ des revêtements au ratio SiNP :CS de 1 :10 sont toutes deux proches de 0 mV contrairement à celles des ratios 1 :1 qui sont largement positives (> 25 mV). Une première tendance peut donc être déduite de ces résultats qui montrent que le revêtement 1 :10 permet un meilleur dépôt de CS sur la surface des SiNPs. Les thermogrammes présentés en Figure 14 ont permis de confirmer cette tendance puisque les plus grandes pertes de masses sont atteintes pour les échantillons pH 4 1 :10 et pH 6 :10 où le ratio d'hydrogel est d'environ 5 %. Les ratios pH 4 1 :1 et pH 6 1 :1 sont de 3%_m d'hydrogel de CS.

Pour conclure sur l'optimisation de ces deux paramètres, les résultats montrent que le pH n'influe pas sur l'efficacité du dépôt de CS. Par la suite, il sera fixé à une valeur moyenne de 5. Le ratio SiNP :CS en revanche a impacté le revêtement, les particules CS1 étant significativement plus chargées positivement en surface avec un ratio 1 :10. La charge de surface est essentielle pour la suite du procédé LbL, ce ratio sera donc conservé.

Choix des concentrations pour les couches ALG1, CS2, ALG2

Les SiNPs ont été dispersées à 50 mg/mL par ultrasonication puis imprégnées dans une solution de CS à 1%_{m/v} (pH 5) avec un ratio massique particules : CS de 1 :10 pendant 16 h à température ambiante sous agitation. Les particules SiNP@CS1 ont alors été isolées par centrifugation puis lavées à l'eau par deux cycles de centrifugation/redispersion. Elles ont ensuite été ajoutées dans une solution d'ALG à 1%_{m/v} à pH 5 dans le même ratio massique SiNP :ALG de 1 :10. Au moment de l'ajout, des fibres de PEC se sont instantanément formées, empêchant toute redispersion des particules. Il s'agit probablement d'un assemblage polymère/particule où l'ALG a complexé les particules recouvertes de CS.

Pour éviter ce phénomène, le ratio massique a été inversé pour tendre vers SiNP:ALG = 10 :1, pour cela la solution d'ALG a été diluée à 0,1%_{m/v} (pH 5). Visuellement, ces conditions n'ont pas mené à la formation de fibres de PEC, la caractérisation par DLS et par zétamétrie a confirmé l'état non agrégé et la charge négative en surface des particules SiNP@ALG1.

A l'issue de la formation réussie de la première bicouche, la mise en forme complète des SiNP@CS/ALG avec les deux bicouches a été réalisée puis caractérisée (Annexe 1). Les potentiels- ζ alternent entre des valeurs négatives (SiNP, ALG1, ALG2) et des valeurs positives (CS1, CS2) ce qui tend à confirmer la construction de la couronne multicouche de polyélectrolytes. Les conditions optimisées dans cette partie -c'est-à-dire une concentration de polymères à 0,1%_{m/v} et le ratio SiNP : polymère de 10 :1 pour les couches ALG1, CS2, ALG2 - sont donc adaptées et seront

conservées par la suite. Il est important de préciser ici que le protocole de la couche CS1 n'a pas été modifié bien que différent des couches suivantes.

Temps de réaction

Le mécanisme de LbL est connu atteindre un équilibre thermodynamique très rapidement.¹¹⁶ A ce stade de l'optimisation du protocole, les temps de réactions sont de 16 h pour la couche CS1, puis 3 h pour les couches ALG1, CS2, ALG2. La synthèse d'un lot s'étale sur trois journées consécutives, ce qui la rend contraignante d'un point de vue pratique. Nous proposons donc de réduire le temps de revêtement de 3 h des couches ALG1, CS2 et ALG2 à 1 h, afin que ces trois étapes puissent être réalisées dans une même journée. La durée de revêtement de la couche CS1(16 h) n'est pas modifiée.

Ce protocole réduit en temps a été caractérisé étape par étape en zétamétrie (Tableau 4)

Tableau 4 Valeurs de potentiels- ζ mesurées au cours de l'assemblage LbL avec un temps d'imprégnation de 16 h pour la couche CS1 et 1 h pour ALG1, CS2, ALG2

	pH	ZP (mV)	STDV
SiNP	6,8	-38,6	0,6
CS1	6,5	43,3	1,5
ALG1	6,3	-21,5	0,4
CS2	6,6	21,0	0,4
ALG2	6,4	-22,6	0,2

Les valeurs mesurées de potentiels- ζ montrent bien une alternance des charges de surface, positives pour les couches CS1 et CS2, négatives pour les couches ALG1 et ALG2 comme attendu, aucune différence n'est observée par rapport au protocole avec le temps de réaction de 1 h. Le temps de revêtement des couches ALG1, CS2, ALG est donc fixé à 1 h, celui de la couche CS1 est conservé à 16 h.

L'optimisation du protocole est alors terminée, les principaux paramètres étudiés sont résumés dans la Figure 15 ci-dessous :

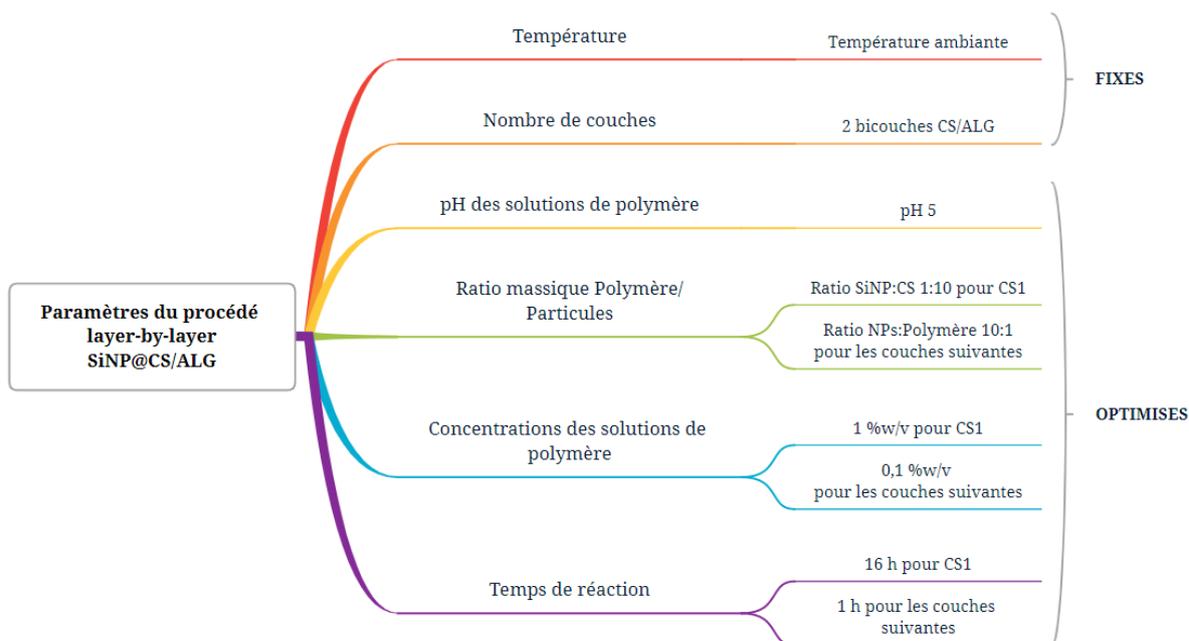


Figure 15 Représentation schématisée récapitulative des paramètres fixes et optimisés du procédé LbL

Ce protocole a ensuite été caractérisé et reproduit.

Caractérisations des nanoparticules SiNP@CS/ALG

Observation de la couronne d'hydrogel en MET

Les SiNP@CS/ALG ont, dans un premier temps, été observées en MET (Figure 16).

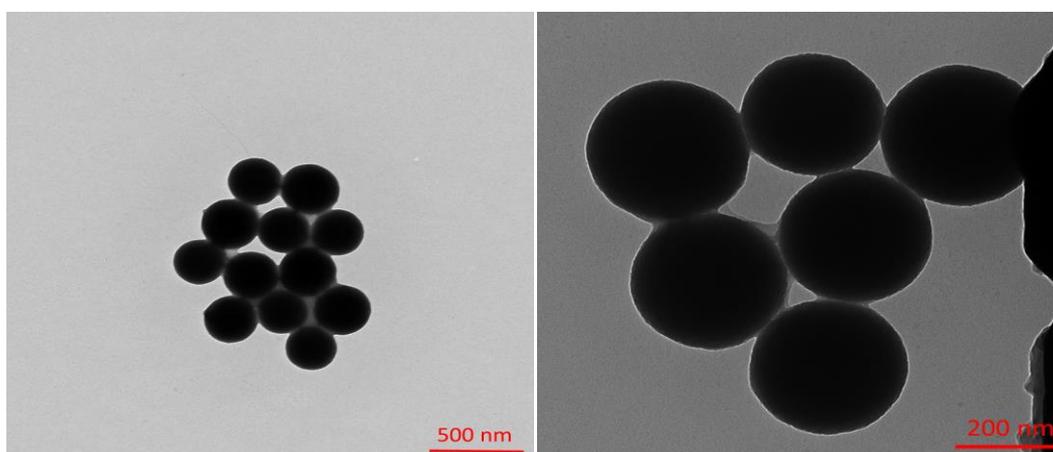


Figure 16 Images de MET des nanoparticules SiNP@CS/ALG

La couche de polymère se distingue à la surface des SiNPs car elle est plus claire et plus irrégulière sur les surfaces (à cette échelle) lisses des SiNPs. Comme attendu sur un échantillon sec, la couche de polymère est très fine et déformée puisqu'elle est déshydratée ce qui entraîne l'agglomération des particules. Les images MET ne permettent pas de déterminer une épaisseur de couche organique mais elles confirment cependant la présence des polyélectrolytes en surface.

Caractérisation de l'assemblage LbL par IRTF

Les spectres IRTF en transmission des nanoparticules de silice et des nanoparticules cœur-couronne SiNP@CS/ALG ont été superposés dans la Figure 17 afin de discuter l'évolution des bandes caractéristiques en présence.

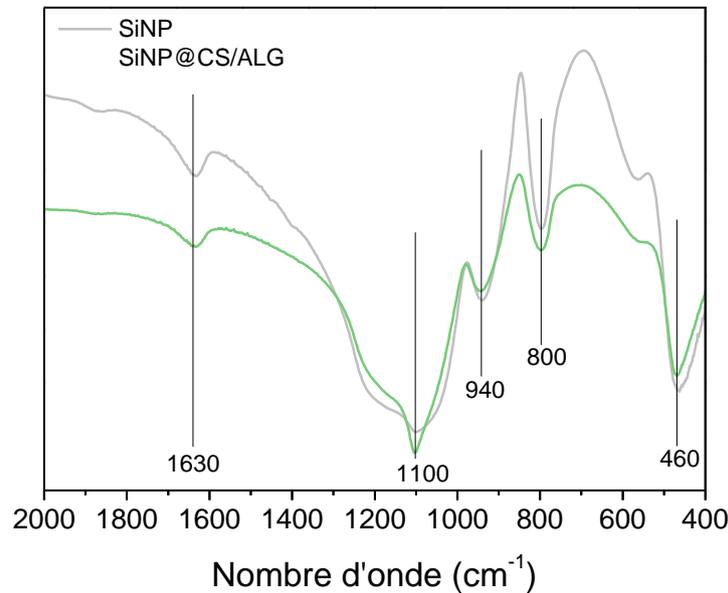


Figure 17 Spectres IRTF des nanoparticules SiNP (gris) et SiNP@CS/ALG (vert)

Sur chacun des deux spectres sont identifiées les bandes caractéristiques des nanoparticules de silice: à 1630 cm^{-1} la bande correspond à l'eau intermoléculaire résiduelle, à 1090 cm^{-1} on retrouve l'élongation asymétrique des silanols, à 960 cm^{-1} la déformation asymétrique des silanols. Enfin, les bandes des vibrations des liaisons Si-O-Si sont identifiées à 460 cm^{-1} pour la déformation asymétrique et 800 cm^{-1} pour l'élongation symétrique.

La comparaison avec les particules SiNP@CS/ALG ne montre pas de différences majeures, en effet les bandes caractéristiques des polysaccharides attendues ne sont pas visibles. Typiquement, des bandes de vibrations intenses attendues étaient l'élongation des COO^- de l'ALG à 1620 cm^{-1} ou l'élongation d'amide primaire du CS à 1650 cm^{-1} , comme le montrent leurs spectres respectifs en Annexe 2.

Au vu du faible ratio polymère/particules sur des particules sèches (lyophilisées), on peut supposer que les contributions des bandes précédemment citées sont masquées par les bandes intenses des liaisons de la silice. Les spectres IRTF présentés de Du *et al.* ne permettent pas d'identifier des bandes de vibration du CS ou de l'ALG mais ils confirment, de manière indirecte, la présence du CS marqué par un fluorophore par l'attribution d'une bande de ce fluorophore.¹¹⁵ Yang *et al.* identifient toutefois les bandes d'élongation symétrique des carboxylates de l'ALG à 1420 cm^{-1} , ainsi que la déformation des amines protonées à 1524 cm^{-1} .⁷⁶ Il est important de

préciser que dans ces travaux, huit couches de polymères sont déposées, et bien que la fraction massique de polymère dans le composite n'ait pas été déterminée, on peut supposer que celle-ci est supérieure à la fraction de polymère dans nos NPs SiNP@CS/ALG. Pour conclure, l'IRTF n'apporte pas de confirmation de la présence de la couronne de polymère autour des particules de silice, ce que l'on explique très certainement par un trop faible taux dans le système par rapport à la silice. Ceci ne remet pas en question la réussite du dépôt de polyélectrolyte par LbL au vu des autres caractérisations qui le prouvent, comme la microscopie électronique et l'ATG.

Quantification de la couronne d'hydrogel par ATG

Un suivi thermogravimétrique a été réalisé au long de la construction de la couronne multicouche afin de caractériser les dépôts successifs de polymères (Figure 18). Une rampe de température a été appliquée entre 25 et 700 °C ; à 700 °C on s'attend à ce que l'intégralité du polymère soit dégradé et que seule la silice soit encore présente. Les couches CS1, ALG1, CS2 et ALG2 sont comparées aux SiNPs initiales, les ATG du CS et de l'ALG sont présentées en Annexe 3.

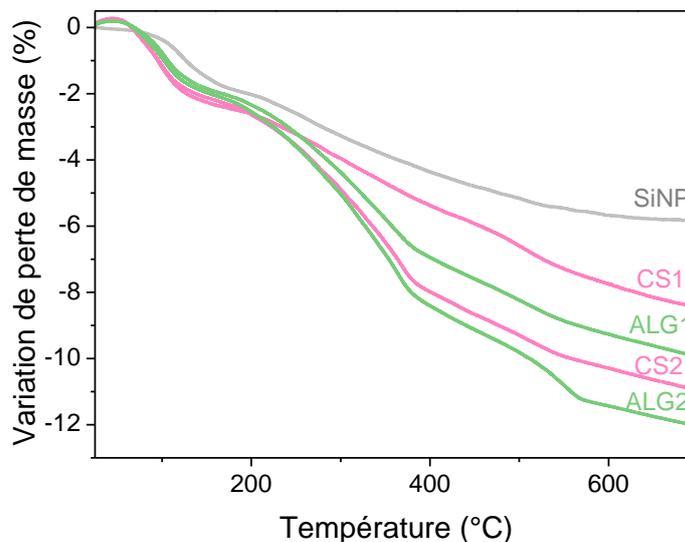


Figure 18 Thermogrammes des échantillons de particules à chaque étape du LbL

Les thermogrammes successifs confirment que la masse de fraction organique dégradée entre 25 et 700 °C augmente avec le nombre de couches de polymères. La fraction d'hydrogel est déterminée à chaque couche en déduisant la perte de masse subie par les particules de SiNP et la perte de masse des couches précédentes (Tableau 5). Les pourcentages exprimés dans le tableau sont les fractions d'hydrogel adsorbées à chaque couche, la dernière ligne du tableau correspond à la somme de chaque fraction.

Tableau 5 Fractions massiques d'hydrogel déterminées par ATG à chaque étape du LbL et fraction totale cumulée d'hydrogel dans les particules SiNP@CS/ALG

	%_m hydrogel
SiNP	0,00
CS1	2,6
ALG1	1,5
CS2	1,0
ALG2	1,1
SiNP@CS/ALG	6,2

La fraction d'hydrogel dans les particules composites est donc estimée à 6,2 %_m. Dans leurs travaux respectifs, Du *et al* rapportent une fraction de polymère d'environ 20%_m pour leurs 3 bicouches, et Feng *et al.* de 26%_m pour leur système similaire à deux bicouches. Le taux supérieur d'adsorption décrit dans ces deux systèmes peut s'expliquer par le fait que les nanoparticules de silice utilisées sont mésoporeuses et présentent une surface spécifique largement supérieure (907 m²/g et 167 m²/g respectivement). Ainsi, une plus grande quantité de polymère peut être adsorbée en surface.

Influence du milieu de suspension des particules

Pour la suite de ces travaux et notamment pour l'étude de la stabilité colloïdale en fonction de la modification de surface des particules, il est important de caractériser au préalable les particules en suspension. Les suspensions de SiNP@CS/ALG (lot 1) ont été caractérisées dans l'eau et dans un milieu salin à 10⁻³ M de NaCl afin de comparer l'influence de la force ionique sur les diamètres hydrodynamiques D_h (Z-av), la dispersité des suspensions et le potentiel- ζ des particules. Cette concentration en sel sera également utilisée pour l'étude de la stabilité de colloïdale (Partie 2, Chapitre 2). Les mesures de DLS et zétamétrie ont été faites à 25 °C sur des suspensions à 0,5 mg/mL.

Détermination des diamètres hydrodynamiques par DLS

Tableau 6 Mesures dans l'eau et dans un milieu salin (NaCl 10⁻³ M) des Z-av et des dispersités (PDI) des particules au long du dépôt LbL

	pH	Eau		NaCl 10⁻³ M	
		Z-av (nm)	PDI	Z-av (nm)	PDI
SiNP	6,8	359	0,4	-	-
CS1	6,5	841,9	0,28	563,2	0,2
ALG1	6,3	503,0	0,25	706,5	1,0
CS2	6,6	742,1	1	712,7	0,6
ALG2	6,4	474,1	0,24	683,2	1,0

- DLS dans l'eau

Il est intéressant de remarquer l'évolution des diamètres hydrodynamiques de NPs cœur-couronne à chaque étape du procédé LbL. Le dépôt CS1 donne de grosses NPs, qui vont ensuite se retracter lorsque l'ALG vient se complexer avec le CS. Lors de l'étape CS2, le D_h augmente à nouveau, laissant supposer une couche plus « lâche » et qui est encore une fois contractée lors de la complexation CS/ALG de la couche ALG.

De manière factuelle, les SiNPs ont un D_h de 359 nm et les SiNP@CS/ALG de 474 nm, ainsi l'épaisseur de la couronne est estimée à une cinquantaine de nm lorsque les NPs sont suspendues dans l'eau. Les distributions en nombre et en intensité des diamètres hydrodynamiques montrent une population monomodale et monodisperse (Figure 19).

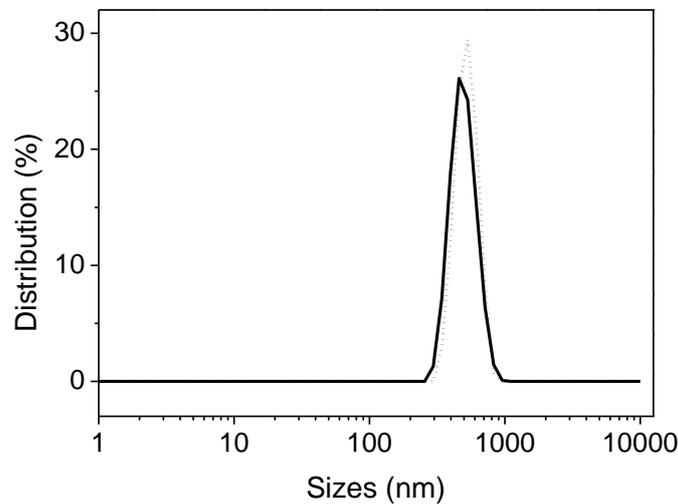


Figure 19 Distributions en nombre (trait plein) et en intensité (trait pointillés) des diamètres hydrodynamiques déterminés par DLS dans l'eau à 0,5 mg/mL

- DLS dans le milieu salin

Le milieu salin a une force ionique plus élevée que l'eau et la concentration en ions peut jouer à la fois sur la taille des objets et sur leur stabilité. En effet, les ions peuvent écranter les chaînes de polyelectrolytes les unes des autres et donc affaiblir les interactions électrostatiques qui les lient.^{117,118} On peut alors s'attendre à ce que les particules cœur-couronne aient des plus grands diamètres dans le milieu salin du fait de cette répulsion intermoléculaire. Cet effet n'est cependant pas observable sur les mesures de Z-av ; la tendance de décontraction/contraction de la couronne n'est pas marquée et les Z-av varient entre 600 et 700 nm sans tendance. Les valeurs de dispersités sont particulièrement élevées dans le milieu salin. Cela peut s'expliquer par l'écrantage des charges de surface qui limite la répulsion électrostatique entre les particules. Celles-ci ont alors plus tendance à s'agréger que dans l'eau, ce qui peut expliquer cette dispersité globalement plus élevée.

Etude de la charge de surface par zétamétrie

Comme cela l'a déjà été démontré lors de l'optimisation du procédé LbL, les potentiels- alternent entre des valeurs négatives (SiNP, ALG1, ALG2) et positives (CS1, CS2), ce qui est en accord avec la nature des polyélectrolytes déposés à chaque couche. La concentration en sel n'impacte pas grandement les valeurs puisque de faibles différences sont observées (Figure 20).

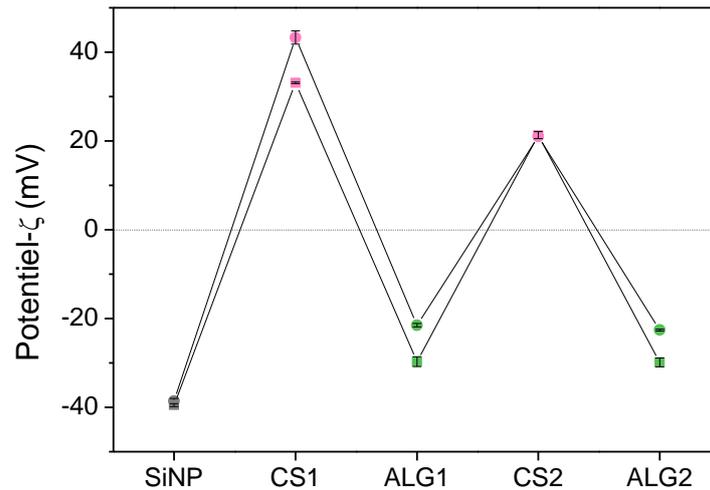


Figure 20 Mesures des potentiels- ζ dans l'eau (●) et dans le milieu à 10-3 M NaCl (◻) des particules à 0,5 mg/mL à chaque étape du LbL

Les valeurs mesurées sont cohérentes avec les résultats obtenus par Du et Feng dans leurs travaux respectifs et confirment donc l'assemblage de la multicouche de polyélectrolytes.^{77,115}

Reproduction du protocole de référence

6 lots distincts de SiNP@CS/ALG ont été préparés avec le protocole résumé en Figure 15. Chacun a été caractérisé en DLS et zétamétrie, les diamètres hydrodynamiques et potentiels- ζ sont exposés dans le Tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 Mesures des Z-av et potentiels- ζ des différents lots de particules SiNP@CS/ALG ainsi que leur moyenne et écart-type

Lot	Z-av (nm)	Potentiel- ζ (mV)
1	474	-22,6
2	461	-29
3	535	-26,5
4	493	-23,5
5	416	-30,3
6	437	-27,3
MOYENNE	469 \pm 42	-26,5 \pm 3

Une diamètre hydrodynamique moyen de 469 \pm 42 nm est calculé, ainsi qu'une valeur de potentiel- ζ moyenne de -26,5 \pm 3 mV, ce qui semble indiquer que ce protocole est bien reproductible. De plus, deux lots de cette étude ont été réalisés par E. De Smedt, stagiaire de M1 ayant travaillé sur le projet, ce qui montre que le protocole n'est pas opérateur-dépendant.

Conclusion sur la mise en forme des SiNP@CS/ALG

A la suite de l'optimisation des paramètres de LbL, la construction des deux bicouches de CS et d'ALG a été caractérisée par zétamétrie, DLS, ATG, IRTF et MET. L'ensemble de ces caractérisations, à l'exception de l'IRTF dont les résultats ne sont pas probants, ont permis de confirmer l'obtention de cet assemblage. Les particules SiNP@ALG/CS ont un diamètre hydrodynamique moyen de 470 nm et une charge de surface de -26 mV due à la présence d'ALG.

4. Conclusion

L'objectif de cette partie était la mise en forme de nanoparticules modèles cœur-couronne, composées d'un cœur de silice et d'une couronne de polysaccharides. Les cœurs de silice synthétisés par voie sol/gel sont sphériques et monodisperses, comme attendu. La couronne de polysaccharides a été assemblée par LbL grâce à des dépôts successifs de CS et d'ALG, deux pSac de charges opposées. Les caractérisations au cours des différentes étapes de mises en forme ont permis de confirmer l'obtention des nanoparticules modèles attendues. En particulier, les particules SiNP@CS/ALG ont un potentiel- ζ négatif, indiquant que la surface est recouverte d'ALG. La surface des particules comporte donc des fonctions acides carboxyliques qui permettront leur modification de surface par la suite.

P2- Chapitre 2 : Modification de surface des nanoparticules coeur-couronne et mise en évidence des propriétés thermosensibles

1. Introduction

En ingénierie tissulaire et de manière générale pour la délivrance d'actifs, le design de systèmes stimuli-répondants est particulièrement intéressant puisque ceux-ci permettent des actions contrôlées spatialement et temporellement. Dans le cas des systèmes particuliers composites à base de polysaccharides, une sensibilité au pH est observée lorsque ces derniers sont des polyélectrolytes. Les systèmes pH-sensibles sont notamment de prometteurs vecteurs d'actifs anti-tumoraux car l'une des distinctions entre les cellules cancéreuses et les cellules saines est le pH de la matrice extra-cellulaire.¹¹⁹ Celle des cellules cancéreuses a un pH acide alors que le pH physiologique est de 7,4.¹²⁰ On comprend ainsi aisément qu'un système capable de libérer spécifiquement sa charge active lorsqu'il est en milieu acide est un atout considérable pour le traitement de tumeurs.

La température est également un stimulus physique qui est particulièrement étudié dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.^{121,122} Cependant, peu de polysaccharides sont naturellement thermosensibles. L'agarose, le carraghénane et la gomme gélane font partie de cette famille.¹²³ Ils présentent des propriétés de température de solution critique supérieure (Upper critical solution temperature, UCST) et ont donc un comportement inverse aux plus connus polymères à LCST : ils sont hydrophobes à température ambiante et hydrophiles au-delà de leur température critique. Les polymères à UCST ont un usage limité pour les applications biomédicales, contrairement aux propriétés de LCST qui sont souvent recherchées. En effet, les polymères LCST permettent d'obtenir une solution fluide à température ambiante qui transite sous forme de gel dans le milieu physiologique avec la température corporelle. Ces systèmes ont l'avantage d'être injectables et, pour l'ingénierie tissulaire, ils permettent d'encapsuler et de libérer des cellules sans que celles-ci soient confrontées à des températures incompatibles avec leur survie.

Les propriétés de LCST sont souvent apportées aux polysaccharides par modification chimique. En effet, comme décrit précédemment, les pSac ont une grande fonctionnalité disponible qui est utilisée i) pour synthétiser des dérivés thermosensibles en apportant des groupements spécifiques, ou ii) pour les fonctionnaliser avec des polymères synthétiques thermorépondants.¹²³ Les polymères synthétiques les plus utilisés pour la modification de pSac sont le PNIPAM et la PVCL. Le CS a notamment été greffé avec un PNIPAM-COOH par *grafting to* en utilisant les agents de couplage peptidique N-hydroxysuccinimide (NHS)/ 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC).¹²⁴ D'autres travaux rapportent la synthèse de CS-*g*-PNIPAM par *grafting from*, avec une polymérisation radicalaire contrôlée (en l'occurrence ATRP)¹²⁵ ou non.¹²⁶⁻¹²⁸ Concernant la synthèse de CS-*g*-PVCL, l'équipe de Fernandez-Quiroz a rapporté le *grafting to* de

PVCL-COOH sur du CS en présence de l'agent de couplage DMTMM (Chlorure de 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium).¹²⁹⁻¹³¹

La modification de l'ALG pour obtenir le copolymère greffé ALG-*g*-PNIPAM est principalement décrite par *grafting to* de PNIPAM-NH₂ en présence d'agents de couplage : NHS/EDC,³⁶ EDC,¹³² EDC/HOBt.¹³³ Pour le copolymère ALG-*g*-PVCL, on peut citer les travaux de Swamy *et al.* qui décrivent une synthèse par *grafting from* par polymérisation radicalaire de la NVCL en présence d'AIBN.¹³⁴ L'AIBN réagit avec un hydroxyle pour former un radical O• qui amorce ensuite la polymérisation de la NVCL.

Ces stratégies de modifications chimiques des pSac peuvent être réalisées sur les polymères en solution, mais elles peuvent également être transposées sur des systèmes nanoparticulaires comme les SiNP@CS/ALG.

Ce chapitre porte donc sur la modification de surface des nanoparticules coeur-couronne à base de silice et d'hydrogel précédemment formulées, dans le but de leur apporter des propriétés thermosensibles. L'objectif est de démontrer la thermosensibilité du biomatériau développé. Dans un premier temps, la stratégie de modification de surface visée et la démarche suivie seront explicitées sous la forme d'un questionnement. Les résultats concernant la caractérisation de la modification de surface seront ensuite présentés et discutés. Enfin, le caractère thermosensible des particules modifiées sera étudié afin de répondre à la problématique de la thèse.

2. Stratégie de modification de surface

1. Objectifs

Les nanoparticules coeur-couronne SiNP@CS/ALG mises en forme et caractérisées dans le chapitre 2 sont pH-sensibles du fait de la couronne de complexes polyélectrolytes assemblées à base de CS et d'ALG de sodium. Ces propriétés peuvent s'avérer très intéressantes en terme de libération d'actifs contrôlée, comme cela l'a été démontré dans la littérature, avec une encapsulation de Doxorubicin et sa libération en fonction du pH.¹¹⁵ Les études de ces systèmes pH-sensibles ne rapportent cependant pas un auto-assemblage contrôlable sous forme d'un gel colloïdal. Pour répondre à cet objectif, nous proposons la modification de surface des nanoparticules par le greffage en surface du copolymère thermosensible PVAm-*b*-PNIPAM synthétisé et caractérisé dans la Partie 1 (Figure 21).

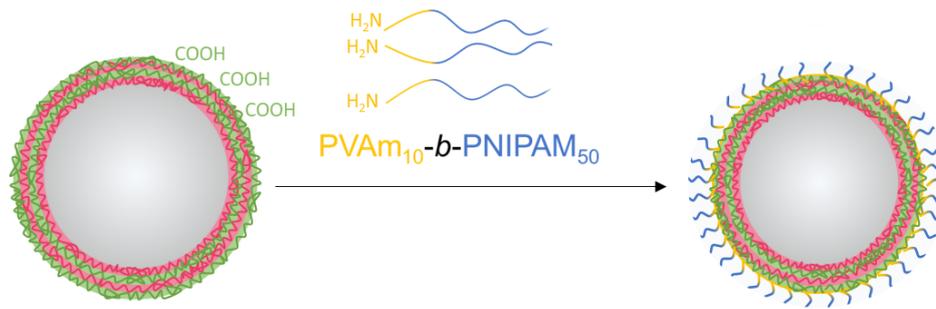


Figure 21 Représentation schématique de la modification de surface des nanoparticules SiNP@CS/ALG avec le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM

L'hypothèse faite est que cette seconde couronne apporte des propriétés thermosensibles aux nanoparticules. En effet, comme cela a été décrit dans la Partie 1 de ce travail de thèse, la famille de copolymères PVAm-*b*-PNIPAM présente des propriétés de LCST du fait du bloc PNIPAM qui les compose. Les nanoparticules fonctionnalisées seraient ainsi porteuses de chaînons latéraux hydrophiles à température ambiante et qui deviennent hydrophobes au-delà de leur température critique. Avec une densité de greffage suffisante et un taux de recouvrement important, une couronne hydrophobe devrait enrober les nanoparticules jusqu'ici hydrophiles et modifier complètement leur comportement en suspension. En effet, en écrantant même partiellement les charges de surface de la couche polyanionique d'ALG, les interactions répulsives électrostatiques seront atténuées. De même, la répulsion stérique liée aux chaînons latéraux mobiles et hydrophiles sera perdue. Ainsi, on peut imaginer que le système colloïdal soit déstabilisé, induisant un rapprochement des nanoparticules entre elles puis des interactions attractives de type hydrophobe comme l'illustre la Figure 22.

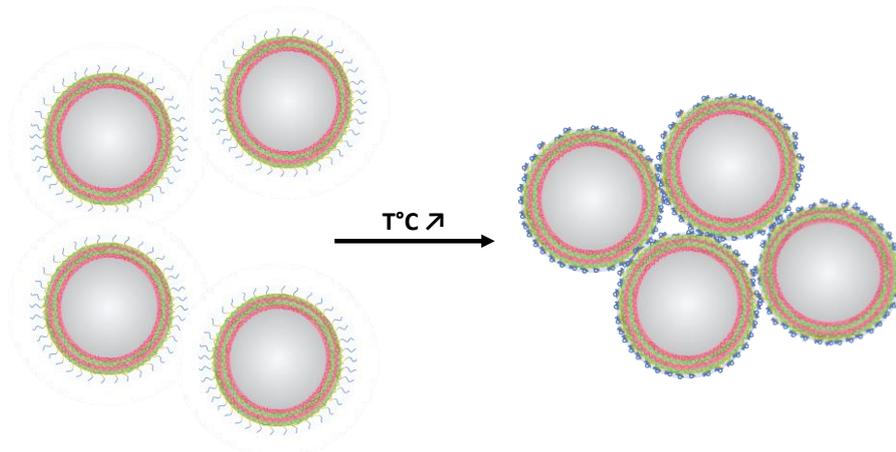


Figure 22 Représentation schématique du mécanisme attendu de floculation induite par la température

L'objectif de ce travail est donc de démontrer un auto-assemblage thermo-induit des nanoparticules par le biais d'interactions hydrophobes issues de la couronne thermosensible à base de PNIPAM.

2. Démarche

Pour répondre à cet objectif, il est important de répondre aux questions suivantes.

Quelle stratégie de modification de surface est la plus adaptée à notre système ?

La modification chimique de nanoparticules regroupe différentes stratégies dont, i) la mise en forme de brosses de polymère par greffage chimique, ii) le revêtement de surface ou encore iii) l'incorporation de groupements fonctionnels. L'incorporation de groupements fonctionnels ne sera pas détaillée ici ; pour illustrer cette stratégie, un exemple courant est la condensation d'organosilanes de type $R_1\text{-Si}(\text{OR}_2)_3$ avec les silanols de surface de nanoparticules de silice.¹¹¹

La mise en forme de brosses de polymères (*polymer brushes*) est souvent décrite dans la littérature pour modifier les propriétés d'une interface. Par définition, il s'agit d'une fine couche de polymère dont les chaînes sont ancrées par une de leurs extrémités sur une surface.¹³⁵ Les deux stratégies principales de synthèse de brosses de polymères sont le *grafting to* et le *grafting from* (Figure 23).

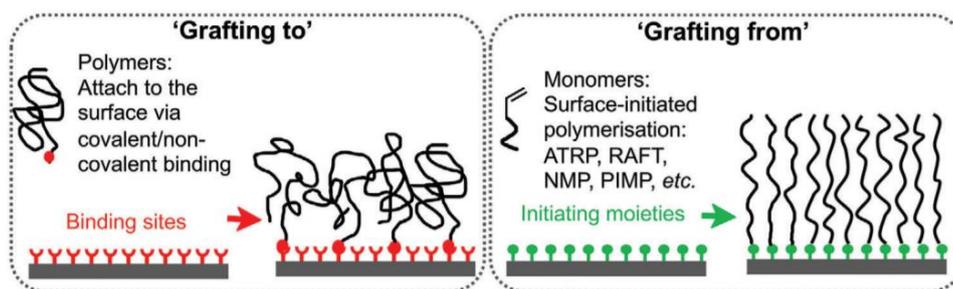


Figure 23 Illustration des mécanismes de *grafting to* et *grafting from* pour la synthèse de brosses de polymères sur un substrat. Reproduit de Li et al.¹³⁵

Le *grafting to* consiste à attacher à la surface un polymère préalablement synthétisé par l'un de ses bouts de chaîne ou par des fonctions latérales, de manière covalente ou par adsorption physique. L'un des avantages du *grafting to* est que le polymère est synthétisé avec le contrôle du bout de chaîne et caractérisé en solution de manière conventionnelle (RMN, SEC, etc). Cependant, le *grafting to* ne permet pas d'obtenir une couche dense de brosses du fait de la répulsion stérique des chaînes et de l'efficacité de la réaction entre le bout de chaîne et la surface qui diminue généralement avec la masse du polymère.¹³⁶

Dans le cas du *grafting from*, la surface est fonctionnalisée avec un amorceur de polymérisation, à partir duquel la croissance des chaînes sera initiée lors de l'ajout du monomère. Les procédés de polymérisation radicalaire par désactivation réversible, comme la RAFT et l'ATRP, sont souvent utilisés pour ces polymérisations.^{137,138} Le *grafting from* permet l'obtention de brosses denses et un haut taux de greffage.

De nombreux travaux rapportent la synthèse de brosses stimuli-répondantes pour former des interfaces intelligentes et aux propriétés contrôlables.¹³⁵ Typiquement, des polymères à base de PNIPAM sont souvent utilisés pour fonctionnaliser des nanomatériaux et créer une interface thermorépondante.¹³⁹ Par exemple, Chung *et al.* ont proposé la synthèse de nanoparticules de silice mésoporeuses (MSiNPs) avec des brosses de PNIPAM en surface synthétisées par SI-RAFT (*surface-initiated* RAFT) (Figure 24).¹⁴⁰

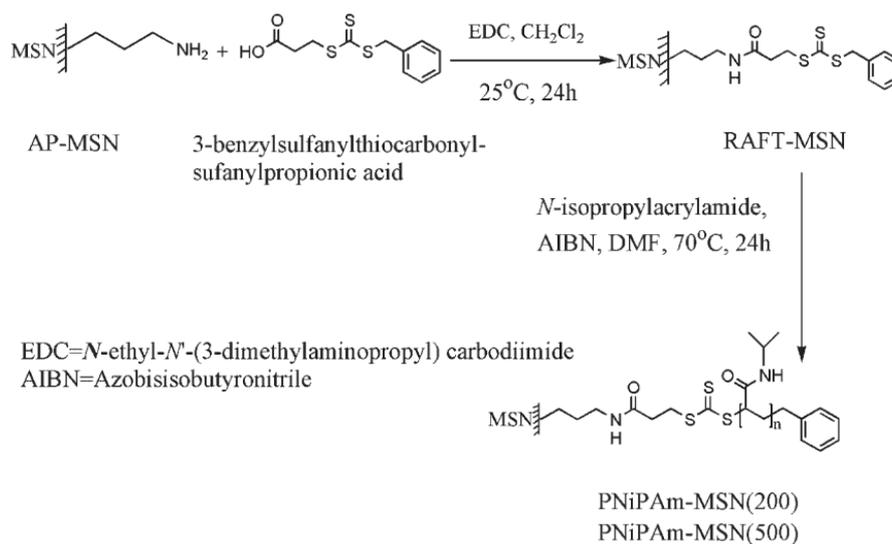


Figure 24 Synthèse de nanoparticules de silice mésoporeuses modifiées en surface par *grafting from* de brosses de PNIPAM. Reproduit de Chung *et al.*¹⁴⁰

Les MSiNPs ont été préalablement modifiées en surface par un agent RAFT, après quoi elles ont été utilisées comme macro-CTA de la polymérisation du NIPAM en présence de l'amorceur thermique AIBN.

Des chaînes de PNIPAM ont également été utilisées pour la modification de nanoparticules d'or par *grafting to*. Zhu *et al* ont notamment décrit la polymérisation RAFT du NIPAM en présence d'un CTA de type dithioester.¹⁴¹ Après la polymérisation, le bout de chaîne dithioester est réduit en thiol afin de permettre le *grafting to* sur la surface d'or.

Ce bref état de l'art sur les techniques de *grafting to* et *grafting from* a permis de comprendre les avantages des deux stratégies. De toute évidence, le *grafting to* s'avère la solution de choix puisqu'il paraît contre-productif de transposer la polymérisation du dibloc, ainsi que les étapes de post-polymérisation, à une chimie de *grafting from*. Les nanoparticules coeur-couronne seront donc modifiées par *grafting to*.

Quelle chimie de couplage permet un *grafting to* efficace ?

Les nanoparticules sont composées en surface d'une couche d'ALG de sodium qui présente donc des fonctions acides carboxyliques. Le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM est un candidat idéal

pour un couplage peptique (amidification) via son bloc poly(vinyl amine). L'amidification est la réaction entre un acide carboxylique et une amine menant à la formation d'un amide. C'est une réaction de condensation, thermodynamiquement défavorable et dont le produit majoritaire est le sel $R_1\text{-COO}^- - \text{NH}_3^+\text{-R}_2$ lorsqu'elle n'est pas catalysée par des agents de couplage. Les agents de couplage fréquemment utilisés pour cette réaction sont le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) et le couple NHS/EDC.

Le CDI a souvent été rapporté dans la littérature pour la fonctionnalisation de polysaccharides.^{142,143} Son mécanisme d'action est simple et ses sous-produits non-toxiques en font un candidat idéal. Cependant, il présente une faible sélectivité puisqu'il peut coupler différentes fonctions : $-\text{COOH}$ sur $-\text{NH}_2$ (amidification), $-\text{NH}_2$ sur $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ sur $-\text{NH}_2$.

Dans notre système, la réticulation des amines de la PVAm sur elle-même est un risque important puisqu'elle pourrait conduire à la réticulation de micelles de diblocs avec un cœur PVAm réticulé. Par ailleurs, le CDI et son intermédiaire ester d'imidazole ne sont pas stables dans l'eau et s'hydrolysent rapidement, ce qui nécessite de travailler en milieu organique anhydre, sous atmosphère contrôlée. Ce dernier point contraignant d'un point de vue pratique, associé à la non-sélectivité de la réaction, constituent deux éléments dissuasifs dans le choix de cet agent de couplage.

Le couple d'agents NHS/EDC, est tout comme le CDI, très utilisé pour catalyser des réactions d'amidification. De nombreux exemples dans la littérature décrivent son utilisation, d'autant plus dans le domaine des biomatériaux puisque ce procédé est considéré comme non-toxique.^{144,145} La réaction peut avoir lieu en milieu organique ou aqueux, à température ambiante ; le mécanisme est représenté ci-dessous (Figure 25) :

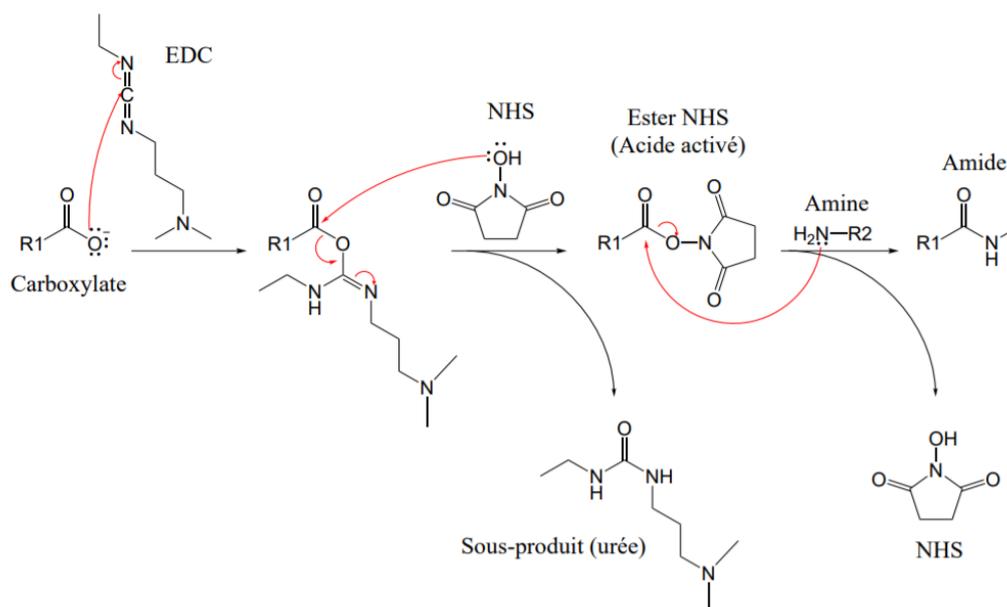


Figure 25 Schéma réactionnel du couplage NHS/EDC. Reproduit de la thèse de G. Conzzatti¹⁴⁶

Le seul sous-produit dérivant de cette réaction d'amidification est non-toxique, d'où l'utilisation fréquente de ces agents de couplage pour des biomatériaux.

Le choix du solvant est également crucial dans notre étude. En effet, un milieu aqueux à pH supérieur au pKa permet un état de surface des particules chargé négativement et répulsif et donc, a priori, une meilleure stabilité. De plus, on peut imaginer lier par le biais d'interactions électrostatiques entre la PVAm chargée positivement et les carboxylates de l'ALG le copolymère qui n'aurait pas été greffé de manière covalente à la surface des particules, et donc renforcer le recouvrement de la couche thermosensible. En revanche, l'étude physico-chimique de la partie 1 a démontré que le copolymère s'auto-assemble de manière spontanée à température ambiante lorsqu'il est en solution dans l'eau. Il est difficile de prédire en terme d'interactions et de thermodynamique si des objets de types micelles de diblocs double-hydrophiles pourraient se déconstruire en faveur d'une réaction à la surface des nanoparticules. Pour optimiser le rendement du couplage EDC/NHS dans l'eau, des études ont montré que le pH du milieu doit être supérieur au pKa de l'acide, dans notre cas l'ALG de sodium (pKa 3-4), car le carboxylate est plus réactif que sa forme conjuguée.¹⁴⁷ L'étude physico-chimique ayant montré que le copolymère est d'autant plus susceptible de s'auto-assembler spontanément que la poly(vinyl amine) est chargée, il paraît judicieux de se placer à un pH intermédiaire, proche de son pKa (i.e 7.5) afin que le bloc aminé ne soit pas entièrement protoné mais qu'il conserve une certaine fraction chargée. L'alternative serait d'effectuer la réaction d'amidification en milieu organique. Le DMSO est un candidat intéressant puisqu'il est non-gonflant des hydrogels de PEC à base de CS et d'ALG. Cela

assurera ainsi une modification de surface uniquement, sans risquer que le copolymère pénètre la couronne de biopolymères.

En résumé, pour réussir le *grafting to* par couplage peptidique du copolymère thermosensible à la surface des nanoparticules SiNP@CS/ALG, le choix de l'agent de couplage, du solvant sont primordiaux, et par la suite, les conditions expérimentales optimales devront être déterminées. Cette réflexion s'est appuyée sur les travaux de thèse de G. Conzatti (CIRIMAT, 2017)¹⁴⁶ qui ont porté sur l'optimisation des conditions de réaction entre un PNIPAM terminé par une fonction NH₂ et des films d'ALG de sodium, ce qui en fait un système très similaire au notre en terme de fonctionnalité. Ces résultats de modification de surface de films seront transposés à la modification de surface de nanoparticules sans optimisation supplémentaire des conditions expérimentales. Le greffage sera ainsi étudié dans l'eau à pH d'environ 7, et dans le DMSO. Les équivalents molaires d'agents de couplage par rapport aux fonctions acides sont déterminées d'après la thèse de G. Conzatti et sont les suivants : COOH 1 : EDC 4 : NHS 2.¹⁴⁶

Enfin, le paramètre manquant est la quantité de copolymère que l'on souhaite incorporer au milieu réactionnel. Pour cela, il s'agit de déterminer quelle quantité de copolymère la surface des nanoparticules peut accueillir, en prenant en compte les différents paramètres que sont la taille des particules et la masse molaire du copolymère.

Quelle densité de greffage peut-on espérer ?

Dans un système de *grafting to* la densité de greffage sera relativement faible. Un taux de greffage théorique maximal a été estimé selon le raisonnement suivant :

on considère que les particules sont sphériques de surface $S_{par} = 4\pi R_{particules}^2$ et que le copolymère est sous forme de pelote statistique en régime dilué, supposées sphériques de rayon de gyration R_g et dont l'aire projetée sur la surface des particules représente $A_{copo} = 4\pi R_g^2$. La première hypothèse faite est que, dans ces conditions de *grafting to*, la densité de greffage est basse car il n'y a pas de contrainte stérique. Les pelotes peuvent recouvrir la surface à l'image d'un modèle compact (Figure 26).

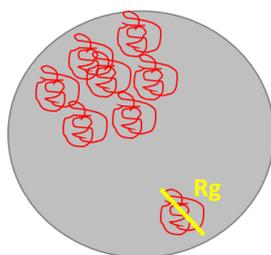


Figure 26 Représentation schématique d'une particule sphérique et du recouvrement "compact" des pelotes de polymère à sa surface. La pelote est caractérisée par son rayon de gyration R_g

On peut alors déterminer le nombre de moles de pelotes que l'on peut déposer à la surface des particules tel que : $n_{copo/par} = \frac{S_{par}}{A_{copo} \cdot \mathcal{N}_A}$ en mol/particules.

Calculons ensuite $m_{1par} = d_{par} \cdot V_{par}$ la masse d'une particule connue à partir de la densité des particules coeur-couronne et leur volume. On fait l'hypothèse que la composition des particules est de 5 %_m d'hydrogel pour 95 %_m de silice et donc qu'on peut approximer la densité des particules à celles de la silice soit $d_{par} \sim d_{SiNP}$.

Le volume des particules est donné par la relation $V_{par} = \frac{4}{3} \pi R_{particules}^3$. Ainsi, le nombre de particules présentes dans 1 mg tel que $N_{par/1mg} = \frac{1 \text{ mg}}{m_{1par}}$.

Dans 1 mg de particules, sur chacune des $N_{par/1mg}$ particules peuvent être greffées $n_{copo/par}$ moles de copolymères, d'où le nombre de moles de copolymères que l'on peut greffer sur 1 mg de particules : $n_{copo/1mg} = N_{par/1mg} \cdot n_{copo/par}$ [dimensions : $\frac{\text{particules}}{\text{mg}} \times \frac{\text{mol}}{\text{particules}}$].

On obtient alors la masse de copolymère $m_{copo/1mg}$ que représente $n_{copo/1mg}$ en multipliant par la masse molaire. Le ratio massique copolymère/particules est finalement calculé tel que $\%_m \text{ copo/par} = \frac{m_{copo/par}}{m_{par}}$.

A l'issue de cette estimation, le ratio de copolymère apporté aux nanoparticules sera compris entre 0.5 et 5 %_m, il sera désigné *feed weight ratio (fwr)* par la suite afin d'éviter la confusion avec le ratio de copolymère effectivement greffé qui sera déterminé expérimentalement.

3. Mise en place du protocole expérimental de greffage

Le protocole expérimental de greffage a été mis au point dans la continuité de la mise en forme des nanoparticules coeur-couronne SiNP@CS/ALG. En effet, à l'issue du dernier lavage dans l'eau des nanoparticules SiNP@CS/ALG, celles-ci ont été redispersées soigneusement et suspendues à une concentration de 5 mg/mL dans l'eau ou le DMSO. Pour les suspensions aqueuses, le pH a été mesuré, sa valeur étant proche de 7 (typiquement 6,5 – 6,8), celui-ci n'a pas été réajusté. Des solutions d'EDC et NHS ont été préparées uniquement dans le DMSO à 10 mg/mL pour les réactions d'amidifications dans le DMSO mais également dans l'eau. La solution d'EDC puis celle de NHS ont été ajoutées au milieu, sous agitation et à température ambiante, avant d'ajouter la solution de copolymère PVAm-*b*-PNIPAM dans l'eau ou dans le DMSO à 1 mg/mL (volume prélevé adapté selon le ratio massique polymère/particules choisi). La suspension est maintenue sous agitation pendant 24 h, après quoi les nanoparticules sont isolées par centrifugation et lavées deux fois à l'eau. Bien que ce protocole comporte plusieurs éléments qui auraient pu être optimisés, comme le temps de réaction, le seul paramètre ayant été modifié à ce jour dans cette étude est le *fwr*.

4. Stratégie de caractérisation

Si la mise en place du protocole de greffage paraît simple, la stratégie de caractérisation pour mettre en évidence le greffage est, quant à elle, bien moins évidente. Les nanoparticules thermosensibles présentent des contraintes qui limitent les techniques permettant de démontrer que le copolymère est effectivement accroché à la surface. Toutes les fonctions chimiques présentes dans la structure du copolymère PVAm-*b*-PNIPAM le sont également dans la structure de l'ALG de sodium et/ou du CS (Schéma 4).

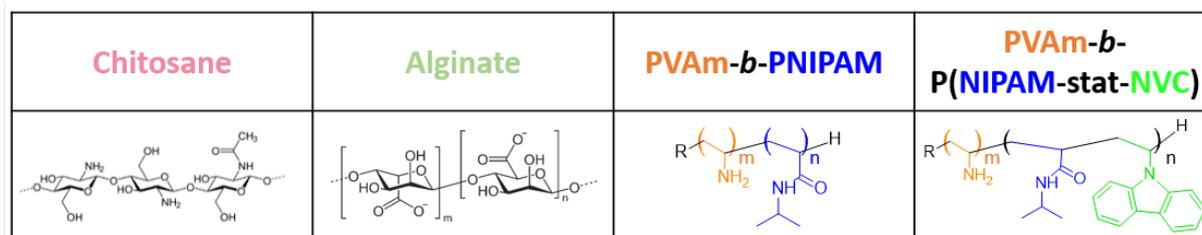


Schéma 4 Rappel des structures chimiques des polysaccharides CS et ALG, et des copolymères PVAm-*b*-PNIPAM et PVAm-*b*-P(NIPAM-*stat*-NVC)

Le second inconvénient est le faible ratio de copolymère par rapport aux particules (au maximum 5%_m si rendement total). Enfin, le rapport de taille entre le diamètre des nanoparticules et la longueur de chaîne du copolymère ne permet pas d'attendre une variation de taille significative et caractérisable. Le Tableau 8 ci-dessous résume quelles techniques usuelles de caractérisation n'ont pas pu faire partie de notre stratégie du fait de ces trois critères :

Tableau 8 Résumé des techniques de caractérisations non utilisées en fonction des paramètres les excluant

Natures chimiques identiques	Ratio _{wt} insuffisant	Rapport de taille négligeable
- IRTF - Raman	- ATG - DSC - IRTF/Raman	- DLS - MET

Parmi les solutions trouvées, la RMN HRMAS, utilisée pour les échantillons hétérogènes comme les suspensions, ainsi que la RMN Bas champ ont été exploitées pour confirmer la présence de copolymère à la surface des particules ainsi que le *fwr* optimal. L'analyse par XPS des nanoparticules a également permis une étude sur la nature des interactions entre les particules et le copolymère. Enfin, la modification des nanoparticules avec le copolymère thermosensible fluorescent a ouvert la voie à des techniques de luminescence comme la spectrofluorimétrie à partir de laquelle l'étude de quantification a été menée.

5. Nomenclature des particules dans le Chapitre 2

Pour alléger la désignation des particules SiNP@CS/ALG modifiées en surface par les copolymères PVAm-*b*-PNIPAM et PVAm-*b*-P(NIPAM-*stat*-NVC), la nomenclature suivante sera utilisée dans ce Chapitre :

Tableau 9 Nomenclature des particules dans le Chapitre 2

NPNG	NPs non greffées c'est-à-dire les SiNP@CS/ALG mises en forme dans le Chapitre 2
NPG	NPs greffées, soient les SiNP@CS/ALG modifiées en surface par le copolymère PVAm- <i>b</i> -PNIPAM
NPG Cov H ₂ O NPG Cov DMSO	SiNP@CS/ALG modifiées en surface par le copolymère PVAm- <i>b</i> -PNIPAM en présence des agents de couplage NHS/EDC dans l'eau ou dans le DMSO
NPG Ion H ₂ O NPG Ion DMSO	SiNP@CS/ALG modifiées en surface par le copolymère PVAm- <i>b</i> -PNIPAM sans agents de couplage NHS/EDC dans l'eau ou dans le DMSO
NPGF	NPs greffées fluorescentes, soient les SiNP@CS/ALG modifiées en surface par le copolymère PVAm- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>stat</i> -NVC) Déclinées en Cov et Ion également

3. Modification de surface des SiNP@CS/ALG et caractérisation du greffage

1. Fonctionnalisation de l'ALG en solution par le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM

Comme mentionné précédemment, la chimie de couplage peptique avec les agents de couplage NHS/EDC est couramment utilisée dans le domaine des biomatériaux. Avant de s'attaquer à la modification de surface des particules via le couplage peptidique, nous avons souhaité vérifier que la réaction d'amidification fonctionne effectivement en simplifiant le système d'étude, c'est à dire entre l'ALG et le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM en solution. La réaction a été réalisée dans l'eau uniquement du fait de la non-solubilité de l'ALG dans le DMSO. La solution d'ALG à 10 mg/mL a été solubilisée dans l'eau pendant 4 h, après quoi le NHS, puis l'EDC ont été ajoutés. Enfin le copolymère a été ajouté et la réaction a été maintenue à température ambiante pendant 24 h. A l'issue de ces 24 h, la solution d'ALG modifié a été dialysée contre l'eau osmosée pendant 3 jours en changeant l'eau 3 fois par jour. Après la dialyse, le copolymère a été récupéré par lyophilisation et caractérisé par RMN ¹H. La RMN ¹H a révélé la présence des agents de couplage NHS/EDC avec notre composé, masquant totalement les signaux de l'ALG. Une seconde dialyse a donc été réalisée cette fois contre un milieu salin de NaCl à 10⁻¹ M pendant 3 jours, suivi de 2 jours dans l'eau, en changeant à nouveau le milieu plusieurs fois par jour. Les polymères ont

été récupérés par lyophilisation et à nouveau caractérisés par RMN. Le spectre d'ALG modifié, noté *ALG-g-copo*, a été comparé aux spectres RMN de l'ALG en solution et d'une solution d'un mélange ALG et copolymère dans les mêmes proportions que celles du greffage mais sans agents de couplage (Figure 27). Ce dernier échantillon permet d'avoir une référence d'un mélange intime des deux espèces.

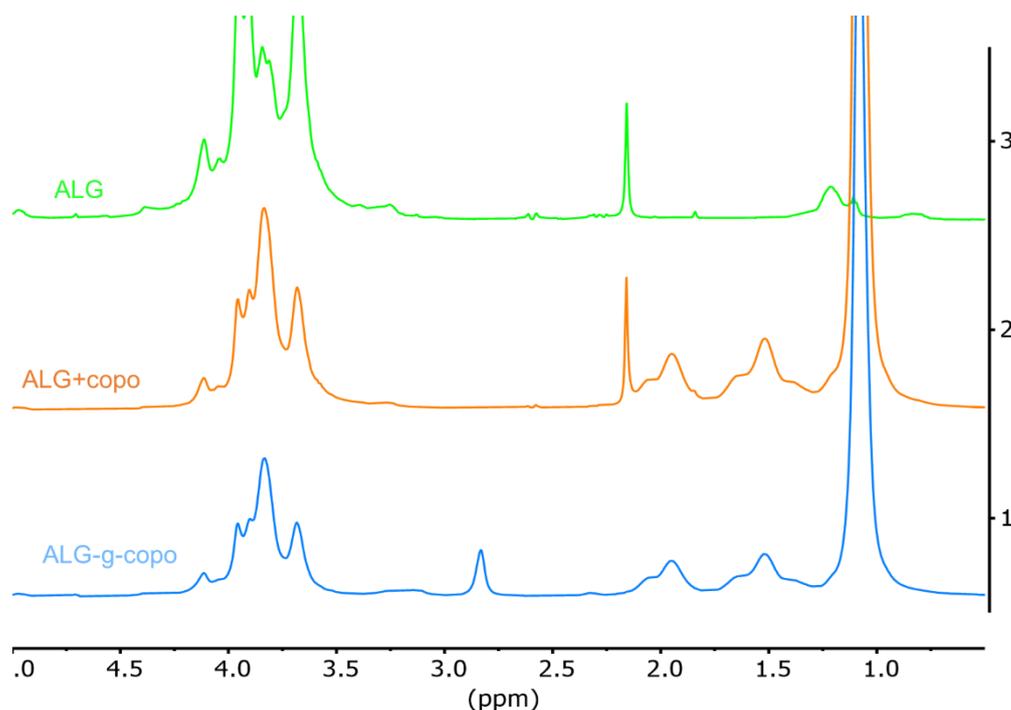


Figure 27: Spectres RMN ^1H à 400 MHz des échantillons dans le D_2O 1) d'ALG greffé en solution avec le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM, 2) d'ALG uniquement mélangé en solution avec le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM, 3) d'ALG en solution

Sur chacun des spectres, les protons du squelette polysaccharide sont bien identifiables entre 3,6 et 4,3 ppm. Le pic fin observé à 2,1 ppm sur les spectres où l'ALG n'a pas été purifié (3 et 2) disparaît sur les spectres de l'échantillon 1 qui a été dialysé, ce qui suggère fortement qu'il s'agit d'une impureté contenue dans l'ALG de sodium. Sur les spectres 1 et 2, on reconnaît facilement les signaux caractéristiques du copolymère PVAm-*b*-PNIPAM avec, à 1 ppm, le signal attribué aux protons $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ de l'isopropyle du PNIPAM, et entre 1,3 et 2,3 ppm, les protons du squelette du copolymère. La principale différence observée entre le mélange intime *ALG+copo* et l'échantillon *ALG-g-copo* est le pic large à 2,86 ppm. Ce signal pourrait être attribué à des protons dont l'environnement chimique a été modifié par l'amidification et qui auraient été déblindés. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons fait une simulation du spectre ^1H théorique pour une macromolécule composée d'un sucre et des quelques unités de PVAm et de PNIPAM, le tout relié par une fonction amide. Cette simulation n'a pas permis d'identifier la nature de ce proton.

2. Mise en évidence de la présence de copolymère à la surface des particules

Après avoir la confirmation que la réaction d'amidification est maîtrisée en solution, nous avons réalisé des premiers essais de greffage sur les suspensions de particules coeur-couronne. Dans un premier temps, seul le greffage du copolymère PVAm-*b*-PNIPAM a été réalisé, dans le DMSO et à un *fwr* de 1%_m suite au calcul théorique de greffage maximal. La réaction d'amidification a été réalisée en présence NHS/EDC dans les proportions molaires 1 eq COOH : 2eq NHS : 4 eq EDC. L'équivalent molaire de fonctions COOH en surface a été estimé (surestimé) par rapport à la masse d'ALG que représenterait la dernière couche dans l'assemblage LbL des nanoparticules SiNP@CS/ALG si la totalité de l'ALG dans la solution d'imprégnation avait été adsorbé sur la couche CS2, c'est-à-dire 10%_m.

A l'issue des 24 h de réaction à température ambiante, les nanoparticules sont isolées et lavées à l'eau deux fois par centrifugation. Les NPs ont ensuite été lyophilisées afin d'éliminer toute l'eau absorbée par la couronne d'hydrogel.

La première confirmation de greffage réussi a été apportée par RMN HRMAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*). Cette technique de RMN est particulièrement adaptée aux échantillons hétérogènes comme les suspensions concentrées. Les suspensions de NPs greffées (NPG) et NPs nues (NPNG) ont été préparées dans un faible volume de D₂O.

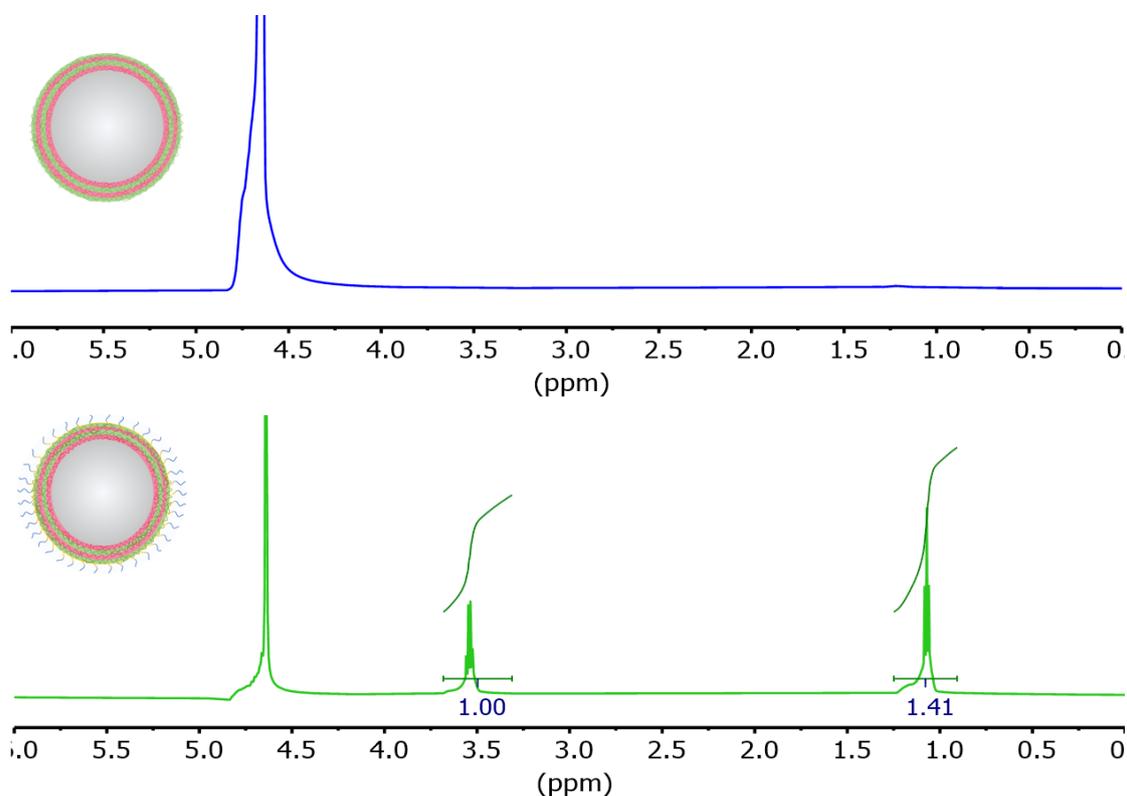


Figure 28 Spectres de RMN HRMAS dans le D₂O des nanoparticules non greffées (NPNG) en haut, et des nanoparticules greffées de manière covalente dans le DMSO (NPG cov DMSO) en bas, le pic à 4.79 ppm est celui de l'eau résiduelle

Les spectres présentés en Figure 28 des NPs de référence non-gréffées (NPNG) et des NPs greffées (NPG Cov DMSO) présentent, à l'exception du pic de solvant résiduel, des différences clairement visibles. En effet, seul le spectre des NPs greffées présente des signaux, ceux-ci sont identifiés par comparaison avec le spectre RMN ^1H du copolymère dans le D_2O . A 1 ppm se trouve le signal caractéristique des protons $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ de l'isopropyle du PNIPAM, à 3.6 ppm le proton $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ du PNIPAM également. Ces deux signaux caractéristiques du PNIPAM nous confirment donc la présence du copolymère en surface des particules. L'absence des autres signaux du copolymère, notamment ceux du squelette carboné, peut s'expliquer par une moindre mobilité de ces protons, contrairement à ceux des chaînons pendants d'acrylamide. Ce manque de mobilité résulte en des signaux très larges à l'image de la RMN du solide, qui se confondent avec la ligne de base et ne les rend pas observables. De même, les protons de l'ALG de sodium ne sont pas distinguables, que ce soit sur les particules de référence ou les particules greffées, probablement du fait d'un manque de mobilité des chaînes d'ALG adsorbées à la surface des particules.

Ces premiers résultats sont encourageants puisqu'ils tendent à montrer que le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM est effectivement à la surface des nanoparticules à l'issue de leur modification de surface. Il serait maintenant intéressant d'estimer un *fwr* optimal de manière expérimentale.

3. Détermination du ratio optimal de greffage

Dans le but d'optimiser la quantité de copolymère utilisée pour la modification de surface, une détermination du *fwr* optimal est proposée par deux techniques de caractérisations, la relaxométrie T2 (ou RMN Bas champ) et la zétamétrie. La relaxométrie T2 permet une mesure indirecte de la surface de nanoparticules via la relation suivante $\frac{1}{T_2} = S \cdot ka \cdot \phi_p + \frac{1}{T_b}$ où T_2 est le temps de relaxation transverse, S la surface, ka le coefficient de relaxivité, ϕ_p la fraction volumique en particules et T_b le temps de relaxation du solvant. Les mesures de relaxation T2 sont basées sur la différence de relaxation d'un liquide à une interface solide (valeurs de T2 faibles) et ce même liquide en solution (valeurs de T2 importantes). Dans le système des nanoparticules greffées et non greffées, de faibles T2 sont attendues lorsque les particules sont greffées puisque la surface est encombrée stériquement donc l'eau peut plus difficilement interagir avec la surface. La comparaison des nanoparticules greffées et non greffées se fait via le quotient $S \cdot Ka$. En réalité, c'est la variation de Ka qui importe ; mais la surface n'étant pas déterminée, et dans l'hypothèse où elle reste constante au cours du greffage, on peut étudier $S \cdot Ka$. Pour déterminer $S \cdot Ka$, les valeurs T2 de suspensions de nanoparticules greffées à différents *fwr* entre 0.5 et 5 %_m ont été mesurées et tracées selon la relation linéaire précédemment explicitée, afin d'en extraire la pente. Les $S \cdot Ka$ ainsi déterminés ont ensuite été normalisés par le $S \cdot Ka$ des nanoparticules non greffées de référence et représentés en fonction du *fwr* (Figure 29).

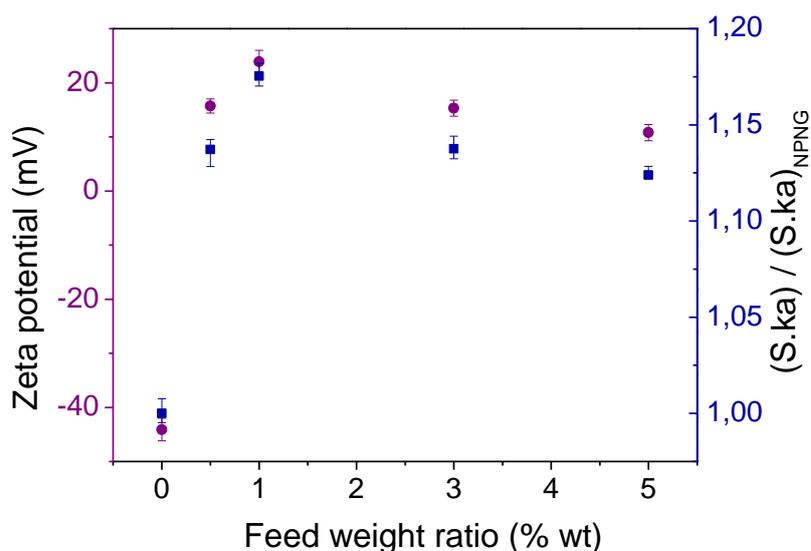


Figure 29 Valeurs de potentiels- ζ (●) et de ratios $S.Ka$ (■) normalisés en fonction du fwr en copolymère PVAm-b-PNIPAM

La Figure 29 montre ainsi l'évolution de $S.Ka$ lorsque le fwr augmente. $S.Ka$ augmente lors du greffage et jusqu'à un fwr de 1%, après quoi sa valeur tend à diminuer légèrement. En parallèle, des mesures de potentiels- ζ ont été réalisées sur ces échantillons, elles sont représentées en Figure 29. On remarque alors un profil d'évolution des potentiels- ζ très ressemblant à celui des $S.Ka$, avec le même optimum pour un fwr de 1% qui semble donc être la condition de greffage idéale. En effet, à un fwr de 1%_m, la surface des nanoparticules est la plus modifiée et celle qui présente la charge de surface la plus grande, donc qui porte le plus de copolymère (pas de variation de pH).

4. Quantification du greffage à la surface des particules

Après avoir optimisé le fwr dans le procédé de greffage, une quantification du copolymère effectivement greffé en surface a été réalisée par spectrofluorimétrie. Pour cela, le greffage des nanoparticules avec le copolymère fluorescent a été réalisé selon le procédé décrit précédemment, à un fwr de 1%_m. Le copolymère fluorescent a été caractérisé par spectrofluorimétrie à la longueur d'onde d'excitation du monomère N-vinyl carbazole (NVC) qui est de 325 nm (Figure 30).

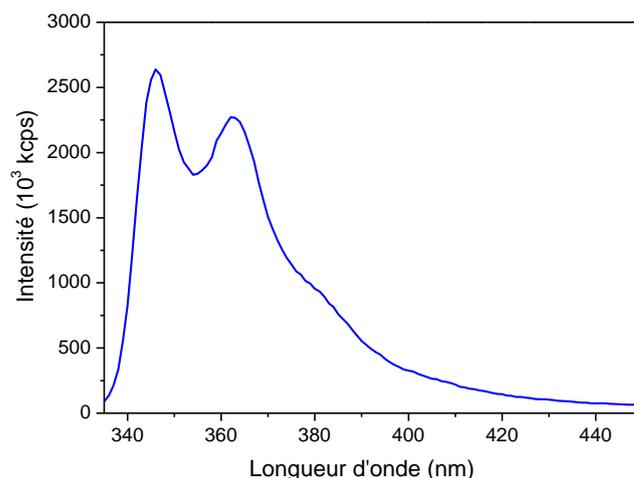


Figure 30 Spectre d'émission du copolymère PVAm-b-P(NIPAM-stat-NVC) à 0.5 mg/mL dans l'eau après une excitation à 325 nm

Son spectre est singulier et présente deux bandes d'émission à 346 nm et 365 nm, ce qui a été décrit dans la littérature par Suchao-in *et al.*¹⁴⁸ Ces deux bandes d'émission sont proches de celles du NVC (370 nm et 420 nm) et confirment que la fluorescence du vinyl carbozole est maintenue lors de sa copolymérisation.¹⁴⁹

Dans un premier temps, une droite d'étalonnage a été tracée en mesurant l'intensité à 346 nm (normalisée par l'intensité de la ligne de base à 435 nm) de solutions à différentes concentrations entre 0 et 10 µg/mL de copolymère fluorescent (Figure 31a).

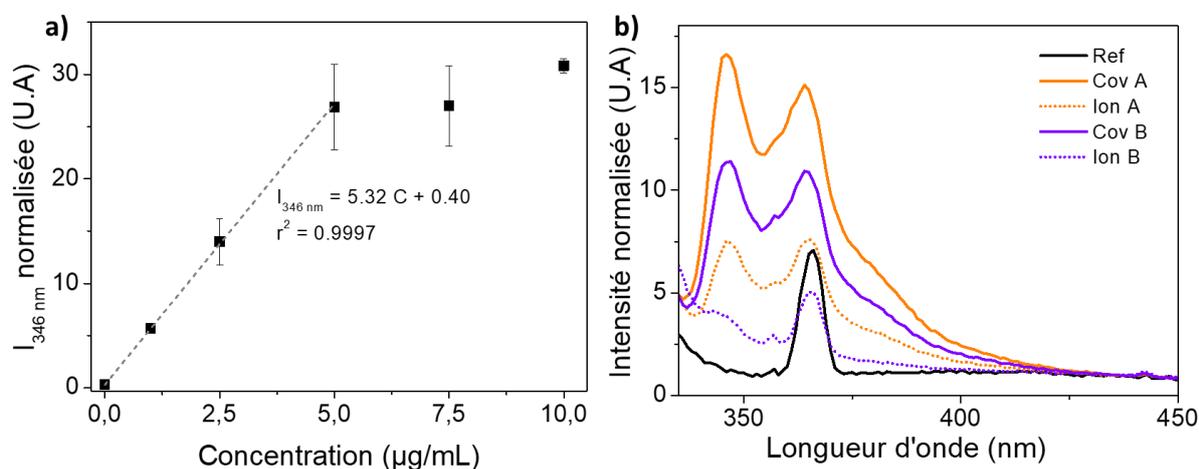


Figure 31 a) Droite d'étalonnage de l'intensité émise à 346 nm après excitation à 325 nm des solutions de copolymère PVAm-b-P(NIPAM-stat-NVC) à des concentrations entre 0 et 10 µg/mL b) Spectres d'émission normalisés à 435 nm acquis après excitation à 325 nm des échantillons de particules NPGF à 0,5 mg/mL dans l'eau par rapport à la référence (NPG)

La calibration a mis en évidence un phénomène de quenching de la fluorescence au-delà de 5 µg/mL ce qui limite la gamme de linéarité de 0 à 27 U.A de l'intensité normalisée. La relation sur cette gamme est la suivante : $I_{346nm} = 5.32 C + 0.40$. Les échantillons d'intérêt ont ensuite été excités

dans les mêmes conditions à 325 nm et leur signal d'intensité de fluorescence émise a été normalisé à 435 nm également (Figure 31b).

L'échantillon de référence (NPG) est une suspension de nanoparticules à 0,5 mg/mL modifiées en surface par le copolymère thermorépondant non-fluorescent. Il présente une bande unique à 366 nm qui est attribué à la diffusion Raman de l'eau.¹⁵⁰ Les nanoparticules greffées avec le copolymère fluorescent ont au contraire la même double bande d'émission caractéristique que le copolymère seul en solution, ce qui confirme à la fois sa présence en surface des particules et la conservation de sa luminescence après greffage. Les concentrations de copolymère fluorescent greffé ont été calculées par la relation linéaire entre l'intensité à 346 nm et la concentration préalablement déterminée. A partir de la concentration en copolymère des particules, et en connaissant la concentration en particules des échantillons (0,5 mg/mL), le ratio massique polymère/particules a été calculé. Les résultats de la quantification sont présentés dans le Tableau 10 ci-dessous :

Tableau 10 Quantification du taux de copolymère effectivement détecté à la surface des particules greffées

	I 346 nm (A.U)	C copo (µg/mL)	r copo/par (%_m)
NPG	1,2666	0,16	0,03
NPGF Cov H2O	16,6042	3,04	0,61
NPGF Ion H2O	7,5446	1,34	0,27
NPGF Cov DMSO	11,3959	2,06	0,41
NPGF Ion DMSO	3,8917	0,65	0,13

Les échantillons de particules greffées de manière covalente dans l'eau et dans le DMSO contiennent, d'après cette quantification, respectivement 0,6 et 0,4 %_m de copolymère dans le composite. En termes de rendement de greffage, le *fwr* étant de 1%_m, on peut dire que 60 % dans l'eau et 40 % dans le DMSO du copolymère initialement apporté au système a été greffé à la surface des nanoparticules.

Concernant les particules modifiées sans agents de couplage, et donc par adsorption électrostatique, un ratio de 0,3% a été déterminé pour la modification dans l'eau, soit deux fois moins que le greffage covalent dans l'eau. Cela peut s'expliquer par le fait que l'échantillon NPGF Cov H₂O cumule à la fois la modification covalente et l'adsorption électrostatique qui doit se produire spontanément en parallèle. Enfin, l'échantillon modifié dans le DMSO sans les agents de couplage ne présente que 0,1 % de copolymère en surface des particules, ce qui est cohérent puisque le DMSO est un solvant aprotique où l'adsorption électrostatique n'existe pas. La faible

quantité de polymère mise en évidence dans ces conditions pourrait être liée à la surface par des liaisons hydrogène entre le copolymère et les polysaccharides.

Pour conclure, la quantification par spectrofluorimétrie a permis d'estimer à 0.6%_m le meilleur ratio de polymère greffé sur les particules, et ce en présence d'agents de couplage NHS/EDC dans l'eau.

5. Investigation de la nature de l'interaction entre le copolymère et les particules par XPS

L'une des problématiques du système composite étudié est la ressemblance des composantes en termes de nature chimiques. En effet, le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM présente les mêmes fonctions chimiques que celles du CS et de l'ALG sur lesquels il est greffé. L'XPS reste cependant une technique intéressante pour caractériser ces objets car elle permet de déterminer à la fois les pourcentages atomiques des éléments à la surface du matériau, et d'identifier plus précisément quels environnements chimiques sont présents et en quelles proportions. Dans cette étude XPS, nous proposons d'investiguer la nature des interactions entre le copolymère et les particules en fonction des conditions opératoires du greffage : avec ou sans agent de couplage et milieu aqueux ou organique. Avant cela, une question se pose : est-ce que les couches successives de pSac déposées par LbL vont modifier la détection de la surface de SiNP ?

En effet, dans ce système multicouches, deux phénomènes entrent en jeu parallèlement. La modification de surface, que ce soit par l'hydrogel puis par le copolymère, entraîne des modifications des environnements chimiques, avec des fonctions qui disparaissent (ex : -COOH de l'ALG) et d'autres qui sont formées (ex : amides issus du couplage peptidique). En parallèle, dans le cas du LbL sur des particules, chaque couche déposée sur la précédente écrante la matière la plus proche du cœur des particules. L'XPS est une technique de caractère dite d'extrême surface, où l'épaisseur étudiée est d'une dizaine de nanomètres. Plus la surface des particules de silice est recouverte de couches de matière, moins les photoélectrons émis par la silice vont pouvoir diffuser à travers la couronne de polymère et être détectés par le détecteur. Ainsi, l'écrantage de certains atomes et la diminution de certaines contributions peuvent apporter des informations car ils traduisent une augmentation de l'épaisseur déposée en surface.

1) Peut-on mettre en évidence les multicouches de pSac sur la surface des SiNPs ?

Pour répondre à cette question, trois échantillons ont été analysés et sont comparés :

Tableau 11 Rappel de la nomenclature et de la composition des échantillons étudiés dans la partie 5.1

Nom	SiNP	SiNP@CS1	NPNG
Composition	SiNPs nues	SiNPs recouvertes uniquement de la première couche de CS CS1	SiNPs recouvertes des deux bicouches CS/ALG

Les compositions atomiques déterminées sur ces échantillons sont présentées dans le Tableau 12 :

Tableau 12 Compositions atomiques en Si, C, N, O déterminées par XPS

% _{at}	Si	C	N	O
SiNP	24,43	-	-	75,58
SiNP@CS1	25,32	17,38	0,32	52,64
NPNG	25,91	15,32	0,46	58,26
Energie de liaison (eV)	103	285	531	398

La composition atomique en Si reste globalement constante. Dès le dépôt de la première couche de CS (SiNP@CS1), le carbone et l'azote entrent dans la composition comme attendu avec 17,38%_{at} de C et 0,32 %_{at} d'N. La teneur relative en oxygène diminue entre SiNP et SiNP@CS1 (de 75,58 %_{at} à 52,64 %_{at}), puis réaugmente sur les particules NPNG (58,26 %_{at}) ce que l'on peut attribuer aux couches d'ALG dont la composition théorique est 50 %_{at} C / 50 %_{at} O. La composition atomique en N augmente de 0,32 %_{at} pour les SiNP@CS1 à 0,46 %_{at} sur les NPNG ce qui s'explique par le dépôt d'une couche supplémentaire de CS.

Les différents pics de photoélectrons (C1s, N1s, O1s, Si2p) ont été déconvolués pour identifier leurs environnements chimiques et suivre leur évolution au cours du LbL. Les déconvolutions sont présentées en Annexe 4.

Les déconvolutions permettent d'obtenir la composition des chacun de environnements identifiés. Les mesures d'XPS présentent une erreur, comme toutes les techniques, pour s'en affranchir, des ratios sont calculés de manière à pouvoir faire une interprétation des valeurs relatives. Dans ce cas, au vu du pourcentage atomique de Si qui reste constant dans les trois échantillons (24,43 %_{at}, 25,32 %_{at}, 25,91 %_{at} pour SiNP, SiNP@CS1 et NPNG respectivement), toutes les contributions seront normalisées par la contribution Si2p.

Les ratios des contributions d'intérêt sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13 Ratios des environnements chimiques d'intérêt normalisés par rapport à la contribution Si2p

	Ratios							
	$\frac{O-C=O/Si}{2p}$	$\frac{O-C-O, N-C=O}{Si2p}$	$\frac{C-O, C-N}{Si2p}$	$\frac{O-C}{Si2p}$	$\frac{O=C, O-Si}{Si2p}$	$\frac{N-C=O}{Si2p}$	$\frac{Si2p3 Si-O}{Si2p}$	$\frac{Si2p3 Si-O (SiO2)}{Si2p}$
SiNP	0,00	0,00	0,00	0,55	2,55	0,00	0,32	0,68
SiNP@CS1	0,03	0,04	0,13	1,47	0,61	0,01	0,28	0,72
NPNG	0,04	0,08	0,20	0,40	1,85	0,01	0,41	0,59

La contribution O-C=O, attribuée aux acides carboxyliques de l'ALG n'augmente que très peu entre les SiNP@CS1 et les SiNP@CS/ALG (de 0,03 à 0,04). En revanche, sachant que le ratio N-C=O/Si2p est constant, on remarque que la contribution O-C-O double entre le dépôt de la première couche de CS et la couronne LbL complète (de 0,04 pour SiNP@CS1 à 0,08 pour NPNG). Les liaisons O-C-O sont présentes dans les polysaccharides donc il est logique que leur contribution augmente avec la quantité de polysaccharides en surface. De la même manière, les contributions C-O, C-N augmentent également de 0,13 à 0,20 respectivement.

Il est difficile de discuter l'évolution des environnements O=C et O-Si déconvolués sur le pic O1s puisque ces deux environnements ont la même énergie de liaison mais n'évoluent a priori pas de la même manière. On s'attend en effet à ce que le ratio C=O/Si2p augmente avec le nombre de couche de polysaccharides, et que le ratio O-Si/Si2p diminue du fait de l'augmentation de l'épaisseur de la couronne qui masque le cœur de silice.

Ce dernier point est cependant observé grâce à la déconvolution du pic Si2p. En effet, le ratio attribué à l'environnement Si-O, qui caractérise la surface des particules, augmente sur les NPNG (de 0,32 sur SiNP à 0,41 sur NPNG), alors que le ratio Si-O attribué au SiO2 au cœur des SiNPs diminue (de 0,68 sur SiNP à 0,59 sur NPNG). Cette évolution traduit donc bien le phénomène d'écrantage du cœur des SiNPs par la couronne d'hydrogel, qui limite la diffusion des photoélectrons à cœur des particules jusqu'à la surface.

2) Quelles sont les interactions entre le copolymère et les particules lors du greffage dans l'eau ?

Dans cette partie, il s'agit de comparer les particules non greffées (NPNG) avec les particules modifiées dans l'eau, en présence du copolymère et des agents de couplage EDC/NHS (NPG Cov H₂O) ou en présence du copolymère sans agents de couplage (NPG Ion H₂O). Nous avons

également utilisé comme référence un échantillon de NPNG ayant été mis en contact avec les agents de couplage dans l'eau, sans copolymère, dans des conditions identiques au greffage covalent (NPNG+AC H₂O). Cet échantillon de référence a pour but de vérifier si les changements d'environnements observés résultent bien du copolymère et non pas de la réaction d'NHS/EDC avec les particules. En effet, ces agents de couplage peuvent réticuler les amines du CS avec les acides carboxyliques de l'ALG, d'autant plus en milieu aqueux où l'hydrogel est gonflé et où ces petites molécules organiques peuvent diffuser dans la couronne. Le Tableau 14 ci-dessous récapitule les échantillons étudiés ici :

Tableau 14 Rappel de la nomenclature et de la composition des échantillons étudiés dans la partie 5.2

Nom	NPNG	NPG Cov H ₂ O	NPG Ion H ₂ O	NPNG + AC H ₂ O
Composition	Nanoparticules SiNP@CS/ALG, non modifiées en surface	SiNP@CS/ALG greffées dans l'eau en présence des agents de couplage EDC/NHS donc supposément de manière covalente	SiNP@CS/ALG modifiées dans l'eau sans agents de couplage, donc supposément par adsorption électrostatique	SiNP@CS/ALG non modifiées en surface mises en contact avec les agents de couplage (AC) NHS/EDC selon le même protocole que le greffage mais sans copolymère

Les compositions atomiques et les ratios issus des déconvolutions sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 Compositions atomiques en Si, C, N, O déterminées par XPS et ratios des environnements chimiques d'intérêt normalisés par rapport à la contribution Si2p

	Compositions (%at)				Ratios			
	Si	C	N	O	C-C / Si2p	N-C=O / Si	O-C=O / Si2p	C-N/Si2p
Energie de liaison (eV)	103	285	399	532	-	-	-	-
NPNG	26	15	0	58	0,22	0.08	0.04	0.20
NPG cov H ₂ O	23	23	3	49	0,46	0.15	0.03	0.31
NPG ion H ₂ O	23	23	2	52	0,41	0.11	0.03	0.32
NPNG+AC H ₂ O	27	15	1	57	-	-	-	-

Les compositions atomiques présentées dans le Tableau 15 montrent que la présence du copolymère PVAm-*b*-PNIPAM induit une augmentation du pourcentage atomique du C qui est due au squelette carboné du copolymère (de 15 %_{at} pour NPNG à 23 %_{at} pour NPG cov H₂O et 23 %_{at} pour NPG ion H₂O), et une augmentation de l'azote qui est due à la haute teneur en fonctions amine et amide du dibloc (de 0%_{at} pour NPNG à 3 %_{at} pour NPG cov H₂O et 2 %_{at} pour NPG ion H₂O). Les compositions atomiques de l'échantillon de référence NPNG+AC H₂O, c'est-à-dire des particules

NPNG mises en contact avec les agents de couplage dans l'eau mais sans copolymère, sont très similaires aux compositions des NPNG (15%_{at} de C et 1%_{at} d'N), on peut donc supposer que le couplage CS/ALG reste moindre comparé au couplage ALG-PVAm.

Après déconvolution, les contributions des différentes liaisons identifiées sont normalisées par rapport à la fraction Si2p puisque la composition atomique de Si est relativement constante dans ces trois échantillons. On observe que la contribution des liaisons C-C a doublé pour les particules NPG Cov H₂O et NPG Ion H₂O (de 0,22 pour NPNG à 0,46 pour NPG cov H₂O et 0,41 pour NPG ion H₂O), ce qui confirme bien la présence du copolymère à la surface car cette augmentation de liaisons C-C provient du squelette carboné du copolymère. De même, le ratio attribué aux liaisons C-N augmente (de 0,20 pour NPNG à 0,31 pour NPG cov H₂O et 0,32 pour NPG ion H₂O) : ces liaisons sont présentes dans le copolymère dans les unités VAm et NIPAM. On remarque également que le ratio N-C=O augmente après modification de surface, d'autant plus pour le greffage covalent, ce qui suggère la formation des amides par le couplage peptidique. Une diminution de l'environnement O-C=O était attendue du fait de la réaction des acides carboxyliques de surface mais n'est pas observée.

De manière générale, les résultats d'XPS tendent à confirmer l'efficacité du greffage dans l'eau mais il est difficile de comparer les conditions de greffage covalent et d'adsorption électrostatique car peu de différences sont observées sur les ratios étudiés.

3) Quelles sont les interactions entre le copolymère et les particules lors du greffage dans le DMSO ?

Le greffage dans le DMSO est caractérisé selon la même méthode que celui dans l'eau, les compositions atomiques et ratios des différentes contributions d'intérêt sont présentés dans le Tableau 16 ci-dessous :

Tableau 16 Compositions atomiques en Si, C, N, O déterminées par XPS, énergie de liaisons de leurs pics respectifs et ratios des environnements chimiques d'intérêt normalisés par rapport à la contribution Si2p

	Compositions (%at)				Ratios			
	Si	C	N	O	C-C / Si2p	O-C-O, N-C=O / Si2p	O-C=O / Si2p	C-N / Si2p
Energie de liaison (eV)	103	285	399	532	-	-	-	-
NGNP	26	15	0	58	0,22	0,08	0,04	0,20
NPG cov DMSO	24	23	3	50	0,45	0,16	0,03	0,37
NPG ion DMSO	26	15	1	58	0,21	0,10	0,02	0,25
NPNG+AC DMSO	23	21	2	54	-	-	-	-

Les compositions atomiques en C et N dans l'échantillon NPG Cov DMSO augmentent de la même manière que celle de NPG Cov H₂O, tout comme les ratios des environnements C-C, N-C=O et C-N. Au contraire, l'échantillon NPG Ion DMSO présente d'importantes différences avec son homologue NPG Ion H₂O. En effet, les compositions atomiques et les ratios des déconvolutions sont quasi-identiques à celles des NPNG. Ce résultat n'est pas surprenant puisque, par définition, la notion d'adsorption électrostatique dans un milieu aprotique n'a pas de sens. Cela nous confirme donc que les interactions copolymère/particules sans les agents de couplage sont des interactions électrostatiques et non pas des liaisons hydrogène, car ces dernières auraient pu se former dans le DMSO également.

Conclusion sur l'étude d'XPS

- 1) La caractérisation par XPS au long du LbL a permis de mettre en évidence le phénomène d'écrantage du cœur de silice avec la couronne de polymère qui augmente.
- 2) L'évolution des environnements chimiques avant et après greffage dans l'eau tendent à montrer que le copolymère est bien à la surface des particules, ce qui est en accord avec les caractérisations précédemment réalisées. La comparaison du greffage avec et sans agents de couplage ne montre pas de différences exploitables pour les discuter.
- 3) Le greffage covalent dans le DMSO donne des résultats similaires au greffage covalent dans l'eau. L'absence de copolymère lors de l'« adsorption électrostatique » dans le DMSO qui est un solvant aprotique confirme la nature de ces interactions électrostatiques dans l'eau et exclut l'hypothèse de liaisons hydrogène.

6. Conclusion sur la caractérisation de la modification de surface des SiNP@CS/ALG

Dans cette partie, des essais préliminaires de greffage covalent du copolymère PVAm-*b*-PNIPAM ont été réalisés ; la caractérisation par RMN HRMAS a permis de confirmer la présence du dibloc thermosensible à la surface des particules. Le ratio massique optimal de copolymère à apporter aux particules a été estimé à 1%_m par relaxométrie T2 et zétamétrie.

Une quantification par spectrofluorimétrie a permis d'estimer un ratio massique effectif de 0,6%_m de copolymère greffé à la surface des particules dans le cas du greffage covalent dans l'eau.

A la suite de ces résultats, nous nous sommes intéressés à la nature des interactions mises en jeu lors du greffage à travers une étude d'XPS. Bien que les résultats tendent à confirmer le greffage covalent, la comparaison entre le greffage covalent et le greffage non-covalent est difficile avec cette technique.

4. Mise en évidence des propriétés thermosensibles

Après avoir confirmé sa présence et estimé la quantité de copolymère thermosensible à la surface des particules, nous nous sommes attachés à l'étude des propriétés thermosensibles des particules modifiées afin d'apporter des éléments de réponse à notre objectif initial. Comme cela l'a été démontré dans le Chapitre 3 de la Partie 1, le copolymère PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ est double-hydrophile et s'auto-assemble spontanément à température ambiante sur la gamme de pH étudié (5-8-11) et présente une température de point de trouble (T_c) comprise entre 36,2 et 38,6 °C. A $T < T_c$, les chaînes de polymère greffé à la surface des particules sont hydrophiles donc allongées, à l'image des nanoparticules chevelues (*hairy nanoparticles*) souvent décrites dans la littérature.^{151,135} Lorsque la température est élevée, ces brosses latérales vont subir une déshydratation et donc un changement de morphologie pour adopter une conformation de chaînes recroquevillées en globules, de manière à réduire son interface avec l'eau. La surface des nanoparticules devient donc hydrophobe, ou partiellement hydrophobe à hauteur de la surface réellement recouverte de copolymère. Le but de cette partie est donc d'évaluer les conséquences de ce changement d'hydrophilicité de la surface, à travers une élévation de la température, sur le comportement des particules en suspension. Plusieurs stratégies pourraient permettre de mettre en évidence le caractère thermosensible des particules :

- **Libération d'actifs thermorégulée**

Les systèmes de particules modifiées avec des brosses de polymère thermosensibles sont souvent utilisées pour la libération d'actifs thermo-régulée.^{152,153} Dans le cas de notre système, pour démontrer une libération thermo-régulée, il faudrait charger les particules d'une molécule modèle et suivre sa libération dans le temps à température ambiante et à $T > T_c$. Cette stratégie reste compliquée à mettre en place car nécessite l'incorporation d'un actif.

- **Thermogélification**

La littérature sur les gels colloïdaux regorge d'exemples de systèmes particuliers liquides à température ambiante et qui gélifient sous l'effet de la température.^{154,155} Dans le cas de notre système, on peut s'attendre à ce que des interactions hydrophobes interparticulaires créent un réseau tridimensionnel de particules. Un tel réarrangement constituerait une transition de phase, d'une solution vers un gel, que l'on peut caractériser par rhéologie ou microrhéologie.

- **Déstabilisation thermo-induite**

Les particules sont stabilisées par des chaînes latérales ainsi qu'une charge de surface négative qui maintient une répulsion électrostatique entre les particules. Lorsque le copolymère transite, une seconde couronne, hydrophobe, se forme autour des particules. Il a été montré que des particules hydrophobes en surface ont tendance à s'agréger.¹⁵⁶ En fonction des caractéristiques de la suspension (taille des particules, force ionique, concentration, etc), une flocculation ou une agrégation des particules peut subvenir si les conditions ne sont pas favorables pour une thermogélification.

La libération thermorégulée d'actifs est une approche intéressante mais qui n'a pas pu être mise en place dans le temps imparti. La mise en évidence des propriétés thermosensibles sera faite à travers une étude sur la thermogélification du système particulaire, et une seconde étude sur la déstabilisation colloïdale thermo-induite. Dans cette partie, nous étudierons les propriétés thermosensibles de suspensions de NPG cov DMSO, afin de s'affranchir d'une éventuelle désorption du copolymère qui n'aurait pas été greffé de manière covalente.

1. *Investigation du caractère thermogélifiant par rhéologie et microrhéologie*

Etude de la thermogélification par rhéométrie en oscillation

La rhéométrie en oscillation est une technique de choix pour la mise en évidence d'une transition de phase de type sol/gel en fonction de la température.¹⁵⁵ Expérimentalement, il s'agit de déterminer en premier lieu la limite de la région viscoélastique linéaire (LVER, *linear viscoelastic region*) de la suspension, c'est-à-dire de déterminer au cours d'un balayage en amplitude, la gamme de déformation ou de contrainte sur laquelle le module conservatif G' est constant. Ensuite, des mesures de G' et G'' à amplitude constante dans la LVER au cours d'une rampe en température permettent de mettre en évidence une transition sol/gel. On s'attend en effet à visualiser une intersection entre G' et G'' , le module conservatif étant supérieur au module dissipatif avant la gélification, et inversement après la gélification.

Des premiers essais de rhéométrie ont été réalisés sur les suspensions de particules non modifiées en surface (NPNG) afin d'optimiser les protocoles de mesures. Nous avons cependant rapidement

été confrontés à une problématique de concentration de suspension. En effet, pour des questions de quantité de matière disponible, les suspensions étudiées ont été concentrées au plus à 20 mg/mL. A cette concentration, la suspension reste très fluide et difficile à caractériser par rhéométrie. Des mesures aberrantes ont souvent été obtenues, notamment en terme de déphasage δ qui a parfois été mesuré supérieur à 90° ce qui n'a aucun sens rhéologiquement parlant. Dans le cas des matériaux fluides, une piste d'amélioration des mesures est d'utiliser des géométries avec la plus grande surface de mesure possible. Dans notre cas, il aurait été intéressant de travailler sur une géométrie cône/plan d'un grand diamètre (60 mm), ce qui augmente nécessairement les volumes de suspensions nécessaires pour réaliser les mesures et les répliquer.

Malgré un travail conséquent sur la rhéométrie, les protocoles de mesures n'ont pas pu être optimisés pour garantir la validité des résultats, c'est pourquoi ils ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

Investigation d'une transition de phase par micro-rhéologie Rhéolaser

En parallèle de la rhéologie, des essais de Rhéolaser ont été réalisés au sein de l'entreprise Formulation (Toulouse, France), il s'agit d'une technologie de microrhéologie basée sur la rétrodiffusion multiple de la lumière (Annexe 5).

Le Rhéolaser Crystal est un appareil particulièrement adapté pour l'évaluation de transition de phases. Le traitement mathématique du faisceau rétrodiffusé par l'échantillon permet d'accéder à l'indice de microdynamique (mD) en Hz, qui reflète la dynamique locale des particules dans l'échantillon. Un indice haut correspond à un échantillon dont les particules ont un mouvement rapide, typiquement un liquide, alors qu'un faible indice est caractéristique d'une faible dynamique, que l'on peut observer dans un gel.

Des mesures de Rhéolaser Crystal ont été réalisées sur les particules modifiées en surface de manière covalente dans le DMSO (NPG Cov DMSO) et les particules non modifiées (NPNG), à 10 mg/mL dans un milieu salin à 10^{-3} M de NaCl. La microdynamique a été mesurée au cours d'une rampe en température de 25°C à 50°C (Figure 32).

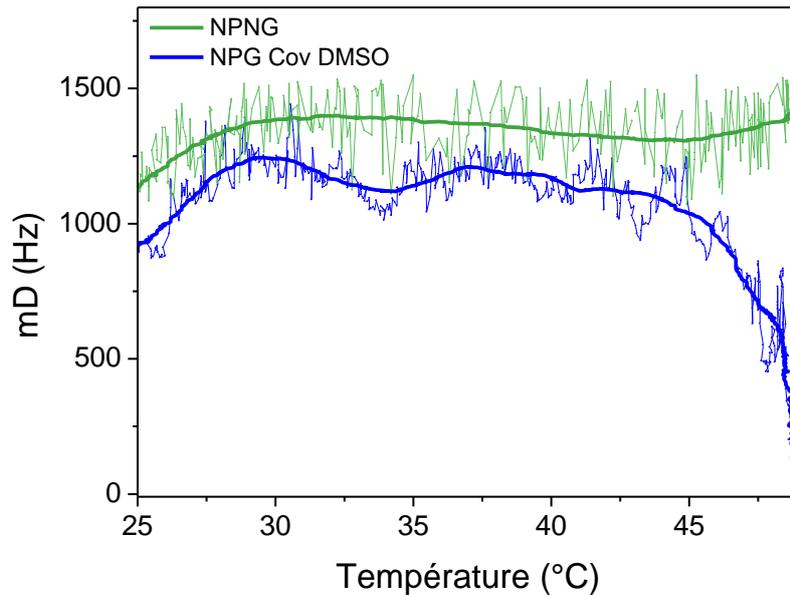


Figure 32 Courbe de microdynamique (mD) des particules NPNG (vert) et des particules NPG Cov DMSO (bleu) en fonction de la température. La courbe bruitée correspond aux points expérimentaux, la courbe avec le trait épais a été obtenue par lissage.

La courbe de mD associée aux NPNG montre une élévation au début de la rampe de chauffage, ce qui est la réaction normale d'un échantillon sous influence d'une source thermique et dont l'agitation des particules augmente. La mD tend ensuite à se stabiliser au cours de la rampe. L'échantillon NPG Cov DMSO subit la même élévation de mD au début de la rampe, mais son comportement va différer en fin de rampe. En effet, à partir de 40 °C, on observe une chute de mD. Dans ce cas, et au vu de l'observation macroscopique de l'échantillon en fin de mesure (identique à la photographie Figure 35 bien qu'échantillons différents), on attribue cette diminution brutale de mD non pas à une transition sol/gel mais à une sédimentation des particules. La concentration en particules diminuant dans l'échantillon au cours de la sédimentation, la microdynamique est également tirée vers le bas.

Bien qu'une thermogélification n'ait pas été observée, cette différence de comportement entre les particules greffées et non greffées est un premier résultat engageant sur la thermosensibilité des particules modifiées avec le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM.

Pour conclure, les mesures réalisées avec le Rhéolaser Crystal ont confirmé que la suspension de particules NPG cov DMSO n'est pas thermogélifiante dans ces conditions de concentrations. De manière analogue à la rhéologie, il n'a pas été possible d'analyser des suspensions plus concentrées par manque de temps et de matière. Cependant, les résultats démontrent bel et bien un caractère thermosensible aux particules greffées qui n'est pas observé sur les particules non-greffées, et qui s'exprime par une déstabilisation des particules lorsqu'elles sont soumises à une élévation de la température. La suite de l'investigation des propriétés thermosensibles s'attachera

donc à caractériser la stabilité colloïdale des suspensions sur une gamme de température de 25 °C à 50 °C.

2. Investigation de la stabilité colloïdale en fonction de la température

Les mesures ont été réalisées sur un appareil Turbiscan Tower qui est également une technologie de l'entreprise Formulacion. Le principe de cet appareil et de l'interprétation des mesures est décrit en Annexe 6. Les échantillons étudiés sont les suspensions de nanoparticules non greffées (NPNG) et les particules greffées de manière covalentes dans le DMSO (NPG cov DMSO), les particules sont dispersées à 10 mg/mL dans un milieu salin à 10^{-3} M de NaCl et à pH 7.

Une première acquisition a été réalisée à 25 °C, après quoi les échantillons ont été stabilisés à 45 °C au sein de l'appareil et redispersés avant l'acquisition à 45 °C. Dans un premier temps, les profils de transmission et rétrodiffusion relatives seront discutés pour les NPNG, puis pour les NPG. Enfin, une comparaison des particules greffées et non greffées sera établie notamment grâce au TSI, le Turbiscan Stability Index, qui est une valeur de plus en plus utilisée pour la caractérisation de la stabilité colloïdale.^{156,157}

Comportement des particules de référence

Les profils de transmission et rétrodiffusion relatives mesurés lors des analyses des NPNG à 25 °C et 45 °C sont présentés ci-dessous (Figure 33):

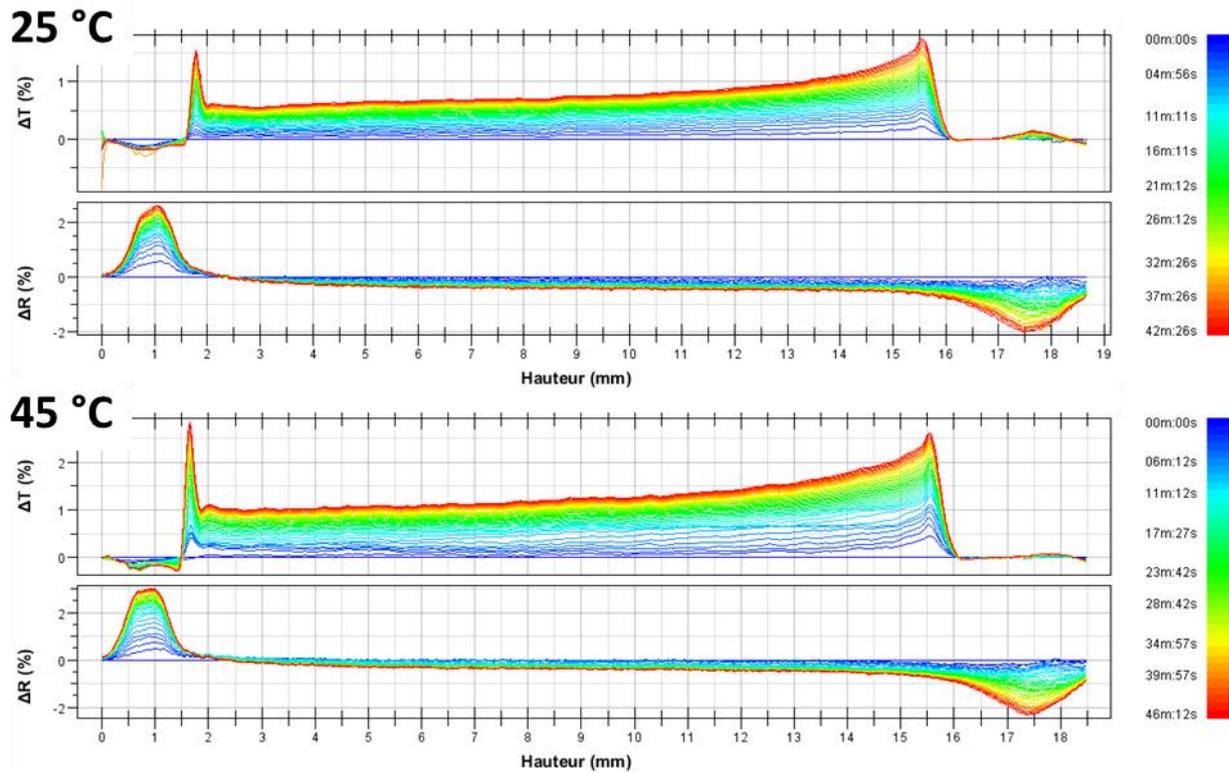


Figure 33 Profils des variations de rétrodiffusion (ΔR) et de transmission (ΔT) des particules NPNG à 25 °C (haut) et 45 °C (bas). Le dégradé de couleurs correspond à la superposition de courbes acquises au fil du temps d'analyse.

Comme expliqué en Annexe 6, les variations de rétrodiffusion (ΔR) et de transmission (ΔT) sont représentées en fonction de la hauteur du tube, les faibles hauteurs correspondant logiquement au fond du tube et les grandes hauteurs au haut du tube.

On remarque tout d'abord que les profils à 25 °C et 45 °C sont quasi-identiques. Sur le haut du tube, ΔR diminue rapidement ce qui traduit une clarification liée à la sédimentation rapide des particules sur cette fraction du haut du tube. A l'inverse, sur le bas du tube, ΔR augmente car les particules sédimentées font augmenter la fraction volumique locale en particules. La ΔT tend à augmenter tout au long de l'analyse, ce qui est logique puisque la suspension devient de plus en plus clairsemée au long de la sédimentation.

Comportement des particules greffées

Comparons ensuite les profils de ΔR et ΔT des particules NPG cov DMSO à 25 °C et 45 °C (Figure 34).

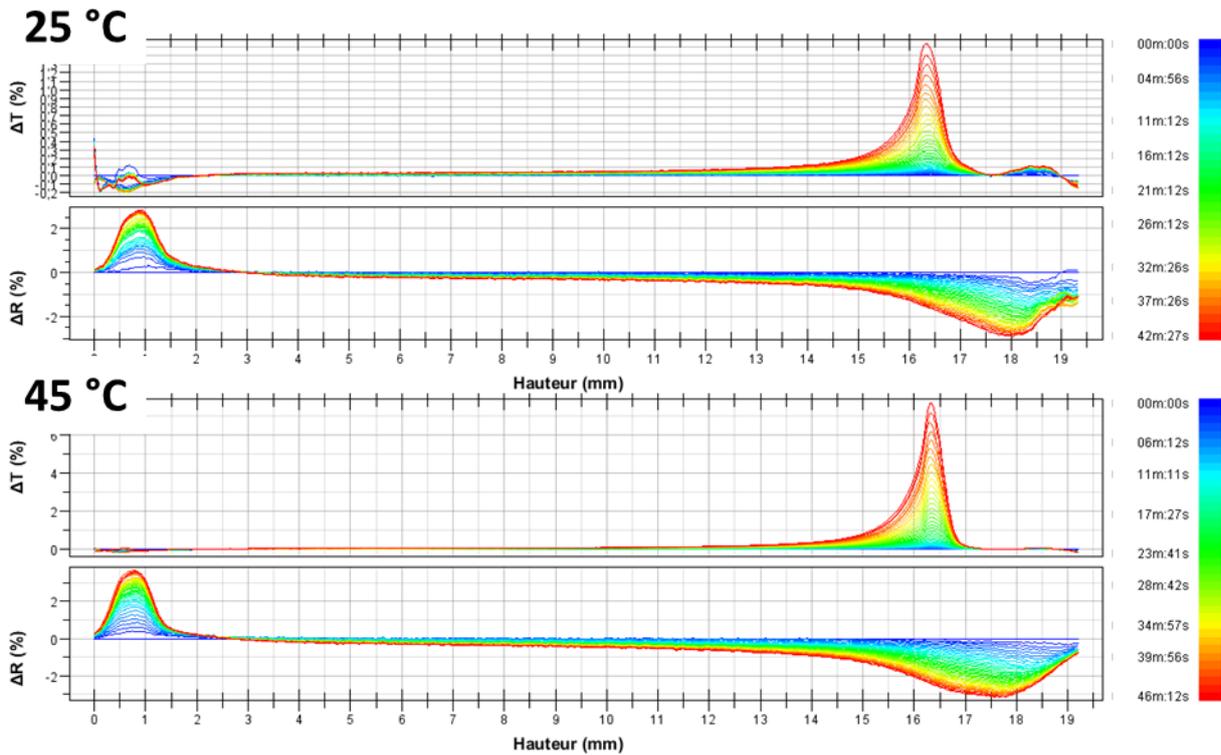


Figure 34 Profils des variations de rétrodiffusion (ΔR) et de transmission (ΔT) des particules NPG Cov DMSO à 25 °C (haut) et 45 °C (bas). Le dégradé de couleurs correspond à la superposition de courbes acquises au fil du temps d'analyse.

Les profils observés sont à nouveau relativement similaires à 25 °C et 45 °C. On observe une baisse de ΔR sur le haut du tube ainsi que l'augmentation simultanée de ΔT qui traduit bien une clarification de la suspension du fait de la sédimentation.

Sur le fond du tube, on retrouve la même augmentation de ΔR qui suggère l'augmentation locale de la fraction solide due à la sédimentation.

La principale différence observée entre les NPNG et NPG est sur les profils de ΔT . Les NPG présentent un pic de ΔT alors que les NPNG ont montré des valeurs de ΔT importantes sur toute la hauteur du tube. Cela peut indiquer des vitesses de sédimentation différentes. En effet, la ΔT augmente au fil du temps et est linéaire sur la hauteur du tube (hors fond et haut de tube), cela signifie que la concentration en particule est constante sur toute la hauteur, et donc que la sédimentation est relativement lente et progressive. Une sédimentation lente peut s'expliquer par un milieu plus visqueux. Sur les NPG, ΔT augmente beaucoup très rapidement et diminue à nouveau après ce pic, cela suggère que la sédimentation s'est déclenchée brutalement.

Comparaison des particules greffées et non greffées par le TSI

Cette comparaison qualitative de la stabilité colloïdale des suspensions de particules greffées et non-greffées a été quantifiée par l'étude de l'index de stabilité Turbiscan dans le temps (TSI, *Turbiscan Stability Index*) (Figure 35).

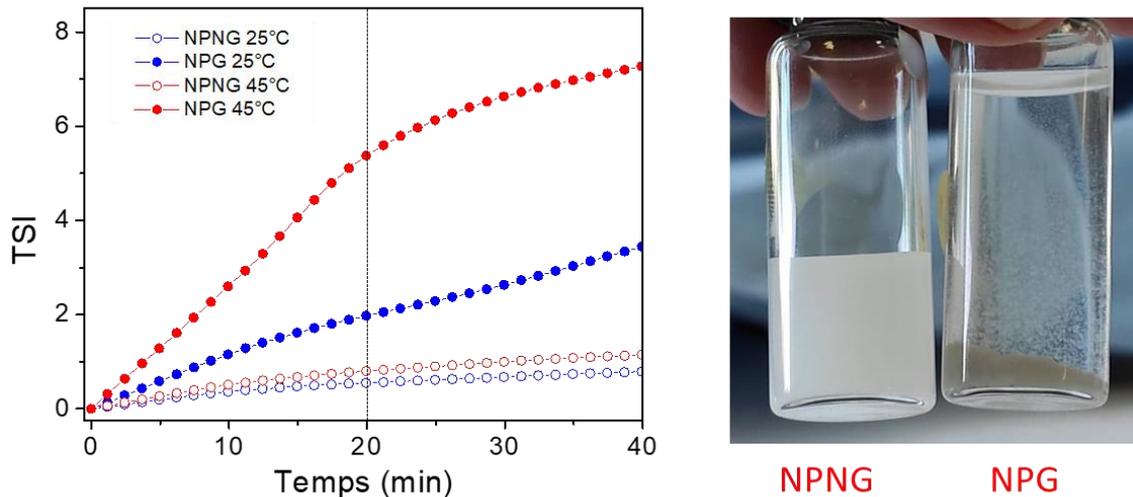


Figure 35 A gauche : évolution du TSI dans le temps pour les particules NPNG (symboles vides) et NPG Cov DMSO (symboles pleins) à 25 °C (bleu) et 45 °C (rouge), à droite : photographie des suspensions NPNG et NPG après analyse à 45 °C

Le TSI est un paramètre calculé en tout instant t comme la somme sur l'intégralité de l'échantillon des variations de rétrodiffusion et transmission. **Plus le TSI est grand, plus la dispersion qu'il caractérise est instable.** Entre 0 et 1, on considère qu'il s'agit d'une dispersion macroscopiquement stable (on ne voit pas de déstabilisation à l'œil), entre 1 et 3 la mesure traduit un début de déstabilisation mais visuellement elle n'est pas distinguée. Au-delà de 3, le TSI traduit une déstabilisation d'autant plus importante que la valeur est grande. Le TSI est calculé à tout instant, dans notre cas, les valeurs seront arbitrairement comparées à 20 min. Dans un premier temps, l'évolution du TSI confirme que l'échantillon NPNG n'est pas thermosensible puisque les courbes à 25 °C (○) et 45 °C (○) ne présentent pas de différences avec des valeurs respectives de 0,6 et 0,8 après 20 minutes.

En revanche, les particules NPG Cov DMSO présentent des différences intéressantes. Tout d'abord, à 25 °C, les particules greffées sont moins stables que les non-greffées, avec un TSI à 20 min de 2,0 au lieu de 0,6 pour les NPNG. Cela pourrait s'expliquer par une diminution de la répulsion électrostatique inter-particulaire liée à leur charge de surface. En effet, les mesures de potentiels- ζ (Figure 20) ont montré que les NPNG ont une charge négative d'environ -40 mV, et les NPG une charge positive d'environ $+20$ mV. La répulsion liée aux charges négatives de surface est plus importante que celle des particules greffées, ce qui peut entraîner une plus rapide déstabilisation des particules greffées.

A 45 °C, les particules NPG Cov DMSO sont très rapidement déstabilisées, avec un TSI de 5,4 à 20 min qui dépasse 7 après 40 min. Macroscopiquement, des flocs sont formés et précipitent (Figure 35). Ces résultats sont donc en accord avec les mesures de microdynamique issues du Rhéolaser et confirment le caractère thermosensible de la suspension de particules modifiées NPG Cov B à 45 °C.

Ces propriétés thermosensibles se caractérisent par une déstabilisation induite par la température et qui provient nécessairement du copolymère PVAm-*b*-PNIPAM greffé en surface des particules. En dessous de sa T_c , le copolymère est hydrophile et ses chaînes hydratées sont étendues. Quand la température augmente et atteint T_c , l'eau devient un mauvais solvant pour le PNIPAM, les liaisons hydrogène sont rompues et le copolymère va se réorganiser de manière à réduire au maximum son interface avec l'eau. Ses groupements hydrophiles se positionnent à l'intérieur des globules, et le squelette carboné hydrophobe à l'extérieur. Cette transition de morphologie résulte en la formation d'une couche hydrophobe à la surface des particules. L'homogénéité de cette couche est difficile à estimer, cependant les résultats précédents prouvent que la surface est suffisamment hydrophobe pour que des interactions hydrophobes inter-particulaires se créent. Ce phénomène d'auto-assemblage de particules hydrophobes en surface a déjà été observé dans la littérature.¹⁵⁶

Pour conclure, l'étude de la stabilité colloïdale en fonction de la température des particules silice/hydrogel modifiées en surface par le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM a permis de démontrer que la modification de surface apporte effectivement aux NPs des propriétés thermosensibles. Celles-ci se caractérisent par une déstabilisation thermo-induite qui n'est pas visible sur les particules non-modifiées en surface.

5. Conclusion

Dans ce chapitre, la modification de surface des nanoparticules SiNP@CS/ALG a été étudiée. Dans un premier temps, la stratégie de *grafting to* a été mise en point en s'appuyant sur la littérature et des travaux antérieurs. Des essais préliminaires de greffage covalent du copolymère PVAm-*b*-PNIPAM ont été réalisés, la caractérisation par RMN HRMAS a permis de confirmer la présence du dibloc thermosensible à la surface des particules. Suite à ce résultat positif, le ratio massique optimal de copolymère à apporter aux particules a été déterminé conjointement par relaxométrie T2 et zétamétrie. Ces deux techniques ont permis de d'estimer un ratio optimal de 1%_m.

Une quantification par spectrofluorimétrie a permis d'estimer le ratio massique effectif de copolymère greffé à la surface des particules. Différentes conditions de greffage ont été comparées : un greffage covalent avec les agents de couplage NHS/EDC, ou une adsorption non-covalente, dans l'eau et dans le DMSO pour ces deux paramètres. La quantification a démontré un

taux de greffage maximal de 0,6%_m de copolymère par rapport aux particules dans le cas du greffage covalent dans l'eau.

A la suite de ces résultats, nous nous sommes intéressés à la nature des interactions mises en jeu lors du greffage. Une étude XPS a permis de comparer les différentes conditions de greffage. Bien que les résultats tendent à confirmer le greffage covalent, la comparaison entre le greffage covalent et le greffage non-covalent est difficile avec cette technique.

Enfin, les propriétés thermosensibles des particules modifiées en surface ont été étudiées. Une étude de la stabilité colloïdale a démontré que les particules modifiées subissent une déstabilisation lors d'une rampe de température, alors que les particules non-modifiées ne sont pas impactées par la température. Ce résultat confirme ainsi l'hypothèse de départ et montre que la modification de surface des particules SiNP@CS/ALG par le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM leur apporte des propriétés d'auto-assemblage thermo-induit.

P2- Chapitre 3 : Matériel et méthodes

Dans ce chapitre seront présentés les protocoles mis au point et utilisés dans l'ensemble de la Partie 2. Dans un premier temps, les réactifs seront listés, puis la partie expérimentale liée à la mise en forme des nanoparticules et de leur modification de surface sera décrite. Enfin, les techniques analytiques utilisées pour caractériser les nanoparticules seront brièvement explicitées.

1. Réactifs et matériel

L'éthanol absolu, l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH, 20 %), l'hydroxyde de sodium (NaOH), le chlorure de sodium (NaCl) et l'acide chlorhydrique (HCl, 12M) proviennent de chez ThermoFisher et ont été utilisés sans purification préalable. Le tétraéthylorthosilicate (TEOS), l'acide acétique (AcOOH, >99%), le diméthylsulfoxyde (DMSO, >99%), le N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC, 98%), le N-hydroxysuccinimide (NHS, 98%) ont été fournis par Sigma Aldrich. Enfin, le chitosane (CS, lot #STBH6262) et l'alginate de sodium (ALG, lot #058K0126) ont également été fournis par Sigma Aldrich et caractérisés par RMN et viscosimétrie avant utilisation, sans purification préalable.

2. Caractérisation des polysaccharides

1. Détermination des masses molaires viscosimétriques

La masse molaire viscosimétrique (M_v) du CS a été réalisée par rhéométrie rotative (Rhéomètre MARS40 de ThermoScientific) dans des cylindres coaxiaux (diamètre interne 25 mm, entrefer 2 mm). Les solutions de CS dans un milieu contenant 0.1 M d'AcOOH et 0.2 M de NaCl sont préparées aux concentrations suivantes : 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 et 0.05 g/dL. Les mesures en écoulement de contrainte en fonction du taux de cisaillement (10 – 100 s⁻¹) sont réalisées à 25 °C et sont répliquées sur 3 échantillons distincts. Une pente moyenne des trois répliques est calculée et permet d'accéder à μ_{solution} pour les solutions de CS, et à μ_{solvant} pour la solution saline d'acide acétique.

La viscosité relative est calculée telle que :

$$\eta_{rel} = \frac{\mu_{\text{solution}}}{\mu_{\text{solvant}}}$$

A partir de η_{rel} sont alors calculées les viscosités spécifiques $\eta_{spé}$, inhérentes η_{inh} et réduites η_{red} selon les équations suivantes :

$$\eta_{spé} = \eta_{rel} - 1$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{spé}}{C}$$

$$\eta_{inh} = \frac{\ln(\eta_{rel})}{C}$$

Les viscosités réduites et inhérentes sont ainsi calculées pour chacune des solutions de polymère et représentées en fonction de la concentration en polymère, afin d'extrapoler la viscosité intrinsèque $[\eta]$ à concentration nulle d'après les équations :

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{red}$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{inh}$$

Une valeur moyenne des 2 extrapolations donne $[\eta]$. Enfin, la relation de Mark-Houwink-Sakurada permet d'accéder à la masse molaire moyenne viscosimétrique :

$$[\eta] = K \cdot Mv^\alpha$$

Les paramètres K et α sont des valeurs tabulées à une température donnée pour un couple solvant/polymère.

La masse molaire viscosimétrique de l'ALG de sodium utilisé a été déterminée selon le même protocole que celle du CS, à partir de solutions aux mêmes concentrations dans un milieu salin à 0.1 M en NaCl.

2. Détermination du degré de déacétylation du CS

Le degré de déacétylation du CS a été déterminé par RMN ^{13}C CP MAS (*cross-polarization/magic-angle spinning*) sur un spectromètre Bruker Avance 400. La vitesse de rotation autour de l'angle magique a été réglée à 10 kHz. Le spectre a été obtenu avec une expérience CP quantitative réalisée à température ambiante à l'aide d'un train de 10 périodes de polarisation croisée d'une durée de 1,1 ms séparées par un temps de repolarisation 1H de 0,7s. Le temps de recyclage a été fixé à 2s. La référence des déplacements chimiques est le tétraméthylsilane.

3. Détermination du ratio M/G de l'ALG de sodium

Le ratio M/G du lot d'ALG utilisé a été déterminé par RMN ^1H (liquide) sur un spectromètre Bruker Avance NEO 600 MHz selon une méthode décrite par Vilén *et al.*¹⁰⁶ L'ALG de sodium a préalablement été solubilisé dans le D₂O.

3. Mise en forme des nanoparticules SiNP@CS/ALG

1. Nanoparticules de silice SiNP

Les nanoparticules de silice (SiNP) ont été synthétisées selon le protocole mis au point dans l'équipe PPB du CIRIMAT par P. Lagarrigue. Il s'agit d'un procédé Stöber modifié par voie sol/gel en milieu basique.¹⁵⁸ Typiquement, l'éthanol absolu (100 mL) est mélangé avec de l'eau MilliQ (10.8 mL) et une solution ammoniacale (3.9 mL NH₄OH à 20 %),) sous vive agitation pendant 15 min. Le précurseur de silice, le TEOS (6.3 mL) est ajouté à la solution. Après 17 h d'agitation à température ambiante, les particules sont collectées par filtration (filtre de nitrate de cellulose 0,2 µm, Whatman) ou centrifugation puis trempées à l'azote liquide avant d'être lyophilisées pendant 3 jours.

2. Nanoparticules cœur-couronne de silice@CS/ALG SiNP@CS/ALG

Les nanoparticules cœur-couronne sont préparées par la technique de *Layer-by-Layer*.⁶³ Des couches de polyélectrolytes sont déposées successivement autour des nanoparticules de silice de manière à obtenir une couronne de 4 couches, soit 2 bicouches polycation/polyanion. Les particules de silice étant chargées négativement en dessus du point isoélectrique de la silice amorphe (~ 3), la première couche déposée est le CS (polycation), puis les adsorptions suivantes sont l'ALG (polyanion), le CS et l'ALG. La notation CS1-ALG1-CS2-ALG2 désigne les couches précédemment détaillées.

Le protocole est adapté de Feng *et al.* et Du *et al.*^{77,115}

Couche CS1

8 mL SiNPs @ 50 mg/mL (soit 400 mg de NPs) sont ajoutés dans 400 mL CS @1 %_{m/v} (soit 4000 mg de CS pour un ratio NPs:CS de 1:10) dans un bécher de 600 mL. La suspension est agitée pendant 17 h à température ambiante. Les particules sont alors isolées par centrifugation (15g/10 min) puis lavées à l'eau (2x 15 mL). Les 400 mg de particules SiNP@CS sont dispersées à 3.3 mg/mL dans 120 mL d'eau. 1 mL de suspension à 3.3 mg/mL est prélevé pour les caractérisations, son pH est mesuré.

Couche ALG1

120 mL de la suspension SiNPs@CS @ 3.3 mg/mL (soit 400 mg de NPs) sont introduits dans un bécher de 600 mL et mis sous agitation. 40 mL ALG@0.1%_{m/v} (soit 40 mg de NPs pour un ratio NPs:ALG de 10:1) sont ajoutés à la macropipette 5 mL. La suspension est agitée pendant 1 h à température ambiante. Les particules sont alors isolées par centrifugation (15g/10 min) puis lavées à l'eau (2x 15 mL). Les 400 mg de particules SiNP@CS/ALG sont dispersées à 3.3 mg/mL dans 120 mL d'eau. 1 mL de suspension à 3.3 mg/mL est prélevé pour les caractérisations, son pH est mesuré.

Couche CS2

120 mL de la suspension SiNPs@CS/ALG @ 3.3 mg/mL (soit 400 mg de NPs) sont introduits dans un bécher de 600 mL et mis sous agitation. 40 mL CS@0.1%_{m/v} (soit 40 mg de NPs pour un ratio NPs:CS de 10:1) sont ajoutés à la macropipette 5 mL. La suspension est agitée pendant 1 h à température ambiante. Les particules sont alors isolées par centrifugation (15g/10 min) puis lavées à l'eau (2x 15 mL). Les 400 mg de particules SiNP@CS/ALG/CS sont dispersées à 3.3 mg/mL dans 120 mL d'eau. 1 mL de suspension à 3.3 mg/mL est prélevé pour les caractérisations, son pH est mesuré.

Couche ALG2

120 mL de la suspension SiNPs@CS/ALG/CS @ 3.3 mg/mL (soit 400 mg de NPs) sont introduits dans un bécher de 600 mL et mis sous agitation. 40 mL ALG@0.1%_{m/v} (soit 40 mg de NPs pour un ratio NPs:ALG de 10:1) sont ajoutés à la macropipette 5 mL. La suspension est agitée pendant 1 h à température ambiante. Les particules sont alors isolées par centrifugation (15g/10 min) puis lavées à l'eau (2x 15 mL). Les 400 mg de particules SiNP@CS/ALG/CS/ALG sont dispersées à 10 mg/mL dans 40 mL d'eau. 1 mL de suspension à 10 mg/mL est prélevé pour les caractérisations, son pH est mesuré.

4. Modification chimique de surface des nanoparticules SiNP@CS/ALG

Les protocoles de modification de surface sont détaillés pour le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM, ils sont identiques pour le copolymère PVAm-*b*-P(NIPAM-*stat*-NVC)

1. Modification covalente de la surface

Typiquement, 100 mg de nanoparticules SiNP@CS/ALG à 5 mg/mL dans l'eau ou dans le DMSO sont introduits dans un bécher sous agitation. La solution de copolymère PVAm_m-*b*-PNIPAM_n à 1 mg/mL dans l'eau ou dans le DMSO est ajoutée tel que le ratio copolymère/particules soit de 1 %_m. Les solutions d'EDC et NHS à 10 mg/mL dans le DMSO sont enfin ajoutées selon les proportions molaires : *eq* COOH : *eq* EDC : *eq* NHS = 1 : 4 : 2. La suspension est agitée à température ambiante pendant 24 h. Les particules sont ensuite collectées par centrifugation puis lavées à l'eau par centrifugation (2x15 mL).

2. Modification non-covalente de la surface

Typiquement, 100 mg de nanoparticules SiNP@CS/ALG à 5 mg/mL dans l'eau ou dans le DMSO sont introduits dans un bécher sous agitation. La solution de copolymère PVAm_m-*b*-PNIPAM_n à 1 mg/mL dans l'eau ou dans le DMSO est ajoutée tel que le ratio copolymère/particules soit de 1 %_m. La suspension est agitée à température ambiante pendant 24 h. Les particules sont ensuite collectées par centrifugation puis lavées à l'eau par centrifugation (2x15 mL).

5. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

1. DLS

Les mesures de DLS sont réalisées sur un appareil Malvern ZetaSizer Nano ZS doté d'un laser He-Ne émettant à 633 nm. Pour chaque analyse, un temps de stabilisation de 120 s est appliqué. 3 mesures de 15 réplicas de 10 secondes chacun sont enregistrées sur des échantillons préparés à 0,5 mg/mL et introduits dans des cuvettes jetables à volume réduit (700 µL). Les diamètres hydrodynamiques moyens pondérés en intensité (Z-average) et l'indice de polydispersité (PDI) sont obtenus par l'analyse cumulante à partir de la relation de Stokes-Einstein : $D_T = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_h}$, où k_B , T et η sont respectivement la constante de Boltzmann, la température et la viscosité du milieu, D_T est le coefficient de diffusion de translation.

2. Zétamétrie

Pour la caractérisation de routine des nanoparticules :

Les mesures de potentiels- ζ sont réalisées sur un appareil Malvern ZetaSizer Nano ZS doté d'un laser He-Ne émettant à 633 nm. Pour chaque analyse, un temps de stabilisation de 120 s est appliqué. 3 mesures d'un minimum de 15 réplicas sont enregistrées à 25 °C sur des suspensions à 0,5 mg/mL. La valeur moyenne de ces 3 mesures est associée à son écart-type.

Pour la détermination du fwr optimal :

Les mesures de potentiels- ζ pour la détermination du fwr optimal pour le *grafting to* des particules SiNP@CS/ALG (Figure 29) ont été réalisées par B. Maxit de Cordouan Technologies (Pessac, France) sur leur appareil WALLIS ζ . 3 mesures de 6 réplicas sont enregistrées à 25 °C sur des suspensions à 0,5 mg/mL. La valeur moyenne de ces 3 mesures est associée à son écart-type.

3. IRTF

Les analyses Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) ont été réalisées par E. De Smedt (Stagiaire M1) sur un spectromètre Nicolet 5700 (400 – 4000 cm⁻¹, 64 scans) en transmission sur des échantillons en pastilles KBr. Les pastilles ont été préparées à partir d'un mélange de 1 mg de nanoparticules dans 300 mg de KBr pressés sous 8 tonnes de pression.

4. ATG

Les analyses thermogravimétriques (ATG) ont été réalisées au CIRIMAT sur un appareil TAG16 (Setaram). Les échantillons déposés dans une nacelle d'alumine ont subi une rampe de température à 5 °C/min de 25 °C à 700 °C sous un courant d'Argon.

5. Mesure de la surface spécifique

La surface spécifique des SiNPs a été déterminée grâce à des mesures de surface basées sur l'adsorption-désorption du gaz N₂ (méthode multipoints) à l'aide d'un appareil ASAP 2010M

(Micrometrics) (mesures faites au CIRIMAT) et analysées par la méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET). Les mesures ont été répliquées trois fois après un dégazage de 12 h à 100 °C.

6. MET

Les images MET ont été acquises sur un appareil Hitachi HT7700 au CMEAB (Toulouse, France). Les échantillons ont été préparés en déposant une grille cuivre-carbone (FCF400-CU, Electron Microscopy Sciences) sur une goutte de la suspension (0,5 mg/mL) à analyser. Après 5 min, l'excès de suspension a été absorbé avec un papier filtre.

7. RMN

RMN ¹H liquide

Les analyses RMN ¹H pour la caractérisation du *grafting to* des copolymères PVAm-*b*-PNIPAM et PVAm-*b*-P(NIPAM-*stat*-NVC) sur l'ALG en solution ont été réalisées sur un spectromètre 500 MHz Bruker Advance équipé d'une cryosonde. Les échantillons ont été préparés à 30 mg/mL dans le D₂O.

RMN ¹H HRMAS

Les analyses RMN ¹H HRMAS ont été réalisées à 7 kHz sur un spectromètre VARIAN 600 MHz par C.Totee à la plateforme RMN de l'ICGM (Montpellier, France). Les nanoparticules NPNG et NPG Cov DMSO ont été suspendues après lyophilisation dans un volume minimal de D₂O afin d'avoir une concentration maximale en particules.

RMN Bas champ (Relaxométrie T2)

Les mesures de relaxométrie T2 (RMN Bas champ) ont été réalisées sur un appareil Acorn Area (Xigo Nanotools) par B. Maxit de Cordouan Technologies (Pessac, France). Le fonctionnement de cet appareil est expliqué en Annexe 7.

Les particules NPNG et NPG Cov DMSO lyophilisées ont été suspendues dans une solution aqueuse de KCl à 1 mM à différentes concentrations (0.5 – 1 - 1.5 - 2 %_m). Les mesures ont été acquises après agitation et sonication des échantillons, 6 réplicas sont réalisés pour chaque mesure.

8. Spectrofluorimétrie

Les mesures de spectrofluorimétrie ont été acquises sur un spectromètre Fluorolog Horiba iHR320. Les ouvertures des fentes d'excitation et d'émission ont été fixées à 1.5 nm et n'ont pas été modifiées. Des spectres d'émission ont été enregistrés après une excitation à 325 nm, sur une gamme de 335 nm à 450 nm. Chaque mesure a été constituée de 5 scans consécutifs et moyennés, le signal d'intensité détecté a été corrigé tel que S1c/R1c. Tous les spectres ont été normalisés par la ligne de base à 435 nm (longueur d'onde à laquelle aucune luminescence n'est attendue).

Pour la réalisation de la droite de calibration de l'intensité à 346 nm en fonction de la concentration en copolymère PVAm-*b*-P(NIPAM-*stat*-NVC), des solutions de copolymère ont été préparées dans l'eau distillée à des concentrations allant de 0 à 10 µg/mL.

Les échantillons de particules analysés ont été préparés dans l'eau distillée à une concentration de 0,5 mg/mL.

9. XPS

Les mesures de spectrométrie photoélectronique X (XPS) ont été réalisées sur un appareil ESCALAB 250 de ThermoElectro par V. Flaud de l'ICGM (Montpellier, France). La source d'excitation est monochromatique avec une raie Al K α (1486.6 eV). La surface d'échantillon analysée a un diamètre de 500 µm. Le signal de la ligne de base a été enlevé par la méthode Shirley.¹⁵⁹ Les concentrations de surface atomique ont été déterminées à partir des pics de photoélectrons à l'aide des facteurs de sensibilité atomique de Scofield.¹⁶⁰ Les spectres photoélectroniques ont été calibrés en énergie de liaison par rapport à la contribution de la liaison C-C dans l'orbitale C1s à 284.8 eV. Les matériaux étudiés n'étant pas conducteurs, la charge a été compensée par un faisceau d'électron (-2 eV).

Les échantillons ont été lyophilisés et stockés dans des contenants en verre afin d'éviter toute contamination.

10. Microrhéologie (Rhéolaser Crystal)

Les mesures d'indice de microdynamique (mD) ont été réalisées avec R. Ramsch de l'entreprise Formulaction (Toulouse, France) sur leur appareil Rhéolaser Crystal. Le fonctionnement de cet appareil est expliqué en Annexe 5.

Les suspensions de nanoparticules NPNG et NPG Cov DMSO ont été préparées à 10 mg/mL dans un milieu à 10⁻³ M NaCl à un pH de 7. Les échantillons ont été introduits dans la cellule de mesure, stabilisés 2 minutes à 25 °C, puis l'acquisition de la mesure a été lancée en parallèle d'une rampe de température de 3 °C/min de 25 °C à 50 °C.

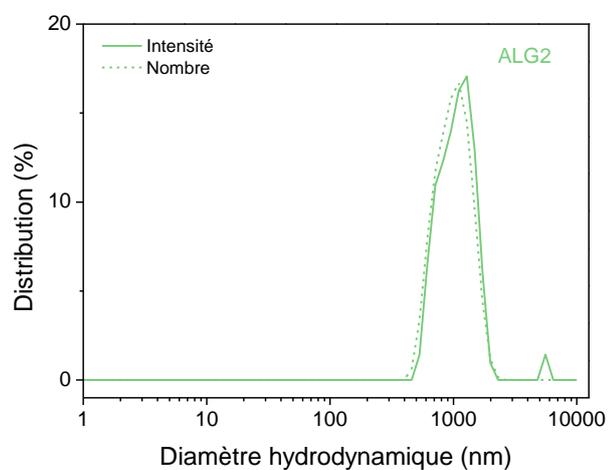
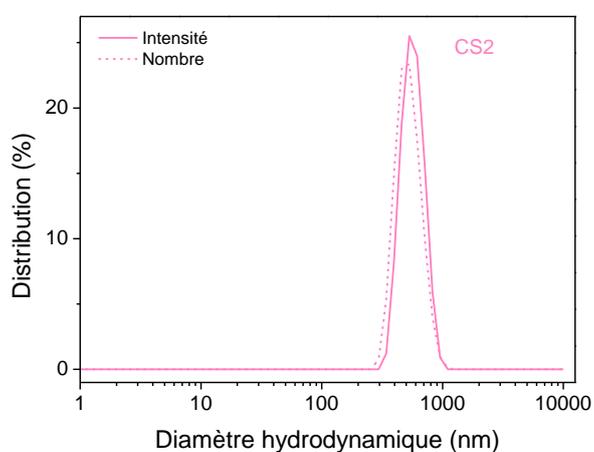
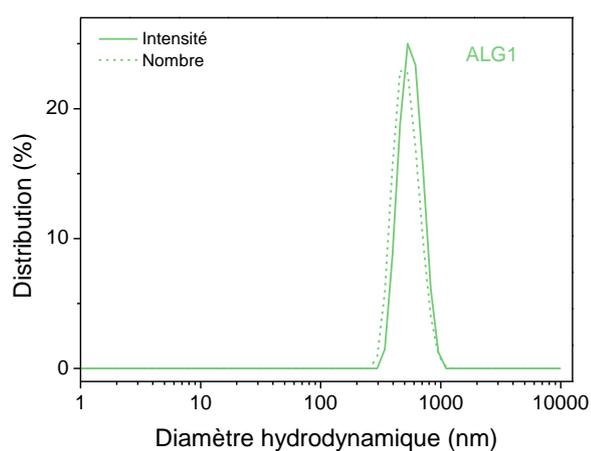
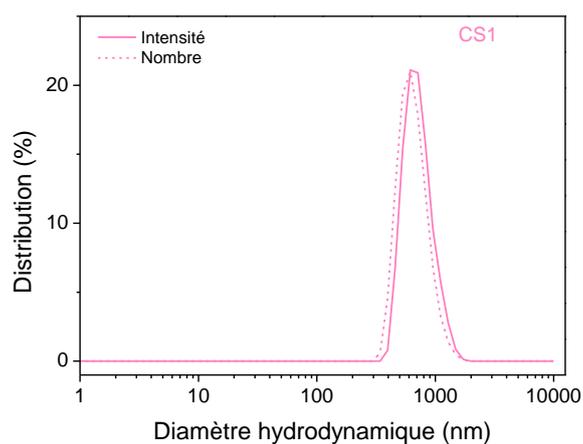
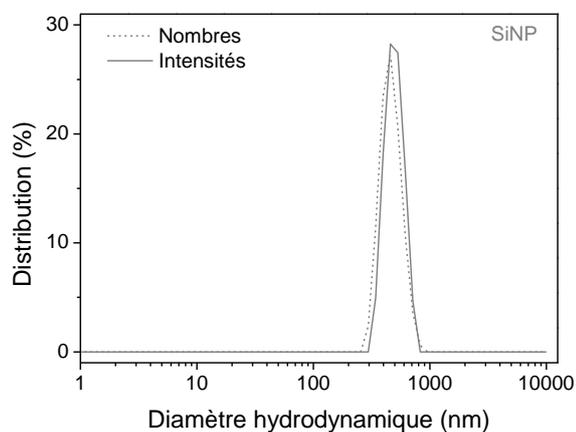
11. Etude de la stabilité colloïdale (Turbiscan)

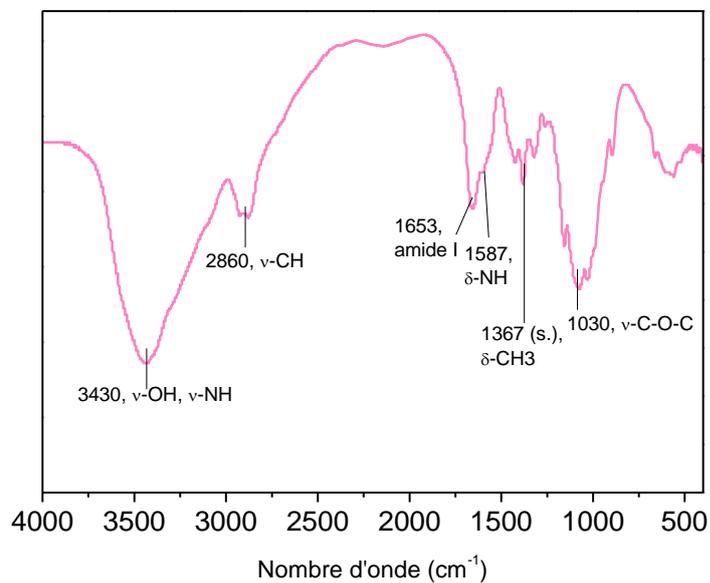
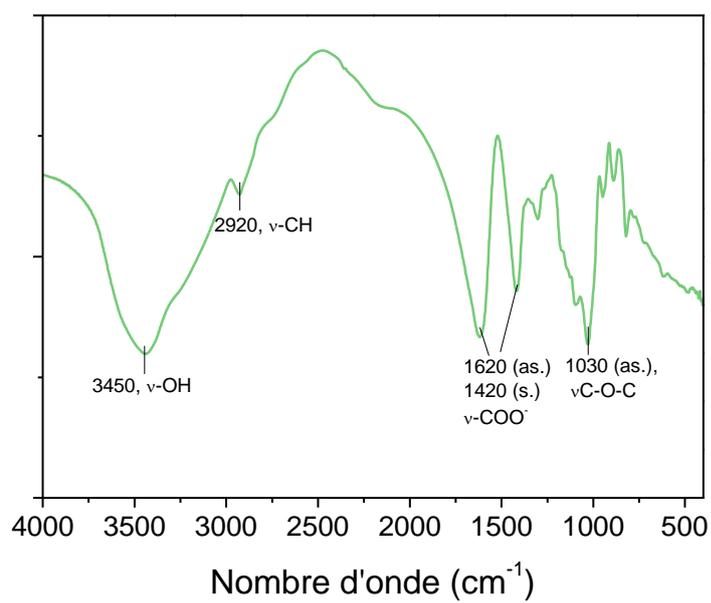
La stabilité colloïdale a été étudiée à 25 °C et 45 °C sur un appareil TurbiscanTower avec S. Korkmaz de l'entreprise Formulaction (Toulouse, France). Le fonctionnement de cet appareil est expliqué en Annexe 6. Les suspensions de nanoparticules NPNG et NPG Cov DMSO à 10 mg/mL dans un milieu à 10⁻³ M NaCl et un pH contrôlé de 7 ont préalablement été stabilisées dans les cellules de 4 mL à la température d'intérêt avant acquisition, puis redispersées avant de lancer l'acquisition. La durée totale d'acquisition a été de 30 min avec des scans toutes les 1 min 15 s.

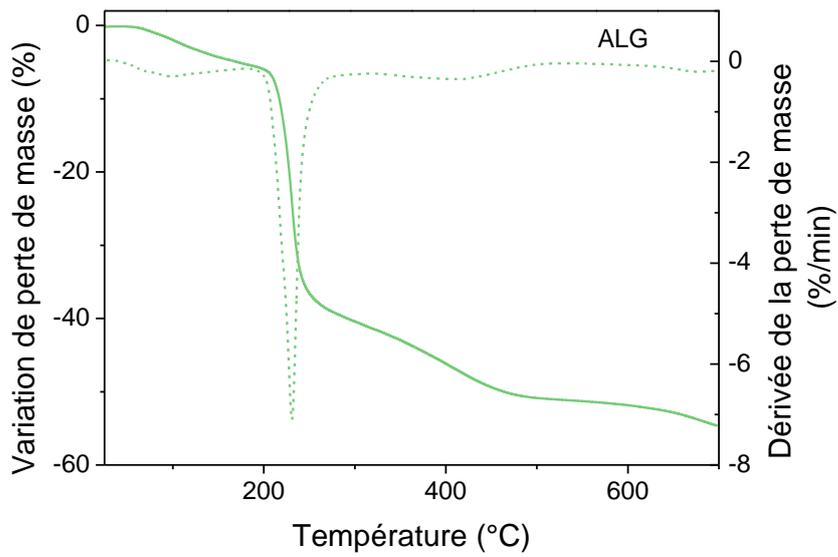
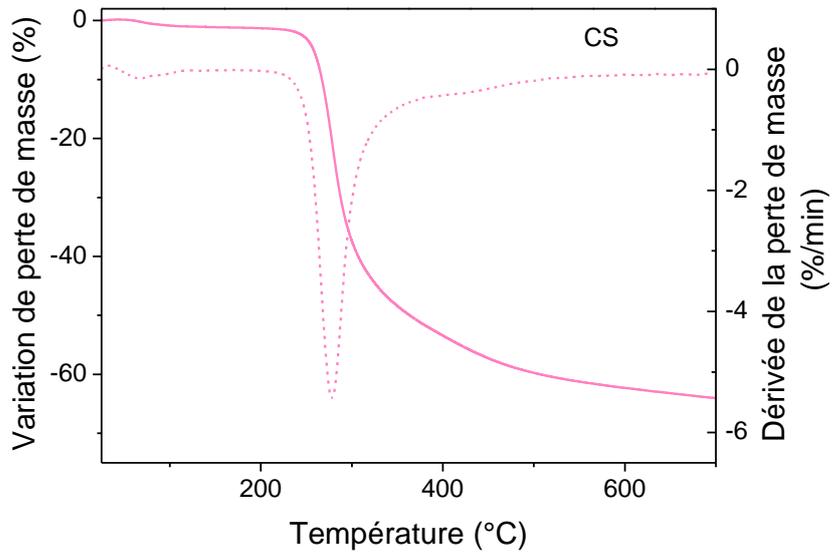
Annexes de la partie 2

Annexe 1 : Caractérisation des NPs SiNP@CS/ALG au cours de l'optimisation du procédé LbL

Couche	pH	Z-P (mV)	Ecart-type(mV)	Z-av (nm)	PDI
SiNP	9,5	-48,1	0,6	490	0,05
CS1	5,2	28,4	0,7	714	0,21
ALG1	5,5	-30,3	0,9	544	0,05
CS2	5,5	22,9	0,4	542	0,06
ALG2	5,9	-32,9	1,2	1473	0,56

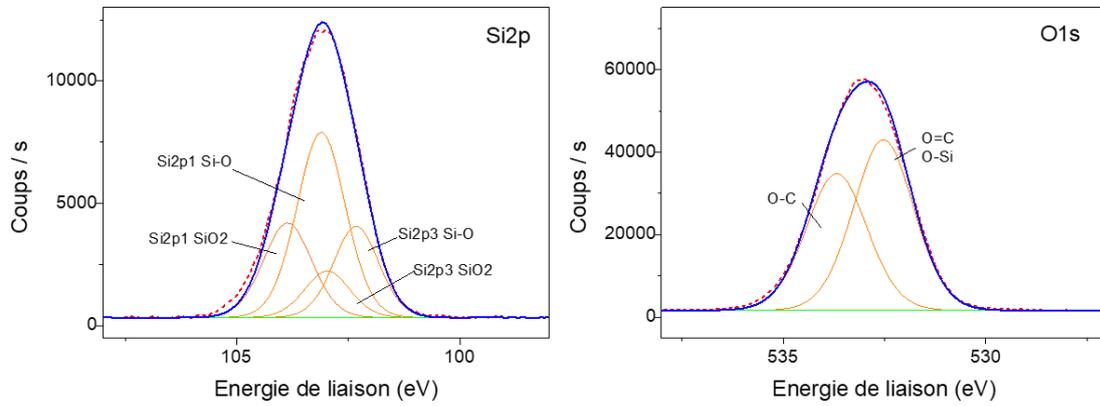


Annexe 2 : Spectres IRTF du CS et de l'ALG**Chitosane****Alginate**

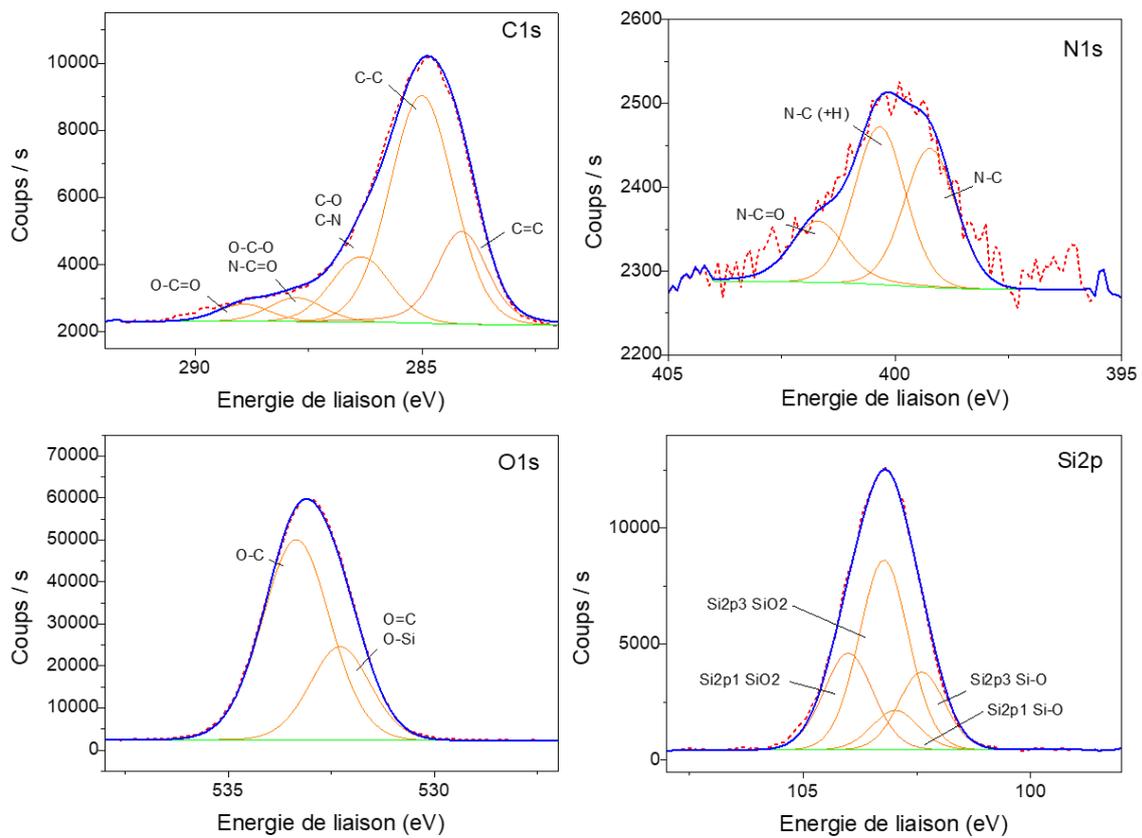
Annexe 3 : Thermogrammes du CS et de l'ALG

Annexe 4 : Déconvolutions des pics des photoélectrons C1s, N1s, O1s, et Si2p pour les échantillons analysés par XPS

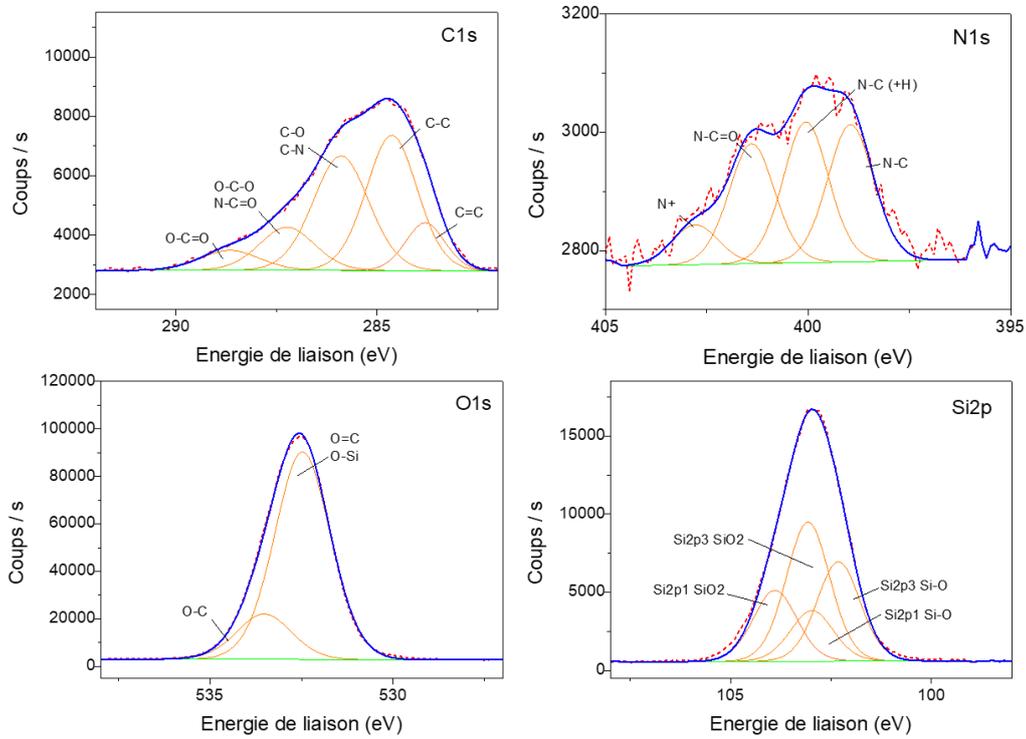
SiNP



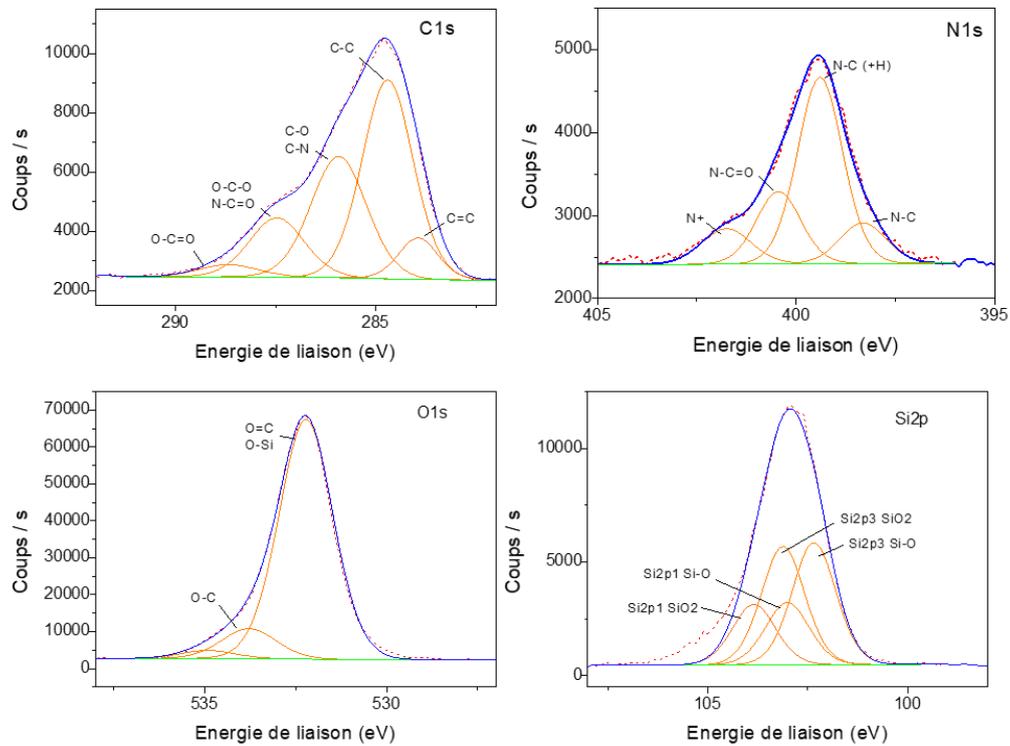
SiNP@CS1



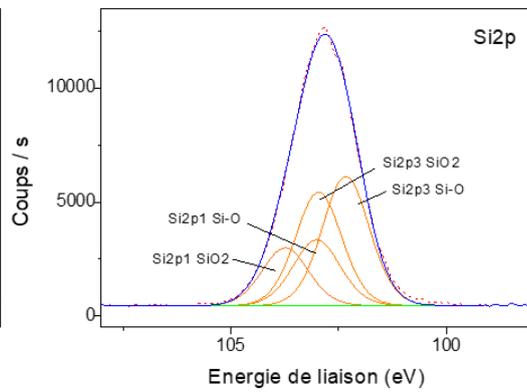
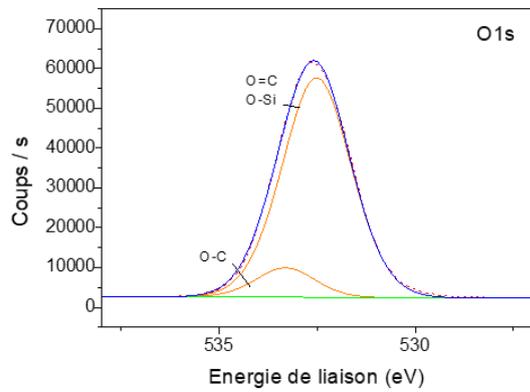
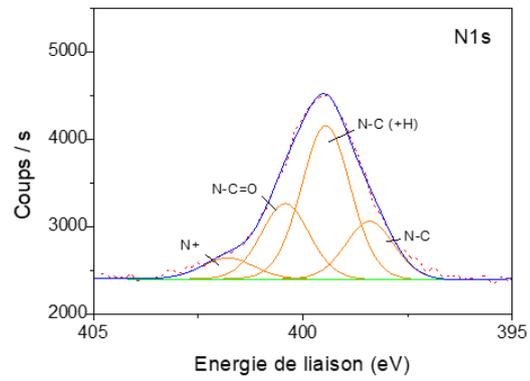
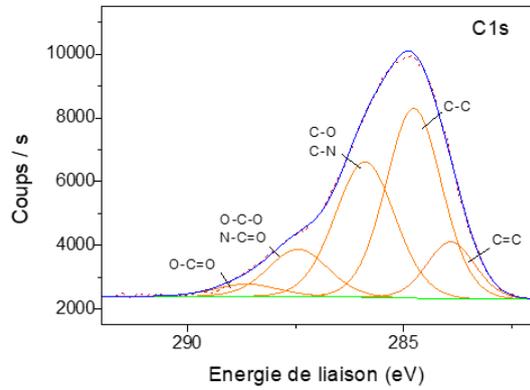
NPNG



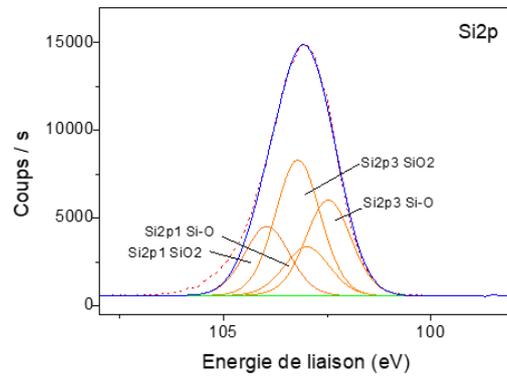
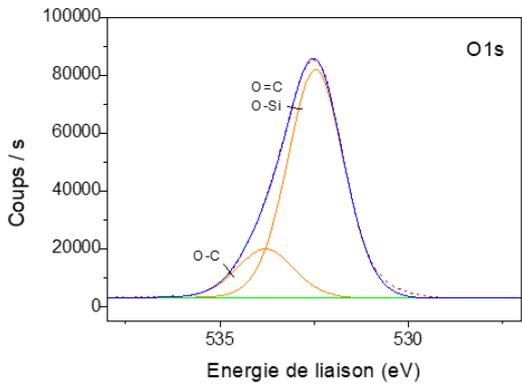
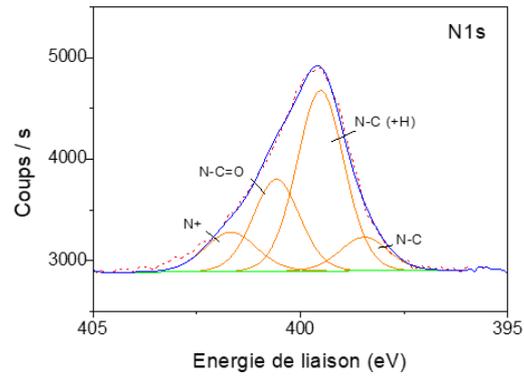
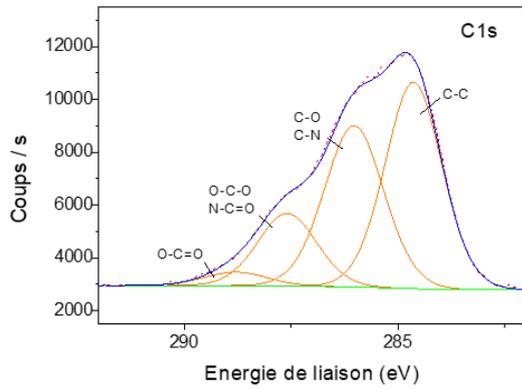
NPG Cov Eau



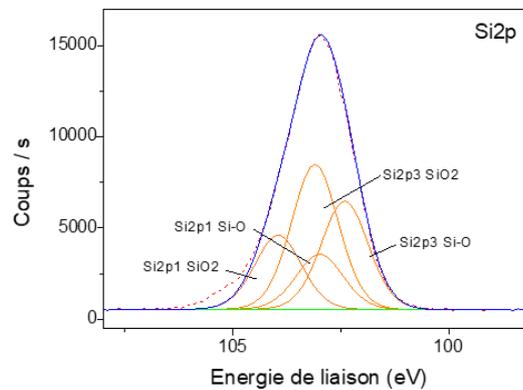
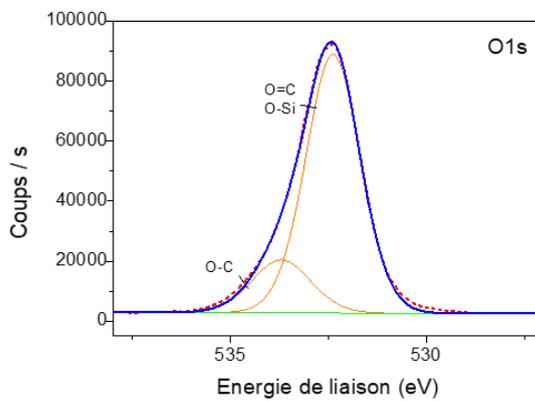
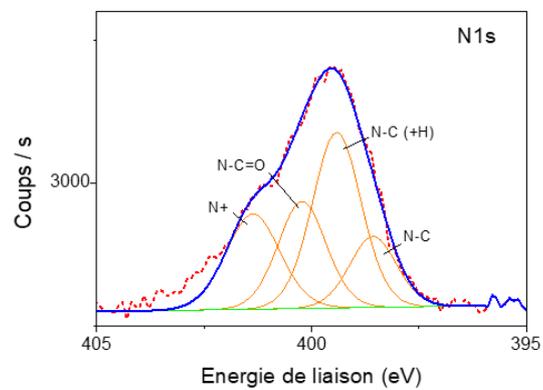
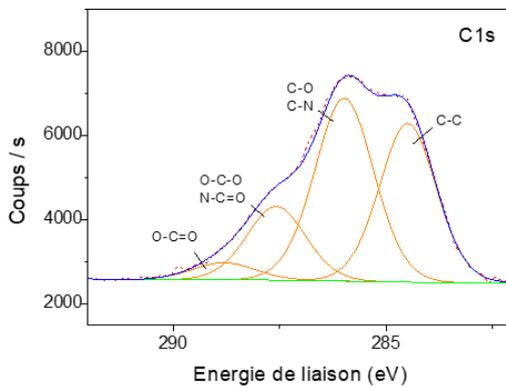
NPG Cov DMSO



NPG Ion Eau



NPG Ion DMSO



Annexe 5 : Principe des mesures Rhéolaser Crystal (Formulation)

Le Rhéolaser Crystal est une technologie dédiée à l'étude de la structure d'un produit, ses transitions de phases ou encore sa stabilité thermique, par la mesure du mouvement Brownien des particules. La mesure est basée sur la rétrodiffusion multiple de la lumière (Multi-Speckle Diffusing Wave Spectroscopy, MS-DWS).

En pratique, un laser est envoyé sur l'échantillon et est rétrodiffusé de manière multiple, ces signaux rétrodiffusés sont collectés par un détecteur afin d'obtenir une image interférentielle (Speckle image). Les images interférentielles obtenues au cours de la mesure sont traitées mathématiquement pour obtenir des courbes de décorrélation. Celles-ci sont caractérisées par un temps de caractéristique τ dont l'inverse est appelée la microdynamique (Hz).

La microdynamique (mD) d'un échantillon représente la dynamique locale du produit à l'échelle nanométrique, plus elle est grande plus les particules ont un mouvement rapide et inversement. Grâce à cet indice, des transitions de phase peuvent être observées au cours de rampe en température notamment (Figure 1)

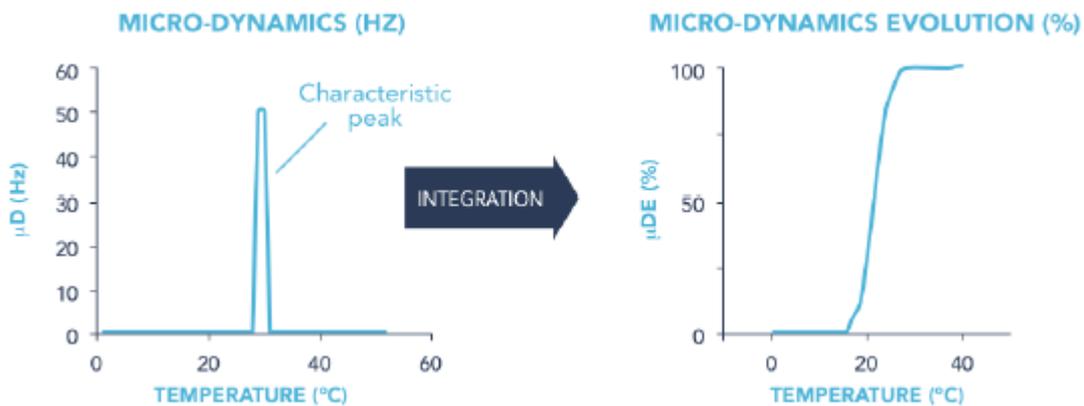


Figure 1 : Représentation schématique de la microdynamique et de la variation de la microdynamique en fonction de la température dans la mise en évidence d'une transition de phase. Reproduit du site web de l'entreprise Formulation.

Annexe 6 : Etude de la stabilité colloïdale par Turbiscan (Formulation)

Le Turbiscan permet d'identifier et de suivre les phénomènes de déstabilisation de dispersions. La mesure est basée sur **la diffusion multiple de la lumière**. En pratique, un faisceau laser ($\lambda=880$ nm) incident balaie l'échantillon de haut en bas à intervalles de temps réguliers et contrôlés et peut (Figure 1) :

- Traverser l'échantillon : dans ce cas, le faisceau transmis (T) est collecté par un détecteur à 180°
- Etre rétrodiffusé par l'échantillon : dans ce cas, le faisceau rétrodiffusé (*Backscattering*, BS), collecté par un détecteur à 45°

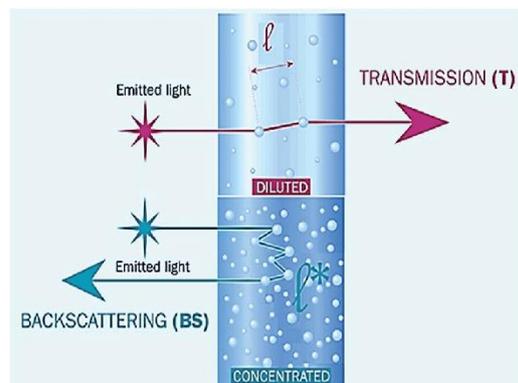


Figure 1 : Représentation schématique des faisceaux transmis (T) et rétrodiffusés (BS) en fonction de la concentration d'une dispersion. Reproduit de Lu et al. (RSC Adv. 7 (2017) 8118-8130)

Typiquement, pour une dispersion concentrée le signal BS est majoritaire car le faisceau a une plus grande probabilité de rencontrer des particules et d'être diffusé dans de multiples directions. Au contraire, pour une dispersion diluée, une grande fraction du faisceau incident traverse l'échantillon donc le signal T est majoritaire. L'interprétation des phénomènes de déstabilisation comme la sédimentation ou la variation de taille se fait à travers les variations relatives de ces deux signaux BS et T en fonction de la position du laser par rapport au tube. Un exemple de courbe obtenue dans ces travaux de thèse est montré ci-dessous (Figure 2) :

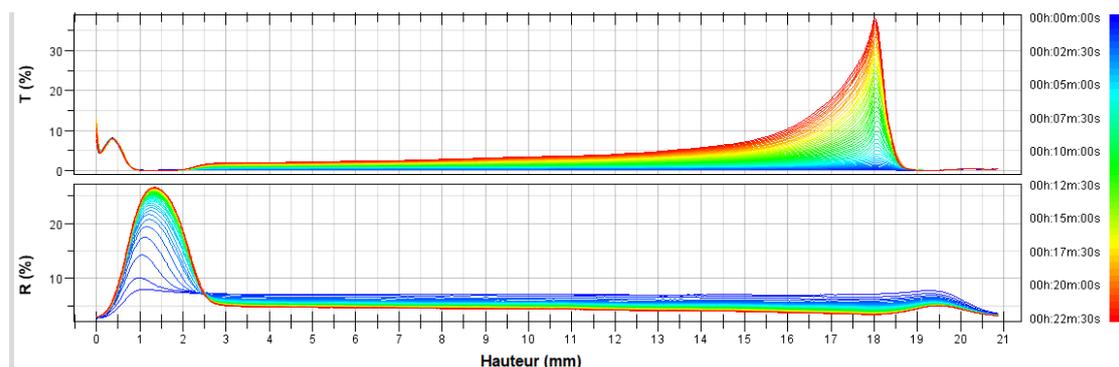


Figure 2 : Exemple de courbes de transmission (T%) et de rétrodiffusion (R%) obtenues sur les suspensions étudiées dans ces travaux de thèse.

La hauteur en mm correspond à la hauteur d'échantillon dans le tube : à 0 mm, il s'agit du fond du tube alors qu'à 21 mm il s'agit du ménisque de l'interface matière/air en haut du tube. Les différentes mesures acquises au cours du temps à intervalles réguliers sont représentées par le dégradé de couleur et permettent d'observer l'évolution des deux signaux dans le temps.

Annexe 7 : Relaxométrie T2 par l'Acorn Area de Xigo Nanotools

L'appareil Acorn Area permet de mesurer les surfaces spécifiques mouillées de nanoparticules en dispersion dans un liquide. Cette méthode de RMN, dite à bas champ (13 MHz) contrairement aux autres mesures de surfaces spécifiques couramment utilisées, se fait en dispersion sur des échantillons liquides ce qui est un avantage pour beaucoup d'applications où la mesure sur des particules sèches n'est pas représentative.

La mesure est basée sur la différence de réponse dans un champ magnétique alterné des molécules de liquide au contact de la surface solide des particules par rapport aux molécules du liquide « libre ». En effet, le temps de relaxation du liquide à la surface des particules est plus court que celui du liquide éloigné des particules.

En pratique, l'échantillon est introduit sans dilution requise dans un tube et placé au sein d'une bobine (Figure 1). Un champ magnétique uniforme B_0 est appliqué afin d'aligner les spins des protons. Ensuite, un pulse de radiofréquences courtes est appliqué pour exciter la bobine à une fréquence de 13 MHz. Comme toute RMN, ce champ magnétique va induire un décalage dans l'orientation des spins des protons. Lorsque le champ induit est arrêté, les protons vont se réaligner avec le champ initial B_0 . Ce réalignement est caractérisé par deux temps de relaxation, T1 (longitudinal) et T2 (transverse), ces deux grandeurs sont mesurées par l'appareil. A partir de T2, on peut remonter à la surface spécifique via la relation suivante : $1/T_2 = S \cdot k_a \cdot \Psi_p + 1/T_b$ avec S la surface spécifique, Ψ_p le ratio volumique en particule, T_b le temps de relaxation du solvant seul, k_a le coefficient de relativité qui dépend de la propriété de surface des particules et de ses interactions avec le solvant.

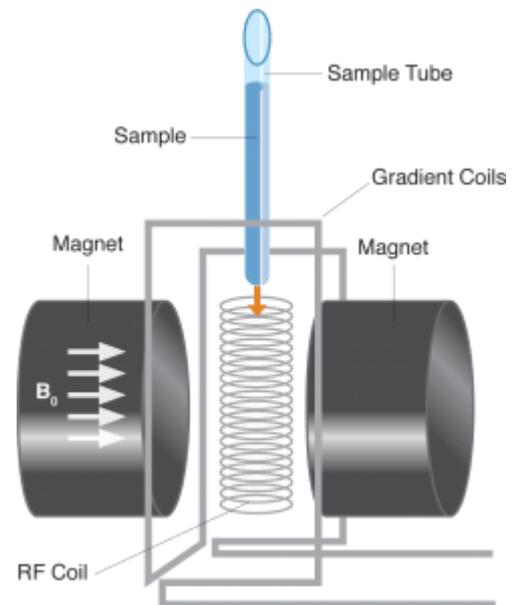


Figure 1 : Principe de la mesure de surface spécifique avec un appareil Acorn Area. Reproduit du site web de l'entreprise Xigo Nanotools

Références

1. Latorre, A., Couleaud, P., Aires, A., Cortajarena, A. L. & Somoza, Á. Multifunctionalization of magnetic nanoparticles for controlled drug release: A general approach. *Eur. J. Med. Chem.* **82**, 355–362 (2014).
2. Qi Lim, W., Fiona Phua, S. Z., Victor Xu, H., Sreejith, S. & Zhao, Y. Recent advances in multifunctional silica-based hybrid nanocarriers for bioimaging and cancer therapy. *Nanoscale* **8**, 12510–12519 (2016).
3. Bressler, E. M. *et al.* Biomimetic peptide display from a polymeric nanoparticle surface for targeting and antitumor activity to human triple-negative breast cancer cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **106**, 1753–1764 (2018).
4. Vauthier, C. Polymer Nanoparticles for In Vivo Applications: Progress on Preparation Methods and Future Challenges. in *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines: A Guide for their Design, Preparation and Development* (eds. Vauthier, C. & Ponchel, G.) 3–16 (Springer International Publishing, 2016)..
5. Shelke, N. B., James, R., Laurencin, C. T. & Kumbar, S. G. Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering. *Polym. Adv. Technol.* **25**, 448–460 (2014).
6. Jin, M., Shi, J., Zhu, W., Yao, H. & Wang, D.-A. Polysaccharide-Based Biomaterials in Tissue Engineering: A Review. *Tissue Eng. Part B Rev.* (2020)
7. Sood, A., Gupta, A. & Agrawal, G. Recent advances in polysaccharides based biomaterials for drug delivery and tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **2**, 100067 (2021).
8. Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D. & Bouriotis, V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18**, 305–312 (2000).
9. Younes, I. & Rinaudo, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar. Drugs* **13**, 1133–1174 (2015).
10. Alves, N. M. & Mano, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **43**, 401–414 (2008).
11. Ji, J. *et al.* Chemical Modifications of Chitosan and Its Applications. *Polym.-Plast. Technol. Eng.* **53**, 1494–1505 (2014).
12. Wang, W. *et al.* Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 487 (2020).
13. Ong, S.-Y., Wu, J., Moochhala, S. M., Tan, M.-H. & Lu, J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials* **29**, 4323–4332 (2008).
14. Kean, T. & Thanou, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 3–11 (2010).
15. Bay Stie, M. *et al.* Delivery of proteins encapsulated in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles to human skin melanoma cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* (2018)
16. Ramesh, Y. & Sireesha, V. TRANSDERMAL PATCH OF RAMIPRIL LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES DISPERSED IN CARBOPOL GEL. *J. Drug Deliv. Ther.* **7**, 56–65 (2017).
17. Yang, X. *et al.* Immune Adjuvant Targeting Micelles Allow Efficient Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes for Enhanced Cellular Immunity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 33532–33544 (2018).
18. Ossipov, D. A., Piskounova, S., Varghese, O. P. & Hilborn, J. Functionalization of Hyaluronic Acid with Chemoselective Groups via a Disulfide-Based Protection Strategy for *In situ* Formation of Mechanically Stable Hydrogels. *Biomacromolecules* **11**, 2247–2254 (2010).
19. Lim, H. J. *et al.* Response to di-functionalized hyaluronic acid with orthogonal chemistry grafting at independent modification sites in rodent models of neural differentiation and spinal cord injury. *J. Mater. Chem. B* **4**, 6865–6875 (2016).
20. Day, A. J. & de la Motte, C. A. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol.* **26**, 637–643 (2005).
21. West, D. C. & Kumar, S. Hyaluronan and Angiogenesis. in *Ciba Foundation Symposium 143 - The Biology of Hyaluronan* 187–207 (John Wiley & Sons, Ltd).
22. Uthaman, S. *et al.* IR 780-loaded hyaluronic acid micelles for enhanced tumor-targeted photothermal therapy. *Carbohydr. Polym.* **181**, 1–9 (2018).

23. Lv, Y. *et al.* Nanoplatfrom Assembled from a CD44-Targeted Prodrug and Smart Liposomes for Dual Targeting of Tumor Microenvironment and Cancer Cells. *ACS Nano* **12**, 1519–1536 (2018).
24. Liu, Y. *et al.* CD44 Receptor Targeting and Endosomal pH-Sensitive Dual Functional Hyaluronic Acid Micelles for Intracellular Paclitaxel Delivery. *Mol. Pharm.* **13**, 4209–4221 (2016).
25. Park, J., Kim, J., Hwang, S. R., Mahmud, F. & Byun, Y. Chemical Conjugate of Low Molecular Weight Heparin and Suramin Fragment Inhibits Tumor Growth Possibly by Blocking VEGF165. *Mol. Pharm.* **12**, 3935–3942 (2015).
26. Wang, L. *et al.* Interfacial Self-Assembly of Heparin-Mimetic Multilayer on Membrane Substrate as Effective Antithrombotic, Endothelialization, and Antibacterial Coating. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **1**, 1183–1193 (2015).
27. Gonzalez, D., Ragusa, J., Angeletti, P. C. & Larsen, G. Preparation and characterization of functionalized heparin-loaded poly- ϵ -caprolactone fibrous mats to prevent infection with human papillomaviruses. *PLOS ONE* **13**, e0199925 (2018).
28. Wan, X. *et al.* Poly(ϵ -caprolactone)/keratin/heparin/VEGF biocomposite mats for vascular tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* **108**, 292–300 (2020).
29. Liang, Y. & Kiick, K. L. Heparin-functionalized polymeric biomaterials in tissue engineering and drug delivery applications. *Acta Biomater.* **10**, 1588–1600 (2014).
30. Wu, W. *et al.* Bioreducible heparin-based nanogel drug delivery system. *Biomaterials* **39**, 260–268 (2015).
31. Choi, W. I. *et al.* Bioinspired Heparin Nanosponge Prepared by Photo-crosslinking for Controlled Release of Growth Factors. *Sci. Rep.* **7**, 14351 (2017).
32. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 106–126 (2012).
33. Hou, J., Li, C., Guan, Y., Zhang, Y. & Zhu, X. X. Enzymatically crosslinked ALG hydrogels with improved adhesion properties. *Polym. Chem.* **6**, 2204–2213 (2015).
34. Passemar, S. *et al.* Synthesis Strategies to Extend the Variety of Alginate-Based Hybrid Hydrogels for Cell Microencapsulation. *Biomacromolecules* **18**, 2747–2755 (2017).
35. Szabó, L., Gerber-Lemaire, S. & Wandrey, C. Strategies to Functionalize the Anionic Biopolymer Na-Alginate without Restricting Its Polyelectrolyte Properties. *Polymers* **12**, 919 (2020).
36. Guo, H., de Magalhaes Goncalves, M., Ducouret, G. & Hourdet, D. Cold and Hot Gelling of Alginate-graft-PNIPAM: a Schizophrenic Behavior Induced by Potassium Salts. *Biomacromolecules* **19**, 576–587 (2018).
37. Yu, C.-Y. *et al.* Fabrication of Nanospheres and Vesicles as Drug Carriers by Self-Assembly of Alginate. *J. Phys. Chem. C* **112**, 16774–16778 (2008).
38. Sonavane, G. S. & Devarajan, P. V. Preparation of Alginate Nanoparticles Using Eudragit E100 as a New Complexing Agent: Development, In-Vitro, and In-Vivo Evaluation. *J. Biomed. Nanotechnol.* **3**, 160–169 (2007).
39. Boddohi, S., Moore, N., Johnson, P. A. & Kipper, M. J. Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Complex Nanoparticles from Chitosan, Heparin, and Hyaluronan. *Biomacromolecules* **10**, 1402–1409 (2009).
40. Prasher, P. *et al.* Current-status and applications of polysaccharides in drug delivery systems. *Colloid Interface Sci. Commun.* **42**, 100418 (2021).
41. Kickelbick, G. Introduction to Hybrid Materials. in *Hybrid Materials* 1–48 (John Wiley & Sons, Ltd, 2006).
42. Caseri, W. Nanocomposites of Polymers and Inorganic Particles. in *Hybrid Materials* 49–86 (John Wiley & Sons, Ltd, 2006).
43. Blanco-Andujar, C. *et al.* Design of iron oxide-based nanoparticles for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomed.* **11**, 1889–1910 (2016).
44. Norouzi, H. & Khoshgard, K. Review of mechanisms and recent advances in cancer photo thermal therapy. *Iran. J. Med. Phys.* **15**, 464–464 (2018).
45. Chatterjee, K., Sarkar, S., Jagajjanani Rao, K. & Paria, S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **209**, 8–39 (2014).

46. Ferreira, P., Alves, P., Coimbra, P. & Gil, M. H. Improving polymeric surfaces for biomedical applications: a review. *J. Coat. Technol. Res.* **12**, 463–475 (2015).
47. Liu, C. *et al.* Encapsulation of Poly I:C and the natural phosphodiester CpG ODN enhanced the efficacy of a hyaluronic acid-modified cationic lipid-PLGA hybrid nanoparticle vaccine in TC-1-grafted tumors. *Int. J. Pharm.* **553**, 327–337 (2018).
48. Lee, P.-W. *et al.* Multifunctional core-shell polymeric nanoparticles for transdermal DNA delivery and epidermal Langerhans cells tracking. *Biomaterials* **31**, 2425–2434 (2010).
49. Chung, Y.-I., Tae, G. & Hong Yuk, S. A facile method to prepare heparin-functionalized nanoparticles for controlled release of growth factors. *Biomaterials* **27**, 2621–2626 (2006).
50. Wu, Y. *et al.* A core/shell stabilized polysaccharide-based nanoparticle with intracellular environment-sensitive drug delivery for breast cancer therapy. *J. Mater. Chem. B* **6**, 6646–6659 (2018).
51. Mertz, D., Sandre, O. & Bégin-Colin, S. Drug releasing nanoplatforms activated by alternating magnetic fields. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1861**, 1617–1641 (2017).
52. Dinc, M., Esen, C. & Mizaikoff, B. Recent advances on core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for biomacromolecules. *TrAC Trends Anal. Chem.* **114**, 202–217 (2019).
53. Sharifi, M. *et al.* Plasmonic gold nanoparticles: Optical manipulation, imaging, drug delivery and therapy. *J. Controlled Release* **311–312**, 170–189 (2019).
54. Nandan, E., Jana, N. R. & Ying, J. Y. Functionalization of Gold Nanospheres and Nanorods by Chitosan Oligosaccharide Derivatives. *Adv. Mater.* **20**, 2068–2073 (2008).
55. Kodiyann, A., Silva, E. A., Kim, J., Aizenberg, M. & Mooney, D. J. Surface Modification with Alginate-Derived Polymers for Stable, Protein-Repellent, Long-Circulating Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **6**, 4796–4805 (2012).
56. Cao, F., Yan, M., Liu, Y., Liu, L. & Ma, G. Photothermally Controlled MHC Class I Restricted CD8+ T-Cell Responses Elicited by Hyaluronic Acid Decorated Gold Nanoparticles as a Vaccine for Cancer Immunotherapy. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1701439 (2018).
57. Naz, S. *et al.* Enzyme-responsive mesoporous silica nanoparticles for tumor cells and mitochondria multistage-targeted drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* **14**, 2533–2542 (2019).
58. Hu, Y. *et al.* Anti-miRNA21 and resveratrol-loaded polysaccharide-based mesoporous silica nanoparticle for synergistic activity in gastric carcinoma. *J. Drug Target.* **27**, 1135–1143 (2019).
59. Argyo, C. *et al.* Heparin-Coated Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles Efficiently Bind to Antithrombin as an Anticoagulant Drug-Delivery System. *Chem. – Eur. J.* **18**, 428–432 (2012).
60. Yuan, N., Li, S. & Li, G. Sodium ALG coated mesoporous silica for dual bio-responsive controlled drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **46**, 348–353 (2018).
61. Narayan, R. *et al.* Chitosan-glucuronic acid conjugate coated mesoporous silica nanoparticles: A smart pH-responsive and receptor-targeted system for colorectal cancer therapy. *Carbohydr. Polym.* **261**, 117893 (2021).
62. Liang, Y.-H. *et al.* Cosynthesis of Cargo-Loaded Hydroxyapatite/Alginate Core-Shell Nanoparticles (HAP@Alg) as pH-Responsive Nanovehicles by a Pre-gel Method. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 6720–6727 (2012).
63. Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **277**, 1232–1237 (1997).
64. Stockton, W. B. & Rubner, M. F. Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions. *Macromolecules* **30**, 2717–2725 (1997).
65. Chen, J. & Cao, W. Fabrication of a covalently attached self-assembly multilayer film via H-bonding attraction and subsequent UV-irradiation. *Chem. Commun.* **0**, 1711–1712 (1999).
66. Kotov, N. A. Layer-by-layer self-assembly: The contribution of hydrophobic interactions. *Nanostructured Mater.* **12**, 789–796 (1999).
67. Caruso, F., Caruso, R. A. & Möhwald, H. Nanoengineering of Inorganic and Hybrid Hollow Spheres by Colloidal Templating. *Science* **282**, 1111–1114 (1998).

68. Sukhorukov, G. B. *et al.* Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **137**, 253–266 (1998).
69. Caruso, F. Nanoengineering of Particle Surfaces. *Adv. Mater.* **13**, 11–22 (2001).
70. Skirtach, A. G., Yashchenok, A. M. & Möhwald, H. Encapsulation, release and applications of LbL polyelectrolyte multilayer capsules. *Chem. Commun.* **47**, 12736–12746 (2011).
71. Tang, Z., Wang, Y., Podsiadlo, P. & Kotov, N. A. Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering. *Adv. Mater.* **18**, 3203–3224 (2006).
72. Lvov, Y., Ariga, K. & Kunitake, T. Layer-by-Layer Assembly of Alternate Protein/Polyion Ultrathin Films. *Chem. Lett.* **23**, 2323–2326 (1994).
73. Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I. & Kunitake, T. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6117–6123 (1995).
74. Boulmedais, F. *et al.* Buildup of Exponentially Growing Multilayer Polypeptide Films with Internal Secondary Structure. *Langmuir* **19**, 440–445 (2003).
75. Lvov, Y., Decher, G. & Sukhorukov, G. Assembly of thin films by means of successive deposition of alternate layers of DNA and poly(allylamine). *Macromolecules* **26**, 5396–5399 (1993).
76. Yang, Y.-J. *et al.* Mesoporous silica nanotubes coated with multilayered polyelectrolytes for pH-controlled drug release. *Acta Biomater.* **6**, 3092–3100 (2010).
77. Feng, W. *et al.* Effect of pH-Responsive Alginate/Chitosan Multilayers Coating on Delivery Efficiency, Cellular Uptake and Biodistribution of Mesoporous Silica Nanoparticles Based Nanocarriers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 8447–8460 (2014).
78. Du, P., Zhao, X., Zeng, J., Guo, J. & Liu, P. Layer-by-layer engineering fluorescent polyelectrolyte coated mesoporous silica nanoparticles as pH-sensitive nanocarriers for controlled release. *Appl. Surf. Sci.* **345**, 90–98 (2015).
79. Jardim, K. V. *et al.* Novel magneto-responsive nanoplatforms based on MnFe₂O₄ nanoparticles layer-by-layer functionalized with chitosan and sodium ALG for magnetic controlled release of curcumin. *Mater. Sci. Eng. C* **92**, 184–195 (2018).
80. Chai, F. *et al.* Doxorubicin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles coated with chitosan/ALG by layer by layer technology for antitumor applications. *Int. J. Nanomedicine* **12**, 1791–1802 (2017).
81. Chatelet, C., Damour, O. & Domard, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* **22**, 261–268 (2001).
82. Pangburn, S. H., Trescony, P. V. & Heller, J. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials* **3**, 105–108 (1982).
83. Vårum, K. M., Myhr, M. M., Hjerde, R. J. N. & Smidsrød, O. In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydr. Res.* **299**, 99–101 (1997).
84. Antunes, B. P., Moreira, A. F., Gaspar, V. M. & Correia, I. J. Chitosan/arginine–chitosan polymer blends for assembly of nanofibrous membranes for wound regeneration. *Carbohydr. Polym.* **130**, 104–112 (2015).
85. Torkaman, S., Rahmani, H., Ashori, A. & Najafi, S. H. M. Modification of chitosan using amino acids for wound healing purposes: A review. *Carbohydr. Polym.* **258**, 117675 (2021).
86. Conzatti, G., Ayadi, F., Cavalie, S., Carrère, N. & Tourrette, A. Thermosensitive PNIPAM grafted ALG/chitosan PEC. *Appl. Surf. Sci.* **467–468**, 940–948 (2019).
87. Bushkalova, R. *et al.* Alginate-chitosan PEC scaffolds: A useful tool for soft tissues cell therapy. *Int. J. Pharm.* **571**, 118692 (2019).
88. Yanagisawa, M., Kato, Y., Yoshida, Y. & Isogai, A. SEC-MALS study on aggregates of chitosan molecules in aqueous solvents: Influence of residual N-acetyl groups. *Carbohydr. Polym.* **66**, 192–198 (2006).
89. Thevarajah, J. J., Bulanadi, J. C., Wagner, M., Gaborieau, M. & Castignolles, P. Towards a less biased dissolution of chitosan. *Anal. Chim. Acta* **258–268** (2016).
90. Hwang, J.-K. & Shin, H.-H. Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Aust. Rheol. J.* **12**, 175–179 (2000).

91. Kasaai, M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr. Polym.* **68**, 477–488 (2007).
92. Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K. & Wong, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta* **45**, 713–719 (1998).
93. Shigemasa, Y., Matsuura, H., Sashiwa, H. & Saimoto, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *Int. J. Biol. Macromol.* **18**, 237–242 (1996).
94. Kasaai, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **71**, 497–508 (2008).
95. Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrières, J., Versali, M.-F. & Rinaudo, M. Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* **1**, 746–751 (2000).
96. Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I. & Nasri, M. Extraction and Characterization of Chitin, Chitosan, and Protein Hydrolysates Prepared from Shrimp Waste by Treatment with Crude Protease from *Bacillus cereus* SV1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**, 345–357 (2010).
97. Rocha Neto, J. B. M. *et al.* Controlling antimicrobial activity and drug loading capacity of chitosan-based layer-by-layer films. *Int. J. Biol. Macromol.* **172**, 154–161 (2021).
98. Meng, S. & Liu, Y. Alginate block fractions and their effects on membrane fouling. *Water Res.* **47**, 6618–6627 (2013).
99. Sreeram, K. J., Yamini Shrivastava, H. & Nair, B. U. Studies on the nature of interaction of iron(III) with alginates. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1670**, 121–125 (2004).
100. Rezende, R. A., Bártolo, P. J., Mendes, A. & Filho, R. M. Rheological behavior of ALG solutions for biomanufacturing. *J. Appl. Polym. Sci.* **113**, 3866–3871 (2009).
101. Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., Zanetti, F. & Paoletti, S. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydr. Polym.* **15**, 171–193 (1991).
102. Zhong, D., Huang, X., Yang, H. & Cheng, R. New insights into viscosity abnormality of sodium ALG aqueous solution. *Carbohydr. Polym.* **81**, 948–952 (2010).
103. Prieto, J. M., Mellinas-Gomez, M. & Zloh, M. Application of diffusion-edited and solvent suppression ¹H-NMR to the direct analysis of markers in valerian-hop liquid herbal products. *Phytochem. Anal. PCA* **27**, 100–106 (2016).
104. Application of diffusion-edited NMR spectroscopy for selective suppression of water signal in the determination of monomer composition in alginates - Vilén - 2011 - Magnetic Resonance in Chemistry - Wiley Online Library.
105. Grasdalen, H. High-field, ¹H-n.m.r. spectroscopy of ALG: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydr. Res.* **118**, 255–260 (1983).
106. Vilén, E. M., Klinger, M. & Sandström, C. Application of diffusion-edited NMR spectroscopy for selective suppression of water signal in the determination of monomer composition in alginates. *Magn. Reson. Chem.* **49**, 584–591 (2011).
107. Salomonsen, T., Jensen, H. M., Stenbæk, D. & Engelsen, S. B. Chemometric prediction of ALG monomer composition: A comparative spectroscopic study using IR, Raman, NIR and NMR. *Carbohydr. Polym.* **72**, 730–739 (2008).
108. Becherán-Marón, L., Peniche, C. & Argüelles-Monal, W. Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and ALG: influence of ALG composition and chitosan molecular weight. *Int. J. Biol. Macromol.* **34**, 127–133 (2004).
109. Croissant, J. G., Butler, K. S., Zink, J. I. & Brinker, C. J. Synthetic amorphous silica nanoparticles: toxicity, biomedical and environmental implications. *Nat. Rev. Mater.* **5**, 886–909 (2020).
110. Sing, K. S. W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure Appl. Chem.* **57**, 603–619 (1985).
111. Tarn, D. *et al.* Mesoporous Silica Nanoparticle Nanocarriers: Biofunctionality and Biocompatibility. *Acc. Chem. Res.* **46**, 792–801 (2013).

112. Lagarrigue, P. Nanocomposites bioverre/polyester pour le développement de scaffolds macroporeux par freeze-casting: vers le traitement de l'ostéoradionécrose mandibulaire. (Toulouse, INPT, 2017).
113. Hoffmann, F. & Fröba, M. Vitalising porous inorganic silica networks with organic functions—PMOs and related hybrid materials. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 608–620 (2011).
114. Lagarrigue, P. *et al.* Well-defined polyester-grafted silica nanoparticles for biomedical applications: Synthesis and quantitative characterization. *Polymer* **211**, 123048 (2020).
115. Du, P., Zhao, X., Zeng, J., Guo, J. & Liu, P. Layer-by-layer engineering fluorescent polyelectrolyte coated mesoporous silica nanoparticles as pH-sensitive nanocarriers for controlled release. *Appl. Surf. Sci.* **345**, 90–98 (2015).
116. Dubas, S. T. & Schlenoff, J. B. Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers. *Macromolecules* **32**, 8153–8160 (1999).
117. Georgieva, R., Dimova, R., Sukhorukov, G., Ibarz, G. & Möhwald, H. Influence of different salts on micro-sized polyelectrolyte hollow capsules. *J. Mater. Chem.* **15**, 4301–4310 (2005).
118. Kharlampieva, E., Kozlovskaya, V. & Sukhishvili, S. A. Layer-by-Layer Hydrogen-Bonded Polymer Films: From Fundamentals to Applications. *Adv. Mater.* **21**, 3053–3065 (2009).
119. Salve, R., Kumar, P., Ngamcherdtrakul, W., Gajbhiye, V. & Yantasee, W. Stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles: A custom-tailored next generation approach in cargo delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **124**, 112084 (2021).
120. Kato, Y. *et al.* Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* **13**, 89 (2013).
121. Bordat, A., Boissenot, T., Nicolas, J. & Tsapis, N. Thermoresponsive polymer nanocarriers for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **138**, 167–192 (2019).
122. Ward, M. A. & Georgiou, T. K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers* **3**, 1215–1242 (2011).
123. Graham, S., Marina, P. F. & Blencowe, A. Thermoresponsive polysaccharides and their thermoreversible physical hydrogel networks. *Carbohydr. Polym.* **207**, 143–159 (2019).
124. Chen, J.-P., Tsai, M.-J. & Liao, H.-T. Incorporation of biphasic calcium phosphate microparticles in injectable thermoresponsive hydrogel modulates bone cell proliferation and differentiation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **110**, 120–129 (2013).
125. Ifuku, S., Miwa, T., Morimoto, M. & Saimoto, H. Thermoresponsive chitosan/N-isopropylacrylamide copolymer through atom transfer radical polymerization. *Int. J. Biol. Macromol.* **52**, 14–19 (2013).
126. Kim, S. Y., Cho, S. M., Lee, Y. M. & Kim, S. J. Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide. *J. Appl. Polym. Sci.* **78**, 1381–1391 (2000).
127. Mellati, A., Dai, S., Bi, J., Jin, B. & Zhang, H. A biodegradable thermosensitive hydrogel with tuneable properties for mimicking three-dimensional microenvironments of stem cells. *RSC Adv.* **4**, 63951–63961 (2014).
128. Mellati, A. *et al.* Microengineered 3D cell-laden thermoresponsive hydrogels for mimicking cell morphology and orientation in cartilage tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 217–231 (2017).
129. Fernández-Quiroz, D. *et al.* Effect of the molecular architecture on the thermosensitive properties of chitosan-*g*-poly(N-vinylcaprolactam). *Carbohydr. Polym.* **134**, (2015).
130. Fernández-Quiroz, D. *et al.* Conformational study on the thermal transition of chitosan-*g*-poly(N-vinylcaprolactam) in aqueous solution. *Colloid Polym. Sci.* **294**, 555–563 (2016).
131. Fernández-Quiroz, D. *et al.* Temperature stimuli-responsive nanoparticles from chitosan-graft-poly(N-vinylcaprolactam) as a drug delivery system. *J. Appl. Polym. Sci.* **136**, 47831 (2019).
132. Safakas, K., Saravanou, S.-F., Iatridi, Z. & Tsitsilianis, C. Alginate-*g*-PNIPAM-Based Thermo/Shear-Responsive Injectable Hydrogels: Tailoring the Rheological Properties by Adjusting the LCST of the Grafting Chains. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3824 (2021).
133. Ciocoiu, O.-N., Staikos, G. & Vasile, C. Thermoresponsive behavior of sodium ALG grafted with poly(N-isopropylacrylamide) in aqueous media. *Carbohydr. Polym.* **184**, 118–126 (2018).
134. Swamy, B. Y., Chang, J. H., Ahn, H., Lee, W.-K. & Chung, I. Thermoresponsive N-vinyl caprolactam grafted sodium ALG hydrogel beads for the controlled release of an anticancer drug. *Cellulose* **20**, 1261–1273 (2013).

135. Li, D., Xu, L., Wang, J. & Gautrot, J. E. Responsive Polymer Brush Design and Emerging Applications for Nanotheranostics. *Adv. Healthc. Mater.* **10**, 2000953 (2021).
136. Hansson, S. *et al.* Grafting Efficiency of Synthetic Polymers onto Biomaterials: A Comparative Study of Grafting-from versus Grafting-to. *Biomacromolecules* **14**, 64–74 (2013).
137. Beija, M., Marty, J.-D. & Destarac, M. RAFT/MADIX polymers for the preparation of polymer/inorganic nanohybrids. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 845–886 (2011).
138. Huang, C.-F. Surface-initiated atom transfer radical polymerization for applications in sensors, non-biofouling surfaces and adsorbents. *Polym. J.* **48**, 341–350 (2016).
139. Conzatti, G. *et al.* PNIPAM grafted surfaces through ATRP and RAFT polymerization: Chemistry and bioadhesion. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **151**, 143–155 (2017).
140. Chung, P.-W., Kumar, R., Pruski, M. & Lin, V. S.-Y. Temperature Responsive Solution Partition of Organic–Inorganic Hybrid Poly(N-isopropylacrylamide)-Coated Mesoporous Silica Nanospheres. *Adv. Funct. Mater.* **18**, 1390–1398 (2008).
141. Zhu, M.-Q., Wang, L.-Q., Exarhos, G. J. & Li, A. D. Q. Thermosensitive Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2656–2657 (2004).
142. Montalbetti, C. A. G. N. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).
143. Pattabiraman, V. R. & Bode, J. W. Rethinking amide bond synthesis. *Nature* **480**, 471–479 (2011).
144. Chen, J.-P. & Cheng, T.-H. Thermo-responsive chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) injectable hydrogel for cultivation of chondrocytes and meniscus cells. *Macromol. Biosci.* **6**, 1026–1039 (2006).
145. Chen, H. *et al.* Grafting Chitosan with Polyethylenimine in an Ionic Liquid for Efficient Gene Delivery. *PLOS ONE* **10**, e0121817 (2015).
146. Conzatti, G. Biomatériaux pour application chirurgicale : élaboration et fonctionnalisation pour une bioadhésion thermorégulée. (Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2017).
147. Nakajima, N. & Ikada, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjug. Chem.* **6**, 123–130 (1995).
148. Suchao-in, N., Chirachanchai, S. & Perrier, S. pH- and thermo-multi-responsive fluorescent micelles from block copolymers via reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. *Polymer* **50**, 4151–4158 (2009).
149. Vandendriessche, J. *et al.* Configurational and conformational aspects in the excimer formation of bis(carbazoles). *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 8057–8064 (1984).
150. Granite. Raman Scattering in Fluorescence Emission Spectra | Common Errors. *Edinburgh Instruments* <https://www.edinst.com/blog/raman-scattering-blog/>.
151. Takata, S., Shibayama, M., Sasabe, R. & Kawaguchi, H. Preparation and structure characterization of hairy nanoparticles consisting of hydrophobic core and thermosensitive hairs. *Polymer* **44**, 495–501 (2003).
152. Zheng, Y., Wang, L., Lu, L., Wang, Q. & Benicewicz, B. C. pH and Thermal Dual-Responsive Nanoparticles for Controlled Drug Delivery with High Loading Content. *ACS Omega* **2**, 3399–3405 (2017).
153. Chen, K. *et al.* Conformation Study of Dual Stimuli-Responsive Core-Shell Diblock Polymer Brushes. *Polymers* **10**, 1084 (2018).
154. Taylor, M. J., Tomlins, P. & Sahota, T. S. Thermoresponsive Gels. *Gels* **3**, 4 (2017).
155. Minami, S., Suzuki, D. & Urayama, K. Rheological aspects of colloidal gels in thermoresponsive microgel suspensions: formation, structure, and linear and nonlinear viscoelasticity. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **43**, 113–124 (2019).
156. Qi, X., Dong, Y., Wang, H., Wang, C. & Li, F. Application of Turbiscan in the homoaggregation and heteroaggregation of copper nanoparticles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **535**, 96–104 (2017).
157. Qin, W. *et al.* Highly dispersible magnetic nanoparticles modified by double quaternary ammonium surfactants for efficient harvesting of oleaginous microalgae. *J. Clean. Prod.* **325**, 129297 (2021).
158. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
159. Shirley, D. A. High-Resolution X-Ray Photoemission Spectrum of the Valence Bands of Gold. *Phys. Rev. B* **5**, 4709–4714 (1972).

160. Scofield, J. H. Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **8**, 129–137 (1976).

Discussion générale

Cette discussion a pour objectif de résumer les résultats décrits dans ce manuscrit et de mettre en relation les deux parties de ce projet. Elle s'articulera en plusieurs temps. Tout d'abord, la stratégie sera rappelée, ainsi que les principaux résultats obtenus dans chacune des deux parties. Une discussion sera alors apportée afin de faire le lien entre elles, puis un regard critique sera posé sur les résultats. Enfin, des perspectives d'amélioration à court et long terme seront proposées.

L'objectif de ce projet de thèse a été de mettre en forme un biomatériau en jouant sur les propriétés d'auto-assemblage thermo-induites de nanoparticules composites inorganique/polysaccharides modifiées en surface par un copolymère à blocs thermosensible. La stratégie employée a été de mettre au point des nanoparticules à base de polysaccharides et de les fonctionnaliser (Partie 2) avec un polymère thermorépondant précédemment synthétisé (Partie 1) pour évaluer leurs propriétés thermosensibles en suspension (Schéma 1).

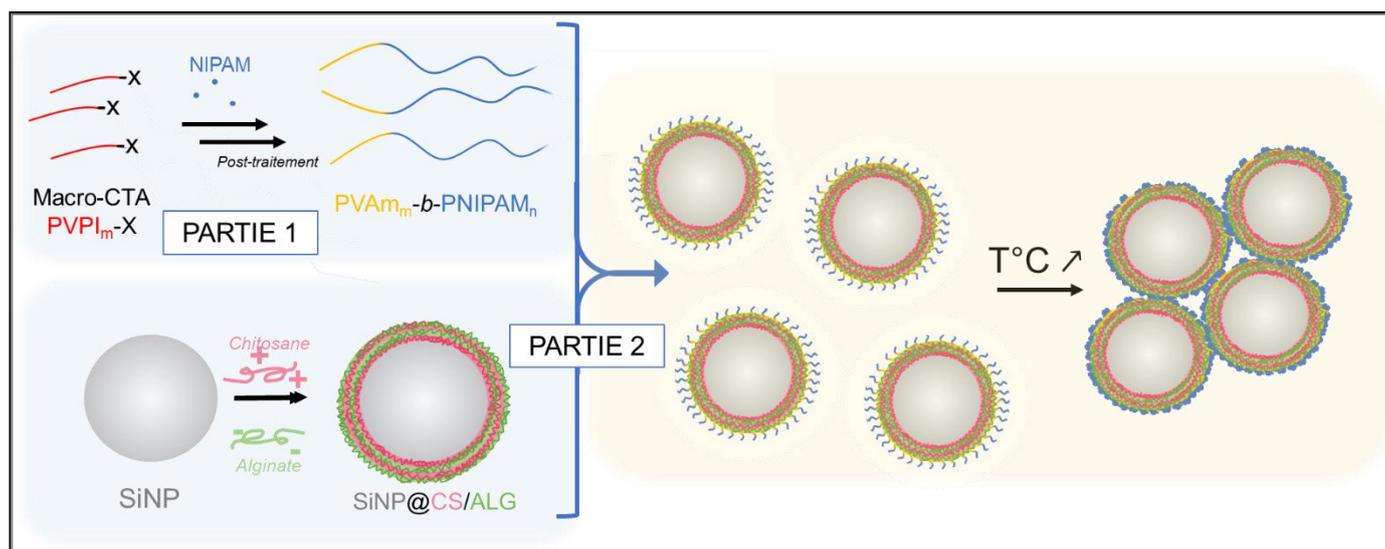


Schéma 1 Représentation schématique de la stratégie globale du projet de thèse avec la mise en forme des nanoparticules à base de polysaccharides et de leur fonctionnalisation (Partie 2) avec un polymère thermorépondant précédemment synthétisé (Partie 1) pour évaluer leurs propriétés thermosensibles en suspension

La Partie 1 de ce manuscrit a permis de décrire la synthèse et la caractérisation physico-chimique d'un copolymère à blocs double hydrophile, pH- et thermosensible. En effet, pour répondre au cahier des charges de modification de surface des nanoparticules, nous avons besoin de synthétiser un copolymère présentant à la fois une thermosensibilité, et un bloc fonctionnel permettant son greffage à la surface des particules. Nous avons ainsi synthétisé les copolymères $PVAm_m-b-PNIPAM_n$ par polymérisation RAFT/MADIX d'un dibloc poly(vinyl phtalimide) $_m-b-$

poly(N-isopropylacrylamide)_n (PVPI_m-*b*-PNIPAM_n), suivie de l'hydrazinolyse du bloc PVPI pour obtenir la PVAm en s'appuyant sur un protocole existant dans la littérature.¹ Les polymères synthétisés, de compositions théoriques PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ et PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀, ont été caractérisés par SEC et RMN et ont les compositions expérimentales suivantes : PVAm₁₁-*b*-PNIPAM₆₄ ($M_n = 6900$ g/mol) et PVAm₁₇-*b*-PNIPAM₁₁₀ ($M_n = 15400$ g/mol).

La polymérisation du dibloc PVPI₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ a particulièrement été étudiée. Un suivi cinétique de la polymérisation du NIPAM à partir du macro-CTA PVPI-X a montré un réamorçage lent de la polymérisation, ainsi que l'existence d'une importante population résiduelle de macro-CTA en fin de polymérisation. Une quantification de cette fraction résiduelle d'homopolymère a été réalisée par un dosage indirect en chromatographie d'exclusion stérique.

Des copolymères homologues fluorescents ont également été synthétisés en incorporant statistiquement au sein du bloc PNIPAM des unités de NVC afin d'obtenir les diblocs PVAm_m-*b*-P(NIPAM-*stat*-NVC)_n. Ces copolymères n'ont jamais été décrits dans la littérature et ont été particulièrement importants pour l'étude du greffage des diblocs sur les particules à base de polysaccharides.

Les copolymères PVAm_m-*b*-PNIPAM_n sont double-hydrophiles et présentent à la fois une sensibilité au pH et à la température, ce qui leur confère des propriétés intéressantes d'auto-assemblage en solution qui n'avaient pas été étudiées en détail jusqu'ici. Dans un premier temps, le pKa du dibloc a été estimé puis sa température de point de trouble a été déterminée à différents états de protonation du bloc polyaminé : pH 5 pour une protonation totale, pH 8 pour une protonation partielle (pKa ~ 7,5) et pH 11 pour une déprotonation totale. De manière générale, les valeurs de T_c déterminées par turbidimétrie, DLS et DSC sont plus grandes à pH 5 qu'à pH 11 puisque le copolymère est plus hydrophile du fait de la protonation du bloc PVAm. Les copolymères PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ et PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ présentent un comportement très similaire en ce qui concerne leur transition. Dans la deuxième partie de l'étude, les tailles et morphologies des agrégats formés par le copolymère à T < T_c et T > T_c ont été caractérisés par DLS, DLS multi-angle, SAXS et MET. Cette étude a révélé que le copolymère s'auto-assemble de manière spontanée à température ambiante, à pH < pKa et pH > pKa. Les agrégats formés ont un diamètre de l'ordre de 150-200 nm et sont polydisperses. Au-delà de la T_c, le comportement du dibloc diffère en fonction de l'état de protonation. En effet, à pH > pKa, lorsque le dibloc est neutre, une densification des agrégats préexistants à 25 °C a été observée à 45 °C en DLS et en SAXS. Au contraire, à pH < pKa, lorsque la PVAm est chargée, une transition de morphologie d'agrégats vers des nano-objets a été caractérisée par DLS et SAXS. En conclusion, cette étude a bien permis de mettre en avant la complexité du comportement des diblocs PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀ et PVAm₂₀-*b*-PNIPAM₁₀₀ en

solution aqueuse. Dans le cadre de ce projet, ces résultats nous indiquent que le copolymère est toujours sous la forme d'agrégats ou de nano-objets en solution, et qu'il est important de prendre cette agrégation en compte pour la modification de surface des particules à base de polysaccharides avec ce polymère.

L'objectif de la Partie 2 a été la mise en forme de nanoparticules modèles cœur-couronne, composées d'un cœur de silice et d'une couronne de polysaccharides, et leur modification de surface avec le copolymère thermorépondant PVAm₁₀-*b*-PNIPAM₅₀. Les cœurs de silice synthétisés par voie sol/gel sont sphériques et monodisperses, comme attendu. La couronne de polysaccharides a été assemblée par *layer-by-layer* grâce à des dépôts successifs de chitosane et d'alginate, deux polyélectrolytes naturels de charges opposées. Les caractérisations au cours des différentes étapes de mise en forme ont permis de confirmer l'obtention des nanoparticules modèles attendues. En particulier, les particules SiNP@CS/ALG ont un potentiel- ζ négatif, indiquant que la surface est recouverte d'alginate. La surface des particules comporte donc des fonctions acides carboxyliques qui permettront leur modification de surface par la suite. Des essais préliminaires de greffage covalent par *grafting to* du copolymère PVAm-*b*-PNIPAM ont été réalisés ; la caractérisation par RMN HRMAS a permis de confirmer la présence du dibloc thermosensible à la surface des particules. Suite à ce résultat positif, le ratio massique optimal de copolymère à apporter aux particules a été déterminé conjointement par relaxométrie T2 et zétamétrie. Ces deux techniques ont permis d'estimer un ratio optimal de 1%_m. Une quantification par spectrofluorimétrie a permis d'estimer le ratio massique effectif de copolymère greffé à la surface des particules. Différentes conditions de greffage ont été comparées : un greffage covalent avec les agents de couplage NHS/EDC, ou une adsorption non-covalente, dans l'eau et dans le DMSO pour ces deux paramètres. La quantification a démontré un taux de greffage maximal de 0,6%_m de copolymère par rapport aux particules dans le cas du greffage covalent dans l'eau.

A la suite de ces résultats, nous nous sommes intéressés à la nature des interactions mises en jeu lors du greffage. Une étude XPS a permis de comparer les différentes conditions de greffage. Bien que les résultats tendent à confirmer le greffage covalent, la comparaison entre le greffage covalent et le greffage non-covalent est difficile avec cette technique. Enfin, les propriétés thermosensibles des particules modifiées en surface ont été étudiées. Une étude de la stabilité colloïdale a démontré que les particules modifiées subissent une déstabilisation lors d'une rampe de température, alors que les particules non-modifiées ne sont pas impactées par la température. Ce résultat confirme ainsi l'hypothèse de départ et montre que la modification de surface des particules SiNP@CS/ALG par le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM leur apporte des propriétés d'auto-assemblage thermo-induit.

Le premier constat à l'issue de ces résultats est le suivant : le système tel qu'il a été mis au point actuellement n'est pas thermogélifiant, mais il est thermosensible et cette thermosensibilité se traduit par une déstabilisation des particules en suspension lorsqu'on les chauffe. Cette déstabilisation est la conséquence de la présence du copolymère PVAm-*b*-PNIPAM greffé en surface des particules. En dessous de sa T_c , le copolymère est hydrophile et ses chaînes hydratées sont étendues. Quand la température augmente et atteint T_c , l'eau devient un mauvais solvant pour le PNIPAM ; les liaisons hydrogène sont rompues et le copolymère va se réorganiser de manière à réduire au maximum son interface avec l'eau. Ses groupements hydrophiles se positionnent à l'intérieur des globules, et le squelette carboné hydrophobe à l'extérieur. Cette transition de morphologie résulte en la formation d'une couche hydrophobe à la surface des particules. L'homogénéité de cette couche est difficile à estimer, cependant les résultats précédents prouvent que la surface est suffisamment hydrophobe pour que des interactions hydrophobes inter-particulaires se créent. Ce phénomène d'auto-assemblage de particules hydrophobes en surface a déjà été observé dans la littérature.²

Pour conclure, l'étude de la stabilité colloïdale en fonction de la température des particules silice/hydrogel modifiées en surface par le copolymère PVAm-*b*-PNIPAM a permis de démontrer que la modification de surface apporte effectivement aux NPs des propriétés thermosensibles. Celles-ci se caractérisent par une déstabilisation thermo-induite qui n'est pas visible sur les particules non-modifiées en surface.

Conclusion et perspectives

I. Regard critique sur les résultats obtenus

Ce système à base de nanoparticules modèles a permis, dans une certaine mesure, de s'affranchir des contraintes de quantités de nanoparticules produites si celles-ci avaient été uniquement composées de polysaccharides. Le revêtement des nanoparticules de silice, dont la synthèse a rapidement été maîtrisée, a permis d'obtenir des lots de particules permettant de réaliser des greffages et des caractérisations.

La mise en forme de ces nanoparticules reste cependant contraignante et peu rentable. Les plus gros lots de particules mises en forme à ce jour ont permis d'obtenir 600 mg de SiNP@CS/ALG. Cela a nécessairement entraîné de comparer des résultats obtenus sur des lots différents, ce qui n'est pas optimal bien que le protocole ait été reproduit plusieurs fois et jugé reproductible.

Une seconde difficulté rencontrée au cours de ces travaux a été la mise en évidence du greffage du copolymère à la surface des particules, ce qui est une problématique récurrente du *grafting to*. Dans ce système, la difficulté est d'autant plus grande que le copolymère représente une très faible fraction massique dans le composite, et en terme de fonctionnalité, le copolymère présente les mêmes fonctions chimiques que celles de l'alginate et du chitosane.

La synthèse du copolymère PVAm_m-*b*-P(NIPAM-*stat*-NVC)_n fluorescent a été particulièrement utile pour la quantification du greffage. Sans cela, il aurait été très difficile d'accéder à cette information.

L'étude des propriétés thermosensibles a été limitée principalement par un manque de matière en nanoparticules. Avec un stock plus conséquent de NPs, il aurait été possible d'augmenter les concentrations des suspensions pour tendre vers des ratios volumiques où une gélification aurait pu être observée.

II. Perspectives

Ce projet a débuté avec cette thèse et constitue une nouvelle thématique de recherche au sein de l'équipe PPB du CIRIMAT et de l'équipe P3R du laboratoire des IMRCP qui ont ainsi entamé leur collaboration. C'est un travail pluridisciplinaire avec une partie sur la synthèse et la physico-chimie de polymères et une seconde partie sur la mise en forme de nanoparticules et la chimie de modification de surface. Ces deux axes ont nécessité la mise au point de protocoles qui, dans le temps imparti, n'ont pas toujours pu être autant optimisés que nous l'aurions souhaité. Ainsi, ce

manuscrit se terminera sur les perspectives d'amélioration du système développé, à court terme et à plus long terme.

L'objectif de ce projet sur le long terme est l'obtention d'un système particulière thermogélifiant *in-situ*. Concernant les nanoparticules, il est évident que la réalisation de cet objectif nécessite la mise en forme et la modification de surface de nanoparticules composées uniquement d'hydrogel. Plusieurs stratégies sont alors envisageables.

La première consiste à mettre en forme des nanoparticules homogènes de chitosane ou d'alginate puis de les modifier par *grafting to* avec le copolymère PVAm_m-b-PNIPAM_n. Dans le cas de particules de chitosane, une réticulation des amines du chitosane avec les amines de la PVAm est possible avec des réticulants comme le glutaraldéhyde ou la génipine. Pour les particules d'alginate, la modification de surface réalisée sur les particules modèles serait facilement transposable par amidification de la PVAm sur les acides carboxyliques de l'alginate avec (ou sans) les agents de couplage NHS/EDC.

La mise en forme de ces particules est décrite dans la littérature, mais comme cela l'a été évoqué dans ce manuscrit, les hydrogels de chitosane et alginate ne sont pas si simples à mettre en forme car ils sont très visqueux. Des premiers essais de formulation de nanoparticules de chitosane ont été réalisés par gélification ionique du chitosane avec du tripolyphosphate. Cette technique a permis d'obtenir des particules en très faibles quantités. Une méthode prometteuse pour la production en plus grande quantité de NPs de CS est le séchage par nano-atomisation.³⁻⁵ Concernant la modification de surface, plusieurs optimisations sont nécessaires. Le rapport de taille entre les particules et le copolymère thermosensible peut être optimisé : il faudrait soit réduire le diamètre des particules, soit augmenter la masse molaire du dibloc. Dans un second temps, la densité de greffage pourrait être optimisée en réalisant du *grafting from* plutôt que du *grafting to* pour la synthèse des brosses thermorépondantes. Pour ce faire, il faudrait modifier la surface des particules par un agent de transfert RAFT et polymériser le NIPAM depuis cette surface fonctionnalisée.

Enfin, une seconde stratégie paraît particulièrement séduisante. En jouant sur le caractère amphiphile du copolymère PVAm_m-b-PNIPAM_n à $T > T_c$, celui-ci pourrait être utilisé comme co-stabilisant/co-émulsifiant d'une émulsion inverse de chitosane (Figure 1). En effet, une voie décrite dans la littérature pour la mise en forme de particules de CS est la réticulation en émulsion inverse. Cela consiste à préparer une (micro)émulsion inverse de solution de chitosane dans une phase organique en présence d'un tensioactif, et une seconde (micro)émulsion inverse d'une solution de réticulant dans une même phase organique. En mélangeant les deux (micro)émulsions, les phases aqueuses coalescent et le réticulant va réticuler les gouttelettes de chitosane pour former les NPs. Dans cette stratégie, le copolymère pourrait être ajouté au

tensioactif. A $T > T_c$, le PNIPAM hydrophobe se positionnerait dans la phase organique, et la PVAm toujours hydrophile irait préférentiellement dans la phase aqueuse. Ainsi, lors du mélange de cette émulsion stabilisée avec le copolymère avec l'émulsion de réticulant, ce dernier réticulerait aussi bien les amines du chitosane que celle de la PVAm. Cette approche permettrait d'obtenir des nanoparticules d'hydrogel modifiées en surface en une seule étape.

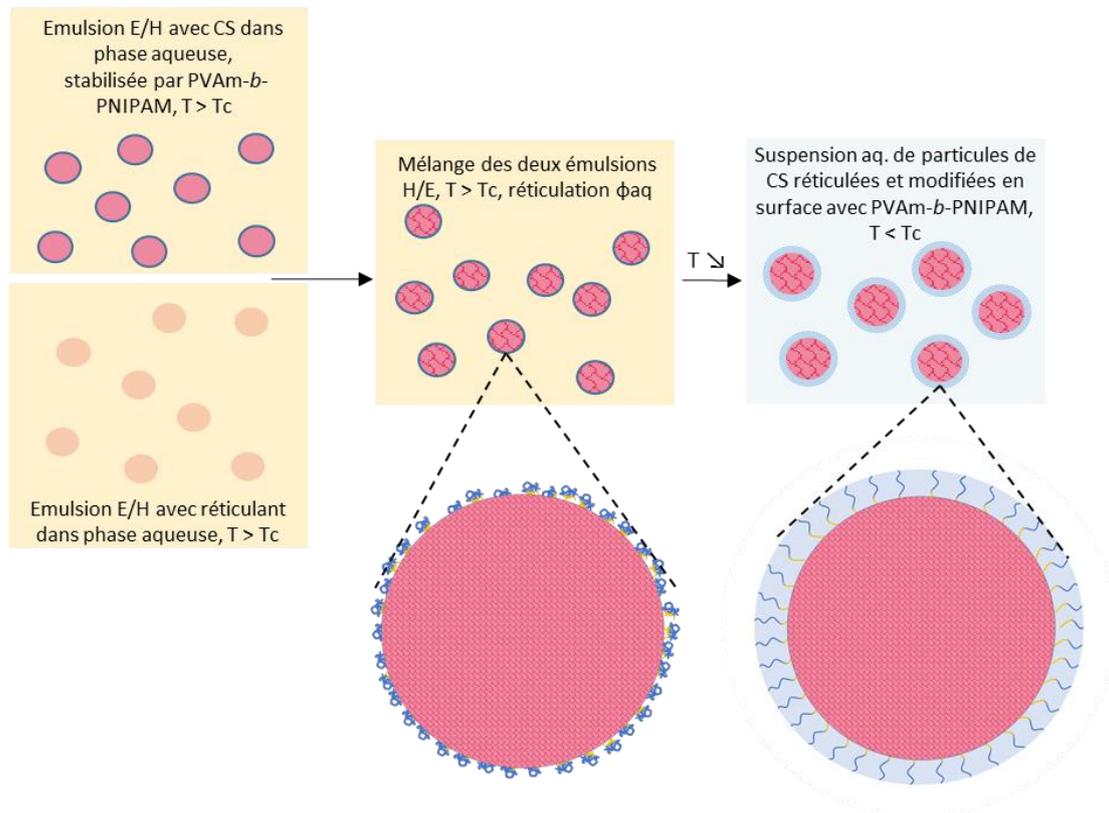


Figure 1 : Modification de surface de nanoparticules de chitosane par une approche en une seule étape : co-stabilisation d'une microémulsion par un mélange de copolymère PVAm-b-PNIPAM/tensioactif et co-réticulation du dibloc avec le chitosane

En conclusion, ces travaux sur l'élaboration d'un biomatériau par auto-assemblage colloïdal avec une stratégie de modification de surface de nanoparticules à base de polysaccharides par un copolymère thermorépondant s'intègrent dans un contexte de médecine régénérative. Bien que les résultats obtenus jusqu'ici soient encore très en amont de toute application, il est important de garder cet objectif en tête. Le design d'hydrogels injectables formés in-situ a de nombreux atouts pour la médecine régénérative car il peut permettre de combler des défauts dans un tissu de manière peu invasive. Les hydrogels à base de nanoparticules sont particulièrement intéressants du fait de leur polyvalence en termes de taille des particules, nature chimique, propriétés de surface, etc.

Ce thermogel colloïdal pourrait être utile pour des applications en chirurgie dentaire par exemple. En effet, le cas particulier des hémorragies post-extractionnelles de dent chez les patients sous anti-coagulants pose parfois problème lors des soins. Injecter une suspension thermosensible au

niveau de l'hémorragie pourrait permettre de la bloquer grâce à l'agrégation *in situ* thermo-induite des particules. L'intérêt serait double si les particules thermosensibles étaient formulées exclusivement à base d'alginate car celui-ci est connu pour ses propriétés hémostatiques et ses grandes capacités d'absorption. Une telle formulation permettrait de cibler le site d'action, tout en absorbant le sang et stoppant les saignements.

Références

1. Maki, Y., Mori, H. & Endo, T. Synthesis of Amphiphilic and Double-Hydrophilic Block Copolymers Containing Poly(vinyl amine) Segments by RAFT Polymerization of N-Vinylphthalimide. *Macromol. Chem. Phys.* **211**, 45–56 (2010).
2. Zhu, M.-Q., Wang, L.-Q., Exarhos, G. J. & Li, A. D. Q. Thermosensitive Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2656–2657 (2004).
3. Arpagaus, C., Collenberg, A., Rützi, D., Assadpour, E. & Jafari, S. M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **546**, 194–214 (2018).
4. Prudkin-Silva, C. *et al.* High molecular weight chitosan based particles for insulin encapsulation obtained via nanospray technology. *Dry. Technol.* **0**, 1–16 (2020).
5. Shehata, T. M. & Ibrahima, M. M. BÜCHI nano spray dryer B-90: a promising technology for the production of metformin hydrochloride-loaded alginate–gelatin nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **45**, 1907–1914 (2019).