Assemblages de nanoparticules d'or avec de longues chaînes polyélectrolytes pour la formation d'oligomères plasmoniques

Florent Voisin

▶ **To cite this version:**

Florent Voisin. Assemblages de nanoparticules d'or avec de longues chaînes polyélectrolytes pour la formation d'oligomères plasmoniques. Physique [physics]. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7274 . tel-04464038

HAL Id: tel-04464038
https://theses.hal.science/tel-04464038

Submitted on 18 Feb 2024

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.

UNIVERSITE DE PARIS

ECOLE DOCTORALE PHYSIQUE EN ILE-DE-FRANCE (ED 564)

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (UMR 7057)

Assemblages de nanoparticules d'or avec de longues chaînes polyélectrolytes pour la formation d'oligomères plasmoniques

Présentée par
Florent VOISIN

Thèse de doctorat de physique

Dirigée par
Florent CARN

Présentée et soutenue publiquement le 8 Décembre 2021

Devant un jury composé de :

M. Florent Carn	Maître de conférence	Univ. de Paris	Directeur de thèse
M. Jean Paul Chapel	Directeur de recherche	CNRS, Univ. de Bordeaux	Rapporteur
M. Eric Cloutet	Directeur de recherche	CNRS, Univ. de Bordeaux	Membre invité
Mme Muriel Lansalot	Directrice de recherche	CNRS, Univ. de Lyon	Examinatrice
M. Jean-Maurice Mallet	Directeur de recherche	CNRS, ENS ULM	Membre invité
Mme Valérie Marchi	Directrice de recherche	CNRS, Univ. de Rennes	Rapportrice
M. François Ribot	Directeur de recherche	CNRS, Sorbonne Univ.	Examinateur
Mme Samia Zrig	Maître de conférence	Univ. de Paris	Examinatrice

Table des matières

Introduction générale **1**

Chapitre I. Concepts généraux sur les nanoparticules, les chaînes polyélectrolytes et leurs assemblages **5**

I) Les nanoparticules d'or 6

a) De l'or massif aux nanoparticules 6

b) L'histoire des nanoparticules d'or 7

c) Propriétés des nanoparticules d'or 10

II) Généralités sur les polyélectrolytes linéaire 19

a) Types de polyélectrolytes et caractéristiques 19

b) Comportement des polyélectrolytes en solution 22

i) Cas des polyélectrolytes fortement chargés 22

ii) Cas des polyélectrolytes faiblement chargés 23

iii) Effet du sel 24

c) Notion de longueur de persistance intrinsèque et électrostatique 25

III) Assemblages de nanoparticules 28

a) Assemblage de nanoparticules à l'aide d'une « empreinte » ou d'un milieu confinant 28

b) Assemblage par variation des forces d'interactions 32

c) Assemblage par application d'un champ de force externe 33

d) Assemblage par complexation électrostatique 36

Chapitre II. Méthodes expérimentales **43**

I) Synthèse de nanoparticules d'or 44

II) Diffusion du rayonnements 46

a) Diffusion statique et diffraction des rayons X aux petits angles 46

i) Notion de vecteur d'onde 46

ii) Le facteur de structure S(q) et le facteur de forme P(q) 48

iii) Le régime de Guinier et la dimension fractale 50

iv) L'interaction matière/rayons X 51

v) Le principe de mesure 52

vi) Le contraste 53

b) Diffusion dynamique de la lumière 54

c) Vélocimétrie laser 58

III) Méthodes de microscopie 59

a) Microscopie électronique à transmission 59

b) Cartographie élémentaire 61

c) Suivi de nanoparticules par vidéo microscopie (NTA) 61
IV) Méthodes de spectroscopie 62
a) Spectroscopie UV-Visible (proche infrarouge) 62
b) Spectroscopie infrarouge 63
c) Mesure de carbone organique total (COT) 64
d) Spectroscopie à résonnance magnétique nucléaire 64
V) Lyophilisation 64
VI) Chromatographie d'exclusion stérique 64
VII) Titration des ions chlorure par conductimétrie 65
Chapitre III. Stabilisation de complexes électrostatiques au voisinage du point isoélectrique par adsorption de longues chaînes polyélectrolytes 67
I) Introduction 68
II) Produits chimiques 71
III) Synthèse du chitosan quaternisé 71
a) Etat de l'art 71
b) Synthèse et caractérisations 75
IV) Charge-Driven Arrested Phase-Separation of Polyelectrolyte-Gold Nanoparticle Assemblies Leading to Plasmonic Oligomers 81
V) Caractérisations complémentaires 107
a) Mesures de carbone organique total (COT) 108
b) Microscopie électronique après marquage du polymère 110
c) Cartographie élémentaire 112
d) Analyse NTA 113
VI) Conclusion 114
Chapitre IV. Formation, stabilisation et contrôle des assemblages par utilisation d'un système microfluidique 117
I) Introduction 118
II) Flash Colloidal Assembly in Micro Flow System 122
III) Conclusion 152
Chapitre V. Propriétés et applications des assemblages obtenus 153
I) Application en photothermie 154
a) Introduction 154
b) Contexte 154
c) Système cellulaire et agrégats étudiés 155
d) Méthodes 156
e) Résultats 159
II) Spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) 165

a) Introduction 165
b) Contexte 166
c) Self-assembly of gold nanoparticles by quaternized chitosan in solution to improve surface enhanced Raman spectroscopy sensing of epinephrine 166
III) Conclusion 188
Chapitre VI. Synthèse de copolymères « peigne » de type polyélectrolytes pour l'assemblage de nanoparticules 189
I) Introduction 190
II) Point de vue général sur la synthèse de copolymères de type « peigne » 193
a) La voie « grafting onto » 194
b) La voie « grafting from » 197
III) Systèmes envisagés 198
IV) Produits chimiques 200
V) Voie « click » 202
a) Etat de l'art 202
b) Synthèses et caractérisations 203
i) Etape de tosylation 205
ii) Etape d'azidation 207
iii) Etape de greffage par la voie « click » 209
VI) Voie estérification 214
a) Etat de l'art 214
b) Synthèses et caractérisations 215
VII) Voie radicalaire 221
VIII) Conclusion 221
Conclusion générale 223
Bibliographie 227
Annexes 241

Introduction générale

Les nanosciences sont depuis bien longtemps installées dans notre société. Elles furent, avant d'être une réalité scientifique, un fantasme donnant naissance à de nombreux scénarios aussi bien dans le monde du cinéma que dans les jeux vidéo[1]. Aujourd'hui encore, et ce malgré toutes nos connaissances dans ce domaine, les nanosciences restent toujours l'objet d'une grande curiosité, que ce soit dans la vie courante, avec toutes les craintes qu'engendrent ces petits objets, mais aussi dans le monde scientifique, qui cherche à en exploiter le plein potentiel.

Si de nombreuses applications liées aux nanotechnologies ne sont plus à démontrer, elles restent pour la plupart, et comme pour beaucoup de domaines dans la science, perfectibles. Les nanoparticules d'or suscitent un intérêt toujours plus grandissant en raison de leurs propriétés plasmoniques. Il n'est plus rare de les trouver dans de nombreuses applications allant de la catalyse, au milieu biomédical. Toutes ces propriétés sont d'autant plus surprenantes, lorsque l'on parle de couplage plasmonique. Les méthodes visant à assembler des nanoparticules sont particulièrement nombreuses et offrent un panel de possibilités presque démesuré. Pour autant, on peut encore trouver des voies d'assemblages qui restent méconnues et peu exploitées. C'est, par exemple, le cas de l'assemblage par complexation électrostatique avec des polyélectrolytes.

Ce travail de thèse concerne l'assemblage d'un nombre limité de nanoparticules d'or dans l'eau. Dans le titre, nous appelons ces assemblages des « oligomères plasmoniques ». Le terme d'oligomère fait référence à un analogue colloïdal d'une petite molécule constituée d'un petit nombre de monomères typiquement inférieur à 100. Le terme plasmonique fait référence à l'oscillation collective des électrons de la bande de conduction (i.e. le plasmon) d'un métal illuminé par la lumière visible. À l'échelle macroscopique, cette interaction lumière/métal se traduit par un large spectre d'absorption exploité artisanalement depuis des millénaires pour colorer des céramiques et des vitraux à l'aide de nanoparticules formées in situ. À l'échelle nanométrique, l'excitation d'un tel plasmon peut permettre de concentrer une grande quantité d'énergie. Ces dernières années, les progrès réalisés dans le domaine de l'élaboration de nanostructures ont permis de développer des dispositifs photoniques mettant à profit les résonnances plasmon pour transporter l'information[2], générer des échauffements locaux[3] ou encore amplifier des signaux optiques[4] (i.e. fluorescence, Raman).

Dans ce domaine, il est maintenant connu que l'auto-assemblage de nanoparticules métalliques, en volume ou sur des surfaces, peut permettre de pallier certaines lacunes de la plasmonique conventionnelle, basée sur la lithographie, en réduisant la dissipation et en permettant de façonner la distribution spatiale et spectrale des champs électromagnétiques à l'échelle nanométrique[5–7].

Dans le cadre de cette thèse, nous avons essayé de développer deux voies d'assemblages de nanoparticules d'or en volume et d'étudier le potentiel de ces assemblages pour des applications dans le domaine biomédical.

Les deux voies d'assemblage ont pour points communs de se dérouler directement dans l'eau par simple mélange de nanoparticules d'or et de chaînes polymères. Les particules sont des particules d'or « citratées », très courantes, obtenues par la voie dite de Turkevich[8].

La première voie d'assemblage se veut simple, sobre et durable. Elle est basée sur le couplage électrostatique entre les particules d'or anioniques et des chaînes linéaires polycationiques d'origine naturelle. Comme on le précisera dans le chapitre suivant, c'est une approche ancienne. Elle est couramment utilisée pour faciliter la purification des eaux usées ou pour stabiliser/fonctionnaliser des particules en suspension. L'originalité de notre démarche est d'avoir essayé de stabiliser des complexes électrostatiques formés au voisinage de la stœchiométrie de charge entre les deux partenaires. Notre intérêt pour ces assemblages particuliers est lié à leur structure et aux propriétés optiques qui en découlent.

La dynamique de croissance des complexes électrostatiques formés au voisinage de la stœchiométrie de charge étant très importante, nous avons développé une méthode de mélangeage rapide destinée à stabiliser de façon contrôlée et rapide des agrégats comprenant un petit nombre de particules. Cette méthode originale est basée sur un dispositif micro-fluidique et sera présentée dans le chapitre IV.

Nous avons ensuite essayé de sonder le potentiel de ces agrégats pour des applications dans le domaine biomédical. Nous avons en particulier considéré une application comme substrat pour la spectroscopie Raman exaltée de surface. Les résultats obtenus sur ce thème seront présentés dans le chapitre V. Dans ce domaine, la possibilité de préparer rapidement des suspensions d'agrégats présentant une bonne stabilité colloïdale et des propriétés optiques reproductibles pourrait faciliter le développement de kits de mesure sensible et portatif réalisable *in situ* par des personnels non qualifiés en chimie. Ce type d'approche est souhaitable dans les pays développés pour réaliser des mesures plus régulières en complément de méthodes plus précises, mais aussi, plus lourdes telle que la spectroscopie de masse. Cela est d'autant plus vrai dans des pays en voie de développement ne disposant pas de ces dernières techniques. Dans ce contexte, le fait de produire des assemblages avec des composés à bas coût, assemblés de manière à maximiser le signal par unité de matière, est un avantage devant effectivement permettre des mesures régulières.

La deuxième voie d'assemblage est une approche plus exploratoire que la précédente. Elle consiste à assembler des particules d'or par complexation avec des chaînes copolymères à bloc, de type « peigne », présentant un long squelette non ionique polaire et des greffons cationiques. L'idée de départ est que les particules se fixent sur les greffons par couplage électrostatique pour former des oligomères colloïdaux. Dans ce cas, il serait a priori possible de contrôler le nombre de particules par chaînes, la distance inter-particules et la charge globale au niveau d'un complexe greffon/particule en contrôlant les caractéristiques du copolymère (i.e. taux de greffage, longueur de contour du squelette et des greffons). En comparaison de la première approche, cette seconde voie est moins simple, moins sobre et moins durable. Néanmoins, elle aurait l'avantage de minimiser l'influence du milieu de dispersion (i.e. force ionique en particulier) sur les caractéristiques structurales des

assemblages et d'ouvrir la porte sur des structures différentes de celles habituellement obtenues par couplage entre des chaînes linéaires et des particules sphériques. Le travail mené sur cette approche s'est directement heurté à la difficulté de synthétiser les chaînes de copolymère. L'objectif du dernier chapitre est de présenter les résultats obtenus suivant différentes approches de synthèse.

CHAPITRE I

Concepts généraux sur les nanoparticules d'or, les chaînes polyélectrolytes et leurs assemblages

I) Les nanoparticules d'or

a) De l'or massif aux nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or étant un des éléments centraux de cette thèse, il convient donc de rappeler les propriétés physico-chimiques liées à ce type de matériau.

À l'état massif, l'or est un métal noble connu très généralement pour son inertie chimique, mais aussi son haut potentiel d'oxydo-réduction. L'or cristallise dans une structure cubique face centrée (CFC) et possède un rayon atomique légèrement plus petit que l'argent. Ces caractéristiques lui confèrent une grande malléabilité. Dans les applications en orfèvrerie, sa malléabilité nécessite souvent de former un alliage avec d'autres métaux pour le rendre plus rigide (or blanc : alliage or/argent, or rose : alliage or/argent/cuivre). La contenance d'or est généralement exprimée en carats, 24 carats correspondant à de l'or pur.

L'or massif présente une couleur caractéristique jaune dont l'origine peut être expliquée par les effets relativistes[9–11].

Sur le plan chimique, les électrons de valence de l'or proviennent des couches $5d^{10}$ $6s^1$ ce qui permet une activation des électrons de la couche 5d ou alors l'apport d'un électron pour compléter la couche 6s. Ceci se traduit par une forte affinité électronique et une première énergie d'ionisation élevée. Il est peu commun de trouver l'or sous l'état Au(I) ou Au(II) mais plus communément sous forme Au(III) caractérisé par une configuration électronique $5d^8$ comme dans le sel d'acide tétrachloraurique ($HAuCl_4$). Sa structure électronique indique aussi son incapacité à interagir vis-à-vis de composés soufrés ou oxygénés qui, si certains sont connus[12] présentent une importante instabilité. La dissolution de l'or peut être observée dans l'acétonitrile en présence d'oxygène, mais reste plus communément observée dans l'eau régale (HCl/HNO_3 3/1) qui conduit à la formation du complexe $[AuCl_4]^-$, les ions chlorure permettant la stabilité de ce complexe.

Lorsque l'on prend l'or à l'état massif et qu'on réduit sa taille jusqu'à la formation d'une particule nanométrique, il en résulte alors un changement significatif des propriétés physiques et chimiques. Les changements deviennent d'autant plus notables lorsque la taille de la nanoparticule passe en dessous de 10 nm. Une des premières conséquences de cette diminution de taille est l'augmentation du rapport surface/volume avec une diminution de la température de fusion (≈ 500 K contre 1337 K pour l'or massif) et une diminution de la distance interatomique (0,245 nm contre 0,288 nm). Des études théoriques ont montré que les atomes présents sur les coins ou les arrêtes des nanoparticules présentent un nombre de coordination plus faible et par conséquent une réactivité chimique plus élevée[13] (Figure I.1).

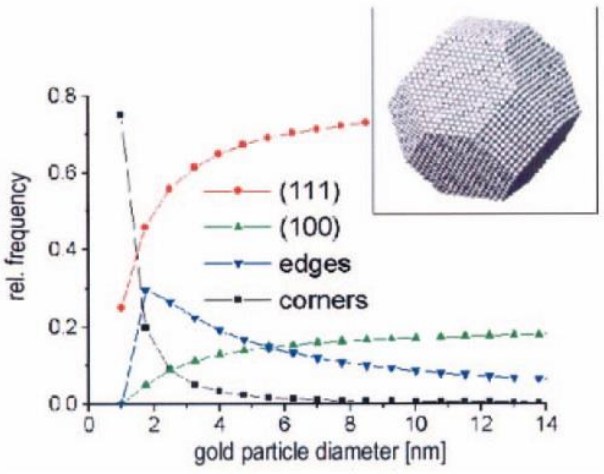


Figure I.1. Dépendance de la quantité relative d'atomes de surface en fonction du diamètre de la nanoparticule. Issue des travaux de Mohr et al.[13].

Le changement de taille apporte aussi des modifications sur la réponse optique avec le passage d'une couleur dorée à une couleur rouge pour une solution de nanoparticules d'or en suspension (Figure I.2).

Figure I.2. Photo de la plus grosse pépite d'or en France avec un diamètre de 3 cm et une épaisseur de 1,8 cm (issue de La Depeche[14]) (gauche) et photo d'une solution de nanoparticules d'or obtenues au laboratoire (droite).

b) L'histoire des nanoparticules d'or

On pourrait penser que la présence des nanoparticules d'or dans notre société est un évènement récent, mais il n'en est rien. En effet, ces dernières sont exploitées depuis longtemps dans l'histoire puisqu'on peut les trouver dans l'exemple très célèbre de la coupe de Lycurgus conçue au 4ème siècle par les Romains (Figure I.3). C'est en 1980, que Barber et Freestone[15], à l'aide de la microscopie électronique, ont montré l'existence de nanoparticules de tailles allant de 50 à 100 nm, composées d'alliage or/argent. Si les experts du British Museum considéraient que la coloration aux nanoparticules n'était pas un art maîtrisé par les Romains, une étude récente de Verità et Santopadre[16] affirme du contraire. En effet, leurs

analyses chimiques sur des mosaïques de l'époque romaine montrent la présence de nanoparticules de quelques vingtaines de nanomètres ce qui, selon eux, montre que les verriers romains avaient une bonne maîtrise du procédé de coloration. Cependant, Verità et Santopadre indiquent que les Romains ne savaient sûrement pas travailler directement avec l'or mais que la présence de cet élément provenait de l'argent avec lequel ils travaillaient.

Figure I.3. La coupe de Lycurgus illuminée de l'extérieur (gauche) ou de l'intérieur (droite). Image issue de la librairie du British Museum[17].

La coupe de Lycurgus est certainement l'exemple le plus connu, mais il est possible de retrouver de nombreux objets montrant l'inclusion de nanoparticules dans une matrice de verre. On peut parler par exemple des bols nervurés et bouteilles ramenés par le roi Frederick IV du Danemark après un voyage à Venise en 1708.

Le procédé de coloration des verres par la présence de nanoparticules d'or se verra attribué le terme de « pourpre de Cassius »[18] du nom de Andreas Cassius qui a reporté dans des écrits la possibilité d'obtenir un précipité rouge d'or par dissolution d'or dans de l'eau régale et par précipitation dans un mélange de chlorure stanneux ($SnCl_2$) et de chlorure stannique ($SnCl_4$).

L'élucidation de la constitution du « pourpre de Cassius » a été un réel défi scientifique et a fait l'objet de nombreuses recherches dans le courant du 19ème siècle. On peut tout de même parler des travaux de Weyl et al.[19], qui ont proposé une approche chimique sur la formation du « pourpre de Cassius » (Figure I.4).

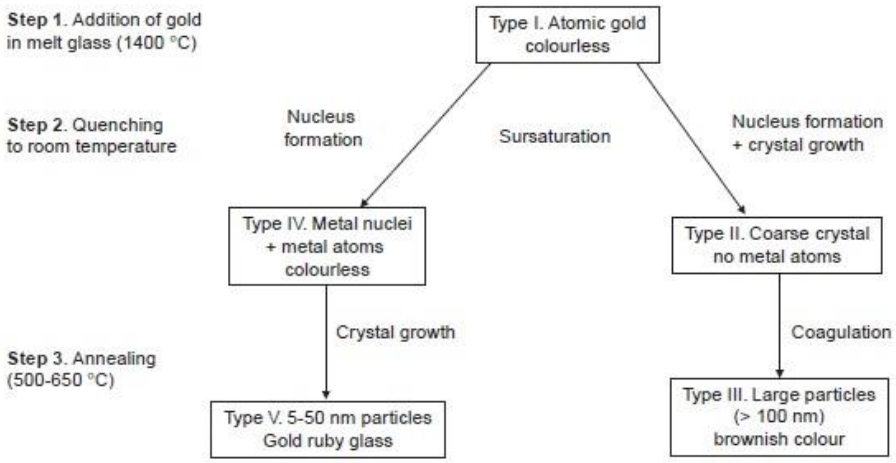


Figure I.4. Schéma simplifié de la formation de verre couleur rubis proposé par Weyl et al.[19].

L'utilisation de nanoparticules d'or pour la coloration de verre est un procédé toujours couramment utilisé. On peut notamment citer l'exemple de Baccarat qui a proposé une collection de verres rouge rubis (Figure I.5).

Figure I.5. Photo de la collection Vega avec un verre couleur rubis. (Image du site https://www.baccarat.fr[20]).

Si l'histoire nous montre que les nanoparticules sont présentes depuis de nombreux siècles, les avancés scientifiques permettent aujourd'hui de pouvoir synthétiser des solutions d'or colloïdal avec un excellent contrôle de la forme et de la taille. Les solutions d'or colloïdal sont des suspensions de nanoparticules d'or dans un solvant tel que l'eau.

Les travaux sur la synthèse de nanoparticules d'or ont longtemps suscité l'intérêt scientifique depuis les premiers travaux de Faraday et al.[21] en 1857, qui décrira « l'or colloïdal » comme la présence d'or métallique dans un état finement divisé, formé par réduction d'un sel d'or à l'aide de phosphore dans un solvant de sulfure de carbone. Ce n'est qu'avec l'émergence de techniques d'imagerie comme la microscopie électronique en transmission que seront mises en évidence les nanoparticules d'or.

Le mécanisme de formation de nanoparticules d'or comporte deux étapes que sont la nucléation et la croissance. Il est important de séparer ces deux étapes pour ne pas induire

dans la synthèse de la nucléation/croissance secondaire[22]. Dans la quête d'obtenir des nanoparticules les plus monodisperses possible, LaMer[23] a proposé le concept de la « burst nucleation » qui consiste à générer simultanément une grande quantité de nucléi pour, dans un second temps, les faire croître. On peut citer deux grandes techniques pour séparer le phénomène de nucléation et de croissance. La « hot-injection » qui consiste en une injection rapide d'une forte concentration du précurseur dans une solution de tensioactif à haute température conduisant à la formation de nucléi. Le taux de nucléation décroît rapidement après l'étape de nucléation pour laisser place au phénomène de croissance[24]. La deuxième technique est la croissance médiée par les germes qui, dans notre cas, est la technique d'intérêt. Cette technique consiste à maintenir la concentration du précurseur suffisamment basse pendant la croissance pour éviter une nouvelle nucléation.

La réduction du sel d'or ($HAuCl_4$) est une étape simple qui consiste à mélanger le sel avec le réducteur, mais qui demande un excellent contrôle des paramètres externes (température, pH, ...). Ces paramètres peuvent avoir une forte influence sur la morphologie finale des particules. La température est un paramètre clé pour le contrôle de la taille des nanoparticules puisque celle-ci va directement impacter le potentiel oxydant de l'agent réducteur et donc la cinétique de réduction.

Il existe de nombreuses méthodes pour la synthèse de nanoparticules (Brust-Schiffrin[25], Murphy[26], etc…) mais ce sont les travaux de Turkevich et al.[27] en 1951 qui ont été le plus largement adoptés pour sa simplicité et sa rapidité. Cette synthèse permet d'obtenir en milieu aqueux des nanoparticules d'une dizaine de nanomètres par réduction d'un sel d'or en utilisant le citrate de sodium qui, dans ce cas, fait office d'agent de réduction et d'agent stabilisant pour les nanoparticules.

c) Propriétés des nanoparticules d'or

Une différence importante entre les nanoparticules et l'or massif concerne les propriétés optiques. L'or massif est caractérisé par une couleur caractéristique qui porte le nom de ce dernier. Les propriétés optiques d'une suspension de nanoparticules deviennent bien différentes. En effet, une solution colloïdale de nanoparticules d'or, de 20 nm, présentera une couleur rouge caractérisée par un pic d'absorption vers 525 nm. Il convient donc de voir plus précisément l'origine de ce phénomène.

Les propriétés optiques des nanoparticules sont impactées par un phénomène physique bien connu pour les nanoparticules de métaux nobles : la résonance plasmon. Dans les domaines de fréquence du visible et du proche infrarouge, les électrons de conduction peuvent être considérés comme quasi-libres et par conséquent indépendants du noyau. Ce gaz d'électrons, sous l'effet d'un rayonnement électromagnétique, va osciller autour de sa position d'équilibre conduisant à une polarisation du métal (Figure I.6). La distance parcourue par les électrons est très faible (10^{-13} m) par rapport à la taille d'un atome, mais suffisante pour induire une délocalisation du barycentre des charges comme observé sur la figure I.6. Il y aura alors un excès de charges positives d'un côté et négatives de l'autre. Les charges sont soumises à une force de rappel qui les ramène toujours vers le centre de la nanoparticule. Si la fréquence de l'onde électromagnétique s'accorde avec la fréquence propre des oscillations

du gaz d'électrons autour du cœur ionique alors le couplage est résonnant. C'est le phénomène de résonance plasmon localisée à la surface (LSPR). Ce phénomène crée une amplification de l'absorption et de la diffusion de la particule. Ces deux paramètres définissent l'extinction qui est la diminution du flux de photons pour une onde plane incidente.

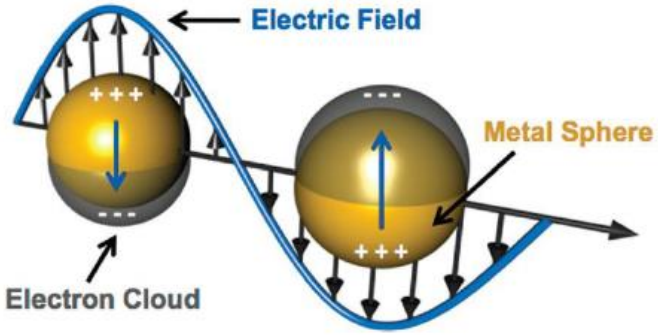


Figure I.6. Représentation schématique du phénomène de résonnance plasmon. Issue des travaux de Langille[28].

La résonnance plasmon de surface localisée conduit à des bandes d'absorption pouvant aller de l'ultraviolet à l'infrarouge et dont les positions sont fortement dépendantes de la taille et de la forme de la nanoparticule ou bien encore de son milieu environnant.

En 1900, Drude[29] a proposé une description du mouvement des électrons de conduction dans un métal. Les transitions inter-bandes étant négligeables aux grandes longueurs d'onde, le modèle de Drude sera utilisé comme première approximation pour appréhender les propriétés plasmoniques.

Les équations de Maxwell permettent, dans un premier temps, de définir l'expression de la constante diélectrique ε du matériau en fonction d'un champ électrique de fréquence ω.

Gustave Mie, fut le premier à décrire la résonnance plasmon à l'aide des équations de Maxwell :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + i\frac{\sigma(\omega)}{\omega\varepsilon_0}$$ avec ε_∞ la permittivité à haute fréquence du matériau, $\sigma(\omega)$ la conductivité du matériau et ε_0 la permittivité du vide

L'expression de la constante peut être déterminée en considérant que les électrons de valence sont soumis au champ électrique E et à un coefficient d'amortissement Γ.

$$m_e\frac{dv}{dt} = -eE - m_e v\Gamma$$ avec v la vitesse de l'électron, m_e la masse d'un électron, e la charge élémentaire et Γ le coefficient d'amortissement

La résolution de cette équation dans le cadre d'un champ électrique sinusoïdal permet d'établir la forme générale de la vitesse moyenne des électrons de valence. Avec la loi d'Ohm et l'expression de la densité de courant, on obtient l'expression de la conductivité. On peut donc en déduire l'expression de la constante diélectrique du métal.

$\varepsilon_m = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\Gamma}$ avec ω_p la fréquence plasma

Le facteur 1 peut être remplacé par une constante ε_∞ qui prend en compte les transitions qui n'ont pas besoin d'être explicitées dans le domaine du visible. On a alors :

$$\varepsilon_m = \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\Gamma}$$

Il est par ailleurs possible de déterminer les paramètres de cette expression à partir des mesures expérimentales de la constante diélectrique de l'or : $\varepsilon_\infty = 9{,}5$ / $\omega_p = 2{,}16 * 10^{15}\ Hz$ et $\Gamma = 1{,}59 * 10^{13}\ Hz$.

Si le modèle de Drude est un bon départ pour décrire la constante diélectrique d'un métal, il reste toutefois une vision simplifiée des métaux, car il ne prend en compte que les électrons libres (transitions intra-bandes) et néglige complètement la contribution des électrons de cœur (transitions inter-bandes).

Si l'on considère une petite sphère dans un champ statique dont le rayon r est suffisamment petit tel que $r \ll \lambda$, de constante diélectrique $\varepsilon_m(\omega)$, placée dans un champ électrique de norme E, dans un milieu non dispersif et non absorbant de constante diélectrique ε_d, alors il est possible de retrouver la formule de la polarisation dans ce champ électrique et la polarisabilité :

$P(\omega) = 4\varepsilon_0\varepsilon_d\alpha_0(\omega)E$ avec α_0 la polarisabilité dans l'approche quasi statique

$$\alpha_0(\omega) = 4\pi R^3 \frac{\varepsilon_m(\omega) - \varepsilon_d}{\varepsilon_m(\omega) + 2\varepsilon_d}$$

On aura un maximum de résonnance lorsque la polarisabilité atteindra un maximum donc quand $\varepsilon_m(\omega) + 2\varepsilon_d$ tend vers 0. Cette condition est respectée si $\varepsilon_m = -2\varepsilon_d$.

Lorsque l'on se trouve dans des milieux diélectriques comme l'eau ou l'air, la permittivité diélectrique est un réel positif. Pour se trouver dans les conditions de résonnance il faut donc que $Re(\varepsilon_m)$ soit négatif. Cette condition est respectée pour la plupart des métaux nobles comme l'or, l'argent ou le cuivre.

Ceci est vrai dans le cadre de l'approximation dipolaire, donc pour des nanoparticules de très petite taille.

L'étape suivante consiste à calculer les sections efficaces d'absorption et d'extinction qui peuvent être obtenues par un calcul non explicité ici :

$$\sigma_{abs} = V \frac{18\pi\varepsilon_d^{3/2}}{\lambda} \frac{Im(\varepsilon(\omega))}{|\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_d|}$$

$$\sigma_{diff} = V^2 \frac{4\pi^3\varepsilon_d^2}{\lambda^4} \left| \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_d}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_d} \right|^2$$

Ces deux équations mettent en évidence que l'absorption aussi bien que la diffusion sont toutes les deux sujettes au phénomène de résonnance. Si les deux fonctions dépendent du volume, l'évolution de ces dernières est différente. En effet, $\sigma_{abs} \propto V$ quand $\sigma_{diff} \propto V^2$. La diffusion commencera à dominer l'absorption dès lors que la nanoparticule aura un rayon d'environ 30 nm (Figure I.7). Le facteur de qualité Q correspond au rapport entre la longueur d'onde à résonnance et la largeur de la bande d'absorption. La section efficace d'extinction est la somme de la section efficace de diffusion et d'absorption.

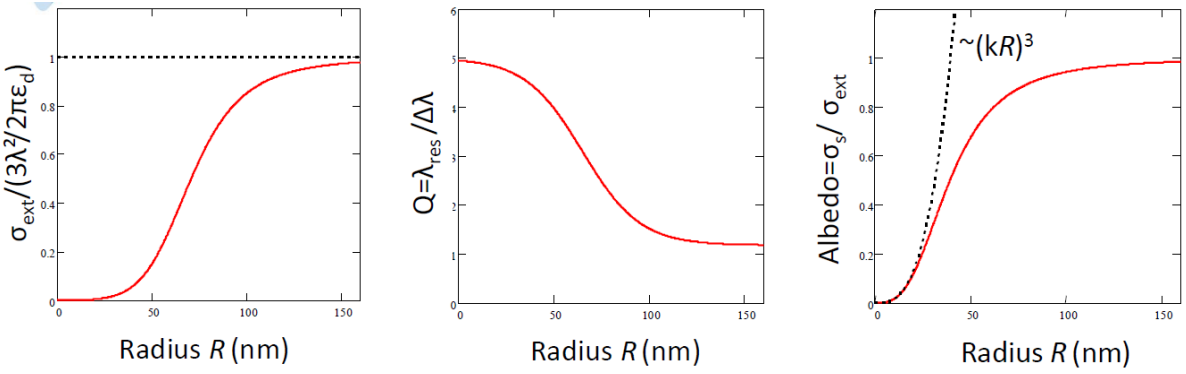


Figure I.7. Evolution de la section efficace d'extinction, du facteur de qualité Q et du coefficient d'Albedo en fonction du rayon (R) de la nanoparticule.

L'image ci-dessus montre l'impact de la taille de la nanoparticule sur le facteur de qualité Q et le coefficient d'Albedo (rapport entre la section efficace de diffusion et la section efficace d'extinction). Plus la taille de la nanoparticule augmentera, plus la qualité du spectre sera moindre avec une largeur du pic à mi-hauteur élevée.

Dans le cas où l'on sortirait de cette approximation, c'est-à-dire pour des nanoparticules de grandes tailles ($r > 30\,nm$) ou de petites tailles ($r < 5\,nm$), les comportements deviendront différents.

Par exemple pour des nanoparticules de petites tailles ($r < 5\,nm$), la collision des électrons de valence avec la surface de la particule devient trop importante[30]. Ce phénomène conduit à un élargissement rapide de la bande d'absorption et à un déplacement du pic d'absorption vers les plus petites longueurs d'onde.

Pour des nanoparticules de grandes tailles ($r > 30\,nm$), le déplacement du nuage électronique n'est pas homogène ce qui induit une distribution de charges multipolaire. Le champ dans la nanoparticule n'est pas homogène. Le phénomène de diffusion domine. Les nouveaux modes de résonnance (quadrupolaire, octopolaire, etc…) ont été décrits et calculés par Gustave Mie[31] à partir des équations de Maxwell.

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{k^2}\sum_{N=1}^{\infty}(2N+1)Re[a_N + b_N]$$

$$\sigma_{diff} = \frac{2\pi}{k^2}\sum_{N=1}^{\infty}(2N+1)[|a_N|^2 + |b_N|^2]$$

Les coefficients a_N et b_N peuvent être obtenus par des calculs complexes faisant appel à des fonctions de Riccati-Bessel $\Psi_N(z)$ et $\eta_N(z)$:

$$a_N = \frac{m\Psi_N(mx)\Psi'_N(x) - \Psi'_N(mx)\Psi_N(x)}{m\Psi_N(mx)\eta'_N(x) - \Psi'_N(mx)\eta_N(x)}$$

$$b_N = \frac{\Psi_N(mx)\Psi'_N(x) - m\Psi'_N(mx)\Psi_N(x)}{\Psi_N(mx)\eta'_N(x) - m\Psi'_N(mx)\eta_N(x)}$$

Avec $m = n/n_m$, k le vecteur d'onde et $x = n_m kR$, x étant la taille spécifique de la particule d'indice n dans un environnement d'indice n_m.

On obtient donc deux modes de résonnance a et b qui sont respectivement, les résonnances électriques et magnétiques avec N le nombre de résonnances.

G.Mie obtient donc les différents modes de résonnance avec le mode dipolaire quand $N = 1$, quadrupolaire quand $N = 2$, octopolaire quand $N = 3$, etc …

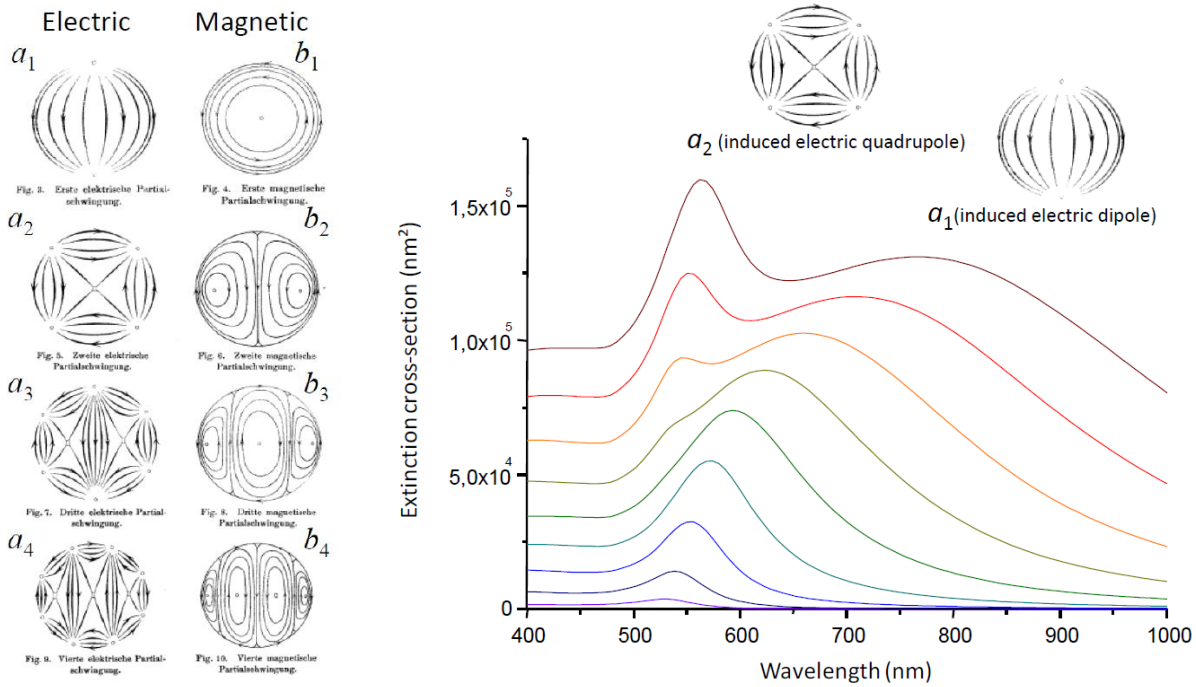


Figure I.8. Représentation des différents modes de résonnance électrique a_n et magnétique b_n avec le spectre UV-Vis qui en résulte. Issue des travaux de Mie[31].

Il est donc possible de voir sur le spectre UV-Vis d'une nanoparticule d'or, dont la taille augmente, un décalage vers les plus grandes longueurs d'onde du mode dipolaire avec une diminution du facteur de qualité, mais aussi l'apparition du mode quadrupolaire. Le mode de résonnance magnétique b_n n'est pas visible car le champ électromagnétique ne pénètre pas le métal (Figure I.8).

Si la taille est un facteur qui influence la position du pic d'absorption, il existe d'autres paramètres permettant de faire varier le décalage du pic d'absorption :

- Le milieu environnant : les formules précédentes ont montré l'impact de la constante diélectrique du milieu dans lequel se trouve la nanoparticule. Plus grand sera l'indice de réfraction du milieu, plus haut sera le pic de résonnance plasmon.
- Le changement de forme : les calculs ne seront pas explicités dans cette partie mais la forme des nanoparticules conduit à un changement important des propriétés optiques des nanoparticules (Figure I.9).

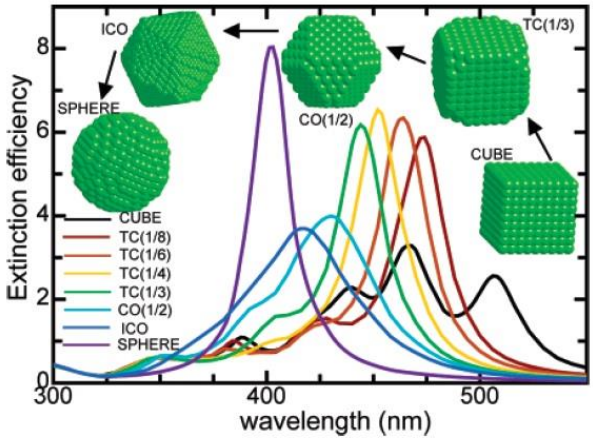


Figure I.9. Profil d'extinction en fonction de la longueur d'onde pour des nanoparticules d'argent de formes différentes. Issue des travaux de Noguez et al.[30].

- Le revêtement des nanoparticules qui a le même impact que le milieu environnement à savoir un effet direct sur l'indice de réfraction.
- Le couplage plasmonique dont l'effet va être discuté plus précisément.

Le couplage de nanoparticules affecte fortement les propriétés plasmoniques résultantes. En effet, le couplage tend à décaler le pic plasmon vers les plus grandes longueurs d'onde, parfois même dans le proche infrarouge. Si l'on considère deux nanoparticules sphériques suffisamment proches pour induire un couplage plasmonique alors nous n'observerons pas, optiquement, de changement pour une excitation transverse. Cependant, pour une excitation longitudinale, la composante plasmonique sera fortement décalée vers les plus grandes longueurs d'onde[32] (Figure I.10).

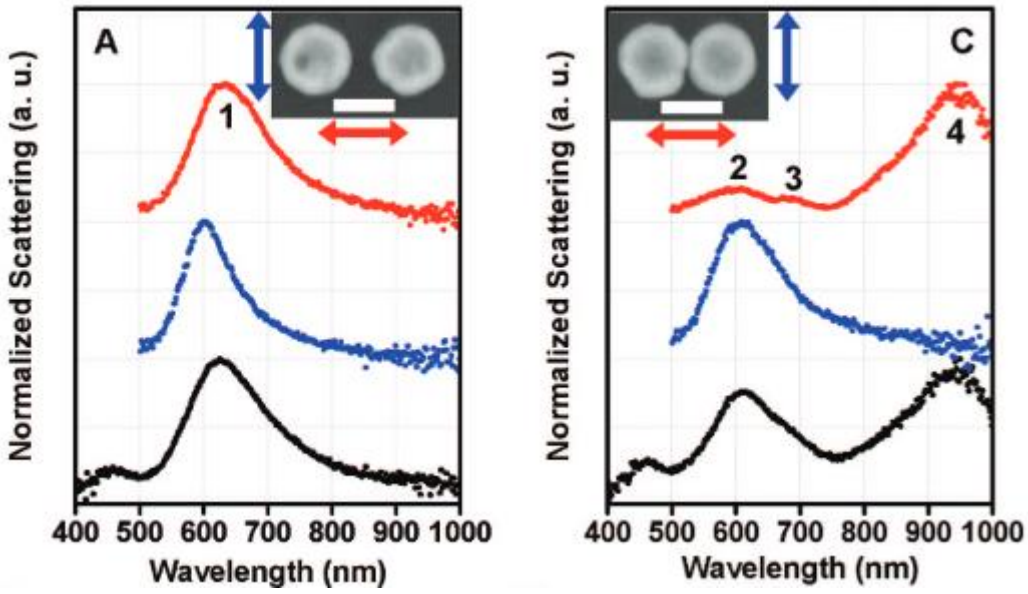


Figure I.10. Spectre de diffusion normalisée en fonction de la longueur d'onde pour deux nanoparticules SiO2@Au séparées de 20 nm (gauche) ou 1,5 nm (droite). La flèche et la courbe bleu représentent le mode transverse. La flèche et la courbe rouge représentent le mode longitudinal. Issue des travaux de Lassiter et al.[32].

Ce type de situation peut être traité par différents modèles[33,34] de l'approximation des milieux effectifs (EMA) mais ceux-ci ne seront pas détaillés ici.

Le couplage plasmon est très intéressant puisqu'il permet, à partir de formes sphériques simples, d'accéder à des propriétés optiques proches de celles obtenues avec des formes plus complexes. On peut aussi faire une analogie entre des chaînes de particules sphériques et des bâtonnets d'or. Le facteur d'amplification de la section efficace d'absorption F_a (rapport entre le coefficient d'absorption de l'agrégat sur le coefficient d'absorption d'une nanoparticule isolé multiplié par le nombre de nanoparticules dans l'agrégat) de chaînes parfaites de nanoparticules a été étudié dans les travaux de Khlebtsov et al.[35] qui ont montré théoriquement ce que pourraient être les propriétés optiques de chaînes de nanosphères en fonction du nombre d'agrégation (N) et de la distance inter-particules (s/d : distance normalisée par le diamètre des nanoparticules) (Figures I.11 et I.12).

$$F_a(\lambda) = \frac{C_{abs(agrégat)}(\lambda)}{N * C_{abs(NP)}(\lambda)}$$

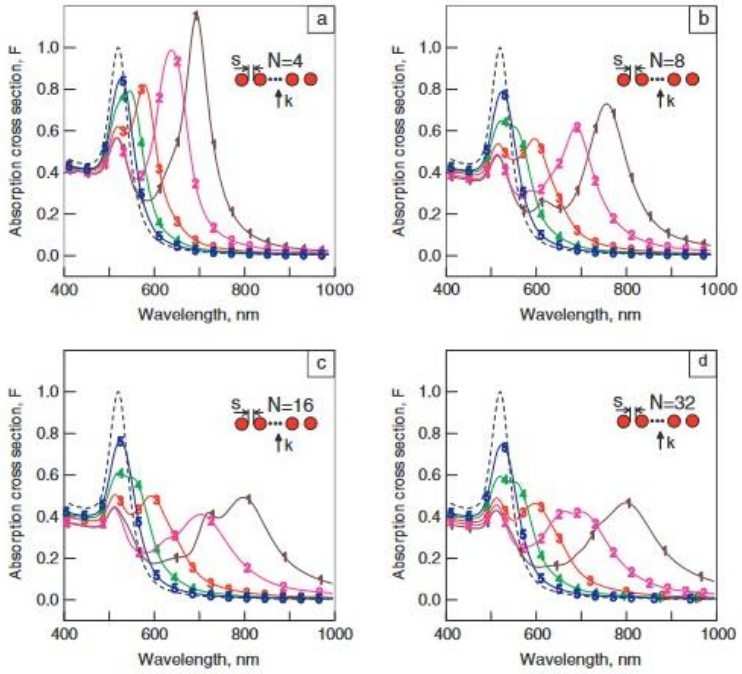


Figure I.11. Propriétés optiques attendues pour des assemblages de N nanoparticules de 40 nm isolées (pointillés) ou séparées d'une distance s/d de 0,025(marron), 0,05(rose), 0,125(rouge), 0,25(vert) et 0,5(bleu) nm. Avec s la distance inter-particules, d le diamètre de la particule. Issue des travaux de Khlebtsov et al.[35].

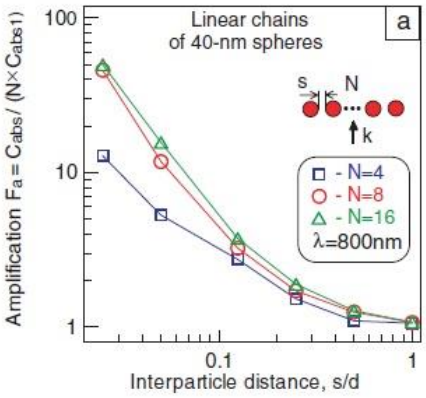


Figure I.12. Facteur d'amplification attendu pour une chaîne linéaire de N nanoparticules de 40 nm en fonction de la distance inter-particules s/d à 800 nm. Issue des travaux de Khlebtsov et al.[35].

Ces résultats montrent un fort décalage du pic plasmonique vers les plus grandes longueurs d'onde avec une amélioration du facteur d'amplification F_a. Cependant, on note que pour un nombre d'agrégation supérieur à 10, il n'y a plus d'effet d'amplification[36–38]. Ces travaux, bien que numériques, montrent l'intérêt de travailler avec des assemblages contrôlés de nanoparticules de formes simples notamment pour diverses applications nécessitant une réponse dans le proche infrarouge. C'est notamment le cas pour les applications dans le domaine du biomédical comme la thérapie par photothermie. Sous l'application d'un laser, les nanoparticules vont produire un dégagement de chaleur local permettant d'induire la nécrose des cellules cancéreuses. Mais ce type de systèmes nécessite de travailler dans des gammes d'absorption spécifiques qui permettent de ne pas endommager les tissus, qu'on appelle fenêtres de transparence biologiques (Figure I.13). Ces fenêtres de transparence, au

nombre de quatre, se trouvent dans la zone du proche infrarouge et de l'infrarouge. Comme montré sur la figure I.11 et I.12, des assemblages de particules sphériques peuvent permettre d'obtenir un maximum d'absorption dans ce domaine.

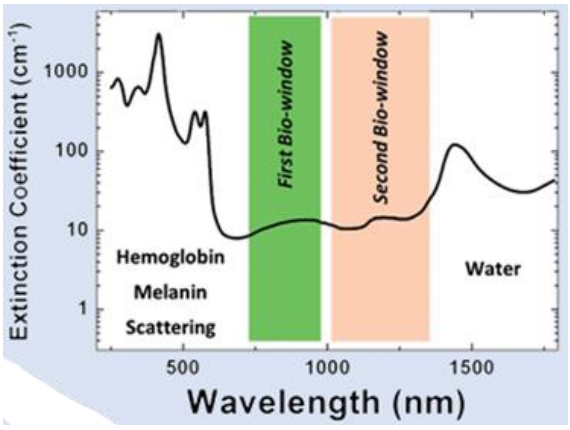


Figure I.13. Spectre d'absorption des tissus biologiques.

En plus d'un décalage des propriétés optiques, l'assemblage de nanoparticules conduit à une autre propriété intéressante qui est l'exaltation du champ électrique local au niveau d'un trou entre deux particules adjacentes ou d'une pointe. Le champ électrique rayonné par une nanoparticule peut être exprimé par la relation suivante :

$$E_{résultant} = E_0 \frac{2\varepsilon_m}{\varepsilon+2\varepsilon_d}$$ avec E_0 le champ électrique incident

Par exemple à 530 nm, dans l'air, le champ rayonné peut être cinq fois plus élevé que le champ incident. Cette élévation du champ électrique local permet d'exalter des signaux optiques (i.e. Raman, fluorescence).

Les régions où le champ électrique est ainsi amplifié sont appelées points chauds qui peuvent induire une nette augmentation du champ électrique local (Figure I.14). Ce type d'applications sera explicité dans le chapitre V concernant les applications liées aux agrégats plasmoniques générés pendant cette thèse.

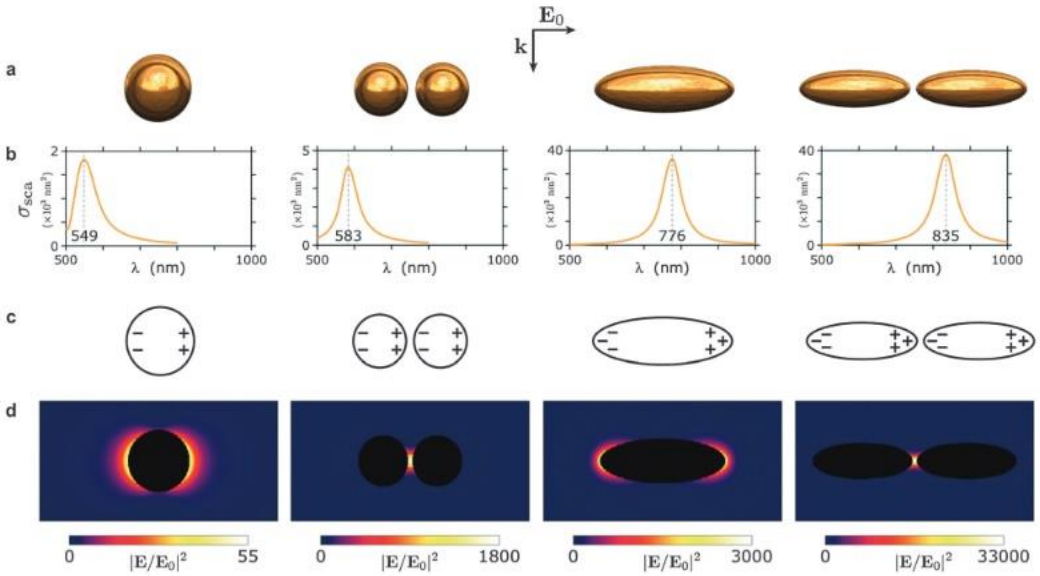


Figure I.14. Propriétés théoriques obtenues pour (a) des nanoparticules de géométries différentes isolées ou couplées. (b) Section efficace de diffusion résultante. (c) Schéma de la distribution de charge. (d) Schéma de l'exaltation du champ électrique à longueur d'onde de résonnance. Issue des travaux de Quidant et Baffou[39].

II) Généralités sur les chaînes polyélectrolytes linéaires

a) Types de polyélectrolytes et caractéristiques

Le terme polyélectrolyte (PEL) désigne une chaîne de polymère comportant un grand nombre de groupements ioniques. Une fois dissous dans un solvant polaire comme l'eau, ce type de polymère peut se dissocier avec d'une part le squelette portant les différents groupements chargés (i.e. macro-ion) et d'autre part les contre-ions (Figure I.15). Comme nous le verrons, la capacité à se dissocier est dépendante de la nature des macro-ions et parfois du pH de la solution. Dans le cadre de cette thèse, nous considérons le cas de chaînes polyélectrolytes linéaires dont les groupements ioniques sont de même nature.

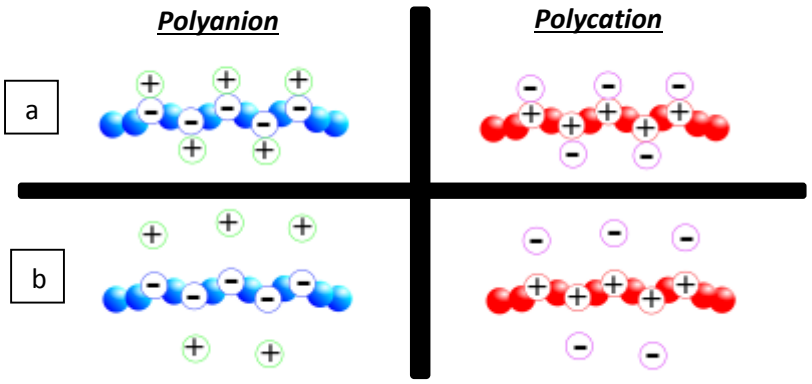


Figure I.15. Représentation de polyélectrolytes cationique/anionique sous leur forme non dissociée (a) ou dissociée (b). Les cercles pleins sont les groupements du monomère non chargés, les cercles vides de même couleur représentent les macro-ions et les cercles vides de charge opposée les contre-ions.

Il existe une très grande variété de polyélectrolytes. Les PELs dits naturels[40] comme le chitosan, l'acide hyaluronique ou encore la poly-L-lysine. Ils peuvent être synthétisés via plusieurs méthodes comme la fermentation bactérienne dans le cas de l'acide hyaluronique ou bien, dans le cas du chitosan, par récupération de la chitine présente dans la carapace de nombreuses espèces animales (insectes, animaux marins) puis par déacétylation (DA). On trouve aussi de nombreux polymères artificiels[41] anioniques ou cationiques, tels que le poly(styrène sulfonate) (PSS) très utilisé pour des propriétés de conduction électrique lorsque couplé avec du PEDOT[42] ou la polyéthylène imine. Ces polymères artificiels présentent l'avantage d'être issus de synthèses bien maîtrisées et donc d'obtenir des polyélectrolytes avec des paramètres contrôlés et un indice de polymolécularité proche de 1.

Les PELs peuvent être aussi rangés dans deux catégories (Figure I.16) :

- Les PELs dits « forts »
- Les PELs dits « faibles »

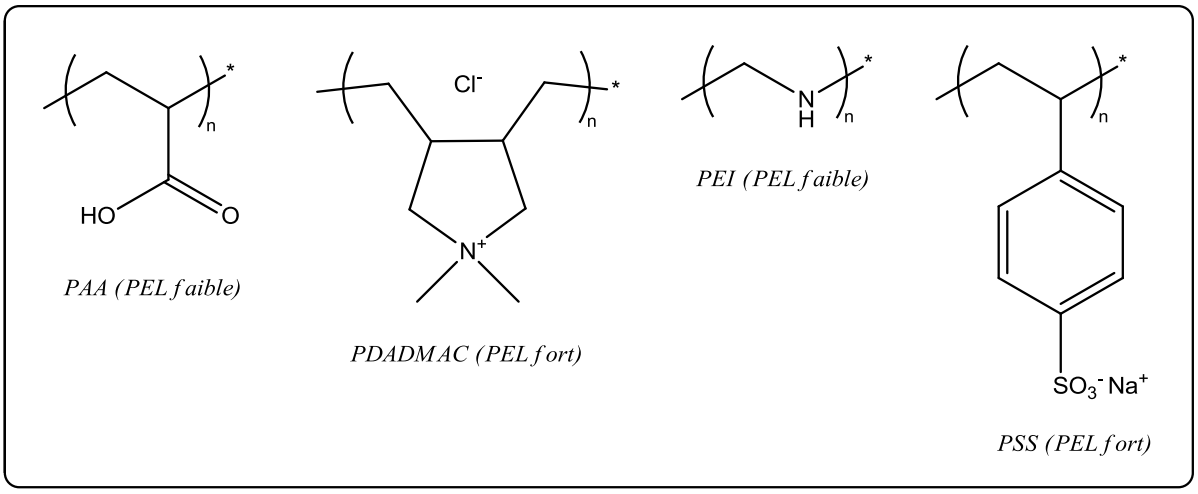


Figure I.16. Exemples de polyélectrolytes cationiques/anioniques faibles et forts.

La différence entre ces deux classes de polymères provient de leur capacité à dissocier macro-ion et contre-ion. Les PELs « forts » auront un taux de charge important avec une capacité à se dissocier indépendante du pH, on parlera alors de charge permanente.

Contrairement aux PELs dits « forts », les PELs « faibles » ont une faible densité de charge et un taux de charge cette fois-ci dépendant du pH du milieu. Il est possible de calculer la capacité d'ionisation en remontant au pH auquel le polymère devient ionisable grâce à sa constante d'acidité Ka :

$$AH + H_2O \leftrightarrow A^- + H_3O^+$$

Degré de dissociation $\alpha = \frac{[A^-]}{[AH]_0}$

$$Ka = \frac{[H^+][A^-]}{[AH]}$$

Il faut ensuite faire appel à l'équation de Henderson Hasselbach :

$$pH = pKa + \log\frac{\alpha}{1-\alpha}$$

Par exemple, il y aura dissociation à $pH > pKa$ pour un polyacide et à $pH < pKa$ pour une polybase.

Avant de discuter du comportement des PELs en solution, il convient de rappeler les grandeurs qui les caractérisent :

- La longueur de persistance intrinsèque L_{p0} (L_0) qui définit la longueur sur laquelle la chaîne est intrinsèquement rigide malgré l'agitation thermique.
- La longueur du monomère a.
- La longueur de contour L_c qui peut être déterminée par la relation $L_c = N * a$ avec N le nombre d'unités monomère.
- Son rayon de giration R_g, il s'agit de la distance radiale à laquelle la masse entière pourrait être localisée de telle sorte que le moment d'inertie soit le même que celui de la distribution réelle des masses.

D'autres caractéristiques physiques de ces polymères en solution vont être détaillées par la suite et dépendront des paramètres suivants :

- La longueur de Bjerrum (l_B) qui correspond à la distance au-delà de laquelle l'énergie d'intéraction électrostatique entre deux d'ions devient inférieure à l'énergie thermique k_bT.

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r k_B T}$$

e correspond à la charge élémentaire, ε_0 la permittivité du vide, ε_r la constante diélectrique, k la constante de Boltzmann et T la température absolue

- Le taux de charge $f = a/b$ qui est défini par le rapport entre la taille du monomère et la distance entre deux charges b.
- Le paramètre de Manning $\Gamma = l_B/b$, qui est défini comme le rapport entre la longueur de Bjerrum et la distance entre deux charges.
- La force ionique I qui dépend de la quantité d'ions en solution et donc aussi de la concentration en ions dissociés et la longueur de Debye-Hückel κ_{DH}^{-1} qui correspond à la longueur à partir de laquelle les charges sont écrantées. Cette valeur est directement liée à la concentration en ions et donc à la force ionique.

$$\kappa_{DH}^{-1} = (4\pi l_B I^{-2}) \text{ avec } I = \frac{1}{2}\sum_i z_i^2 C_i$$

C et z correspondant respectivement à la concentration et la charge de l'ion considéré i

- La longueur de persistance électrostatique[43,44] L_{pe} qui s'ajoute à la contribution intrinsèque pour déterminer la longueur sur laquelle la chaîne est rigide.

b) Comportement des polyélectrolytes en solution

i) Cas des polyélectrolytes fortement chargés

Dans le cas des polyélectrolytes fortement chargés, lorsque $b \leq a$ (i.e. $f \geq 1$), les interactions électrostatiques le long d'une chaîne deviennent si importantes qu'une partie des contre-ions restent condensés le long du squelette pour diminuer l'énergie libre du polymère suivant le mécanisme décrit par Manning[45,46]. Dans ces conditions, le potentiel électrostatique $\varphi(r)$ pour une chaîne à une distance $r \ll L_c$ peut s'écrire :

$$\varphi(r) = \left(\frac{e}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r b}\right)\ln(r) = \left(\frac{2kTb_B}{eb}\right)\ln(r)$$

Si la distribution des contre-ions suit la statistique de Maxwell-Boltzmann, alors elle s'écrit :

$$n(r) = n_0 exp^{-\varphi(r)} \approx r^{\frac{-2l_B}{b}}$$

Le nombre de contre-ions par unité de longueur situés à une distance inférieure à r peut donc s'écrire comme tel :

$$P(r) = \int_0^r 2\pi r' n(r') dr' = 2\pi n_0 \int_0^r r'^{\left(1-\frac{2l_B}{b}\right)} d(r')$$

Il y a convergence en 0 que si $b > l_B$ donc lorsque $\Gamma < 1$, dans ces conditions il n'y a pas de condensation. Cependant si $b < l_B$ donc lorsque $\Gamma > 1$, on admet dans ce cas qu'il y a condensation. Ce modèle donne donc un seuil pour lequel on considérera ou non le phénomène de condensation des contre-ions pour $\Gamma = 1$ (Tableau I.1).

	$\boldsymbol{\Gamma < 1}$	$\boldsymbol{\Gamma > 1}$
Taux de charges	Faible	Elevé
Condensation	Non	Oui
Distance entre charges	b > l_B	b < l_B

Tableau I.1. Taux de charge, condensation et distance entre charges en fonction du paramètre de Manning. Issue des cours d'auto-assemblage en solution à l'université de Bordeaux[47].

Cette description théorique a été développée pour des polyélectrolytes rigides de symétrie cylindrique et à très faible concentration mais elle constitue une première approximation acceptable pour les chaînes flexibles bien que leur conformation soit plus complexe.

ii) Cas des polyélectrolytes faiblement chargés

À l'état neutre, une chaîne de polymère flexible prend la configuration d'une pelote gaussienne en solvant thêta[48]. Le solvant thêta correspond à une température d'un solvant qui permet d'être dans la situation où le bilan des interactions entre maillons de la chaîne est nul.

En présence de charges électrostatiques et à faible force ionique dans un solvant polaire, le polymère prendra une conformation plus étirée mais avec quelques fluctuations à l'échelle locale. Dans une approche de type loi d'échelle, ces fluctuations sont décrites avec la notion de blob électrostatique de taille ξ_e. À l'intérieur de ces blobs, la chaîne n'est pas perturbée par la présence des charges et adopte une conformation identique à une chaîne neutre (Figure I.17). La charge est donnée par la relation suivante :

$q_e = fN_e e$ avec f la fraction de monomère chargée, N_e le nombre de monomère et e la charge

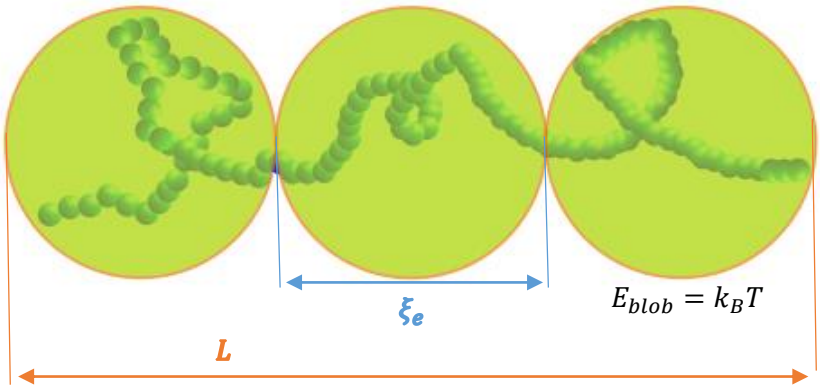


Figure I.17. Schéma des blobs électrostatiques.

Il est donc possible de distinguer deux régimes de comportements avec le diamètre d :

- $d < \xi_e$ où l'énergie thermique est équivalente à l'énergie électrostatique, dans ce cas la conformation dans le blob est équivalente à une chaîne neutre, donc en pelote.
- $d > \xi_e$ où l'énergie électrostatique prédomine et dans ce cas on considère que les blobs sont alignés, donc une chaîne de longueur L avec une conformation étirée.

À partir de l'hypothèse du blob électrostatique et en fonction du solvant, il est possible de remonter à la longueur L de la chaîne étirée et la taille ξ_e selon plusieurs équivalences (Tableau I.2) :

	ξ_e	L
Solvant theta	$a(\frac{l_B}{a})^{-1/3} f^{-2/3}$	$aN(\frac{l_B}{a})^{1/3} f^{2/3}$
Bon solvant	$a(\frac{l_B}{a})^{-3/7} f^{-6/7}$	$aN(\frac{l_B}{a})^{2/7} f^{4/7}$

Tableau I.2. Taille du blob électrostatique et longueur de la chaîne en fonction du solvant. Issue des cours d'auto-assemblage en solution à l'université de Bordeaux[47]

iii) Effet du sel

Les polyélectrolytes étant des macromolécules chargées, l'ajout de sel va avoir un impact important sur la conformation de ces derniers. En effet, l'augmentation de la force ionique va conduire à l'écrantage des charges et faire prendre au polyélectrolyte une conformation en pelote, au même titre que le ferait un polymère neutre. L'effet du sel sur les polyélectrolytes a par exemple été étudié par Kiriy et al.[49] qui a regardé le comportement du poly (chlorure de méthacryloyloxyéthyl de diméthylbenzylammonium) par AFM en fonction de la concentration en phosphate de sodium (Figure I.18).

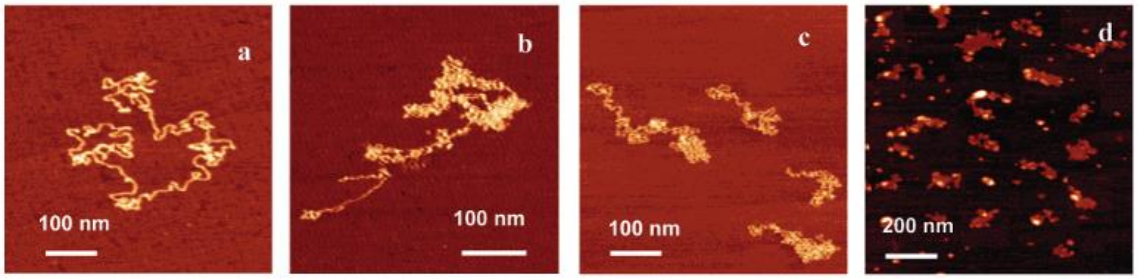


Figure I.18. Clichés AFM de chaîne de poly (chlorure de méthacryloyloxyethyl de diméthylbenzylammonium) avec 0 mM (a), 4,2 mM (b), 6 mM (c) et 8,4 mM (d) de phosphate de sodium. Issue des travaux de Kiriy et al.[49].

Chodanowski et Stoll[50] ont quant à eux réalisé des simulations de Monte Carlo pour prédire la conformation d'une chaîne polyélectrolyte en fonction de la molarité en sel monovalent (Figure I.19).

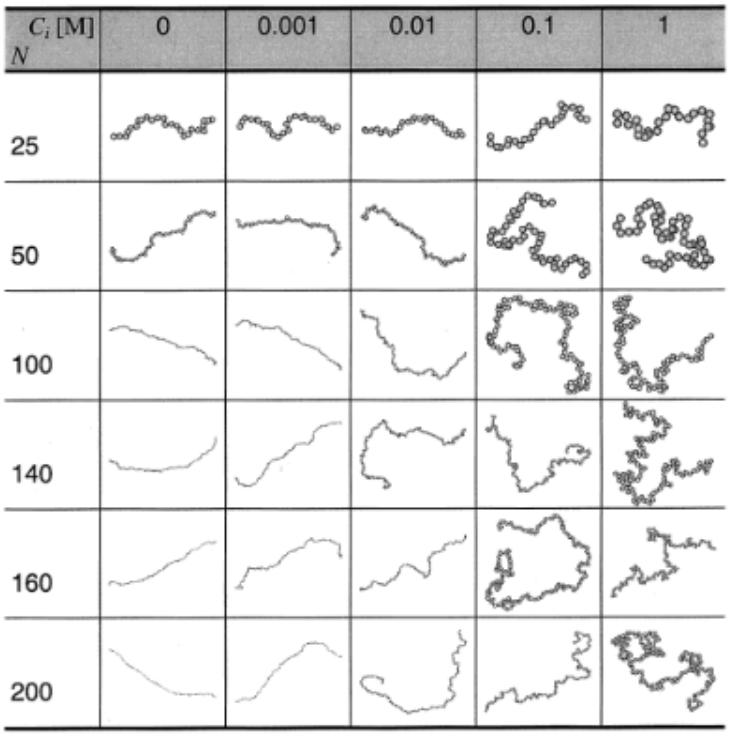


Figure I.19. Simulation Monte Carlo de la conformation d'une chaîne de polyélectrolyte constituée de N monomères en fonction de la concentration en sel. Issue des travaux de Chodanowski et Stoll[50].

c) Notions de longueurs de persistance intrinsèque et électrostatique

Il a été montré précédemment que la conformation des chaînes pouvait être caractérisée par des blobs électrostatiques, mais elle peut aussi l'être par sa longueur de persistance L_p. Cette notion a vu le jour en 1977 dans les travaux d'Odijk[43], puis avec les travaux de Skolnick [44]et Fixman[51], qui ont proposé un calcul de la longueur de persistance d'une chaîne quasi-rigide (L_p très grand). Leur modèle met en jeu une chaîne unique faiblement chargée avec des contre-ions suffisamment éloignés pour ne pas considérer leur influence.

Odijk considère l'énergie libre de la chaîne comme la somme de son énergie de courbure et l'énergie électrostatique des charges le long de la chaîne : $\Delta F = \Delta F_{elas} + \Delta U_{élec}$.

L'énergie de courbure est donnée sous sa forme intégrale et l'énergie électrostatique est donnée par le potentiel de Debye-Hückel :

$\Delta U_{élec} = \sum_{i,j} \frac{e^{-\kappa r_{i,j}}}{r_{i,j}}$ avec i et j la position des charges le long de la chaîne et κ est l'inverse de la longueur de Debye

La chaîne étant quasi-rigide, sa conformation est très proche de celle d'un bâtonnet avec une légère courbure ce qui implique que dans un référentiel d'abscisse x, l'expression de l'angle de courbure de la chaîne $\theta(x)$ peut être linéarisée et discrétisée, mais aussi que l'énergie électrostatique peut être considérée comme une perturbation par rapport à l'énergie de courbure.

La longueur de persistance totale L_{pt} peut alors se noter comme la somme d'une longueur de persistance de la chaîne si elle ne portait pas de charge L_0 et la longueur de persistance électrostatique L_{pe} :

$$L_{pt} = L_0 + L_{pe}$$

La chaîne doit être proche d'un bâton, le critère étant que la longueur étirée de la chaîne $L < L_{pt}/2$. On obtient donc, pour L_{pe}, une fonction analytique de κL, a condition que sur cette dernière soit très grande donc que L soit très grande devant la longueur de Debye-Hückel :

$L_{pe} = \frac{l_B}{4\kappa^2 A^2}$ avec A la distance entre les charges

Si l'on prend en compte la condensation de Manning ($\Gamma > 1$), alors $A = l_B$ et :

$$L_{pt} = L_0 + \frac{1}{4\kappa^2 l_B}$$

On peut donc retenir de ce modèle, avec l'hypothèse selon laquelle l'énergie électrostatique est une perturbation de l'énergie élastique, que la condition $L_{pe} \ll L_0$ est imposée, mais aussi que la longueur de persistance électrostatique L_{pe} est proportionnelle à κ^{-2}/l_B.

Odijk et al. proposent, en 1978, d'étendre ce calcul dans le cas de chaînes formées de plusieurs longueurs de persistance ($L/L_0 \gg 1$), c'est-à-dire à des chaînes beaucoup plus longues ou à une longueur de persistance intrinsèque L_0 plus faible. On considérera le cas d'une concentration en sel non nulle et un ensemble de chaînes indépendantes malgré l'écrantage des charges. En considérant les monomères comme des morceaux de longueur L_0 le long de la chaîne, les auteurs proposent de ne prendre en considération que les interactions au sein de ces régions. Si la chaîne reste rigide à plus grande taille, alors la distance entre deux morceaux sera supérieure à κ^{-1}. Si l'on considère comme étant négligeable la contribution des configurations où la chaîne, en se courbant, rapproche des charges éloignées alors on retrouve le résultat précédent avec la condition que le potentiel électrostatique soit une perturbation par rapport à l'énergie de courbure :

$$L_{pe} = \frac{1}{4\kappa^2 l_B}$$

Barrat et Joanny[52] ont proposé un modèle dans lequel les chaînes sont considérées comme flexibles, c'est-à-dire avec une composante électrostatique dominante ($L_{pe} > L_0$). Dans ce cas :

$$A \ll (L_0 l_B)^{1/2}$$

À partir d'une énergie de courbure et d'une énergie électrostatique écrantée, les auteurs ont repris numériquement le calcul de la moyenne $\langle\theta(x)^2\rangle$ sur toutes les configurations d'une chaîne semi-flexible. Lorsque x est petit alors $\langle\theta(x)^2\rangle = s/L_0$ comme pour un polymère neutre. L'hypothèse selon laquelle la contribution électrostatique des charges éloignées le long de la chaîne semi-flexible peut être négligée n'est valable que dans le cas où la courbure reste faible.

Cependant, si x dépasse une valeur critique x_c alors $\langle\theta(x)^2\rangle$ et on retombe sur le résultat :

$$\langle\theta(x)^2\rangle = \frac{x}{L_{pe} + L_0} + constante$$

Ici, les distances sont suffisamment grandes pour que la chaîne puisse se rigidifier.

Si l'on prend le cas d'un faible écrantage (κ petit), alors le calcul de x_c donne un résultat qui peut se retrouver qualitativement. Une chaîne de longueur $x > \kappa$, qui se courbe d'un angle θ à une énergie de courbure $k_B T L_0 \theta^2/2$ et une énergie électrostatique $k_B T l_B (x/A)^2 \theta^2/2$. Les deux énergies sont comparables lorsque l'on approche la valeur critique de x :

$$x_c \sim A \frac{L_0}{l_B} H^{1/2}$$

On a donc validité du modèle d'Odijk lorsque $\langle\theta(x_c)^2\rangle \ll 1$, soit :

$$A \ll (L_0 l_B)^{1/2}$$

Après avoir exposé les limites de validité d'une théorie valable dans le cas de chaînes rigides, les auteurs proposent, dans d'autres travaux, un traitement dont le but est de minimiser l'énergie libre du système. Ils considèrent à nouveau un modèle simple d'une succession de blobs électrostatiques avec des conditions d'écrantage nulles. Les interactions à l'intérieur des blobs sont considérées comme nulles. Cependant, chacun de ces blobs est soumis à une tension $k_B T \tau$ avec τ l'amplitude de la force de tension. Pour le traitement du cas où la chaîne serait gonflée à grande échelle ($> L_p$), la direction de la tension peut varier mais pas son amplitude.

L'énergie libre va donc dépendre de l'énergie liée à la rigidité intrinsèque de la macromolécule, de l'énergie de la succession linéaire de tous les blobs, de l'entropie liée aux changements de direction de la tension et du changement de l'énergie électrostatique provoqué par les variations de direction. Finalement, on obtient :

$$L_p \sim \kappa^{-1}$$

Barrat et Joanny mettent donc en évidence les deux cas limites où, lorsque la chaîne est rigide alors la théorie d'Odijk est valable avec $L_{pt} = L_0 + L_{pe}$ et $L_{pe} = \kappa^{-2}$ et lorsque la chaîne est flexible alors L_p est proportionnel à κ^{-1}.

Les résultats d'Odijk peuvent aussi être retrouvés dans les travaux de Buhler et Boué[53] qui ont étudié la variation de la longueur de persistance du Hyaluronane (semi-rigide) en fonction

de la force ionique par diffusion des neutrons aux petits angles (SANS). Ils montrent ainsi que la contribution apportée par la longueur de persistance électrostatique est proportionnelle à κ^{-2}.

Après avoir discuté des généralités sur les nanoparticules d'or et les polyélectrolytes, il convient de parler des assemblages entre ces deux briques élémentaires, en discutant avant des différents travaux sur les assemblages de nanoparticules de manière générale.

III) Assemblages de nanoparticules

a) Assemblages de nanoparticules à l'aide d'une « empreinte » ou d'un milieu confinant

L'assemblage de nanoparticules est un domaine exploré depuis de nombreuses années.

L'assemblage de nanoparticules est souvent obtenu par l'utilisation d'une « empreinte » (i.e. template) permettant de faciliter l'assemblage et la structure finale souhaitée. Cheng et al.[54] ont, par exemple, travaillé sur l'assemblage de nanoparticules d'or préalablement fonctionnalisées avec des brins d'ADN par séchage sur des feuillets composés de micro puits qui conduit à des structures bidimensionnelles (Figure I.20a). Les résultats montrent une structuration contrôlée permettant de faire varier les propriétés plasmoniques en changeant la longueur des brins d'ADN. Dujardin et al.[55] ont, quant à eux, travaillé sur la réduction et l'assemblage de plusieurs nanoparticules (Pt, Ag et Au) en utilisant un virus de la mosaïque du tabac comme « empreinte » conduisant à des assemblages unidimensionnels (Figure I.20b). La modification du pH de la solution permet l'assemblage sélectif de nanoparticules, sur la face externe ou dans les canaux du virus du tabac, avec cependant une forte polydispersité sur la taille des nanoparticules.

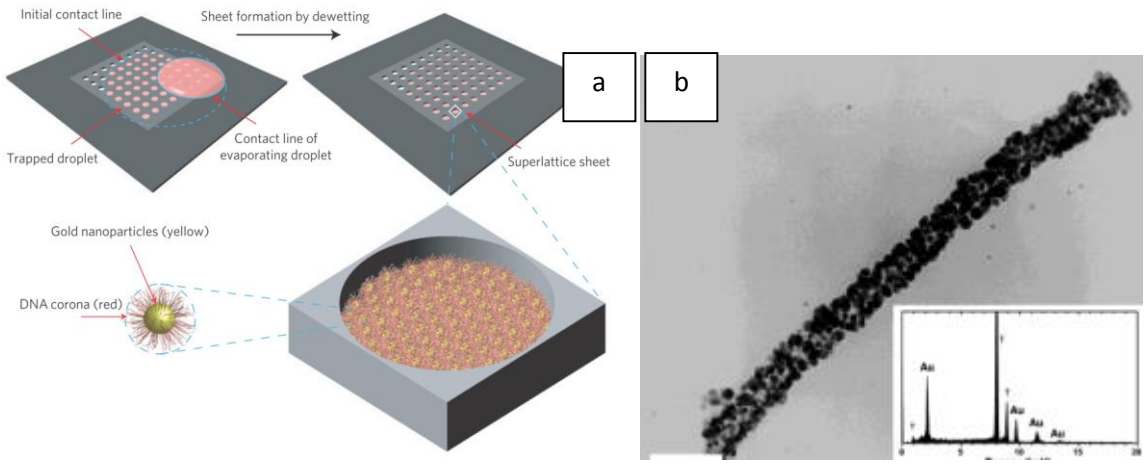


Figure I.20. (a) Représentation de la méthode d'agrégation de AuNPs@ADN par séchage dans des micropuits (Issue des travaux de Cheng et al.[54]. (b) Cliché en microscopie électronique d'assemblage de nanoparticules d'or sur un virus de mosaïque du tabac. Barre d'échelle 100 nm (Issue des travaux de Dujardin et al.[55]).

Une autre méthode consiste à utiliser des cristaux liquides comme milieu confinant. Des travaux récents[56] ont montré la possibilité d'utiliser les défauts générés par une phase smectique huileuse pour obtenir des assemblages de nanoparticules. En effet, cette phase smectique est caractérisée par la présence de défauts unidimensionnels (dislocation) et bidimensionnels semblables à des rubans. Les nanoparticules vont occuper ces défauts pour former des chaînes linéaires ou des structures hexagonales. La phase étant huileuse, les nanoparticules nécessitent d'être stabilisées avec des molécules hydrophobes comme des acides gras. Un désavantage de cette méthode est sa grande sensibilité à des paramètres externes comme la température mais elle permet tout de même la possibilité d'obtenir des assemblages avec un contrôle structural relativement précis.

Les systèmes colloïdaux sont utilisés depuis longtemps pour modéliser et visualiser à l'échelle macroscopique des structures atomiques. Ainsi, en 1940, alors que la microscopie électronique ne faisait que débuter, Bragg et Nye[57] observaient à l'échelle macroscopique des processus de dislocation dans des réseaux de bulles à 2D modélisant des structures métalliques. Par la suite, ce type d'approche a permis, par exemple, de mieux comprendre les processus de transition vitreuse, de formation/fusion de cristaux ou de transition ordre/désordre. Dans le domaine des nanomatériaux, cette analogie entre deux échelles a permis d'ouvrir la voie à de nombreux assemblages visant à reproduire des modèles atomiques par l'assemblage de cristaux colloïdaux. Une méthode couramment employée consiste en l'utilisation d'origami d'ADN comme « empreinte » pour la formation de structures plus complexes. Cette macromolécule est composée d'oligonucléotides comportant cinq bases : (A) adénine, (C) cytosine, (G) guanine, (T) thymine et (U) uracile. Ces dernières ont la possibilité de se coupler deux par deux (A/T et C/G) via des liaisons hydrogène qui conduisent à la structure hélicoïdale bien connue (Figure I.21).

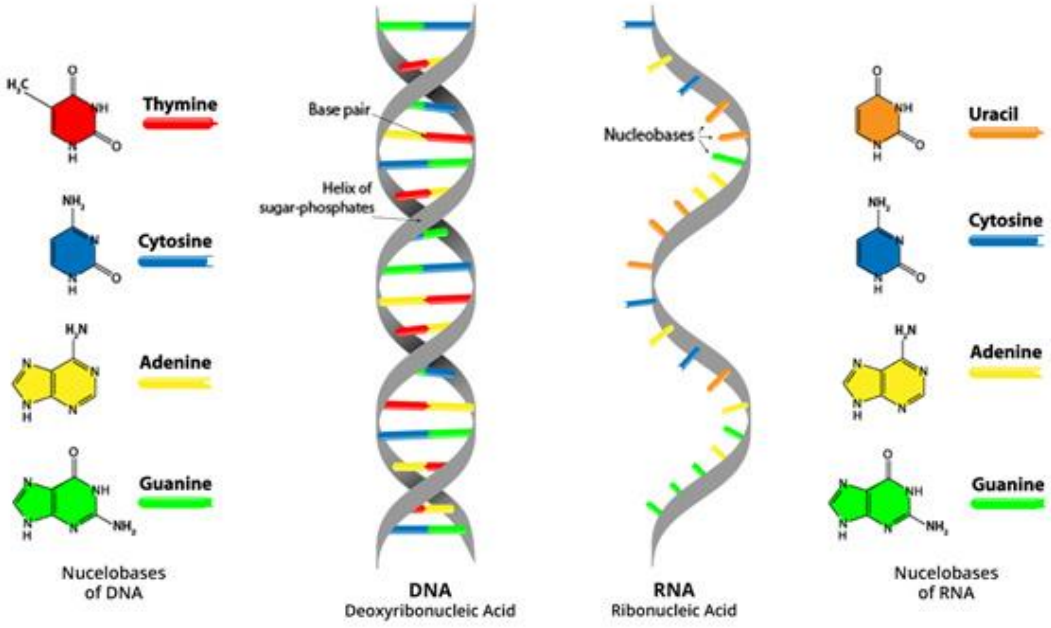


Figure I.21. Schéma de formation d'un brin d'ADN par création de liaisons hydrogène entre les bases A/T et C/G et d'un brin d'ARN. Issue du site technology network[58].

Cette hybridation des oligonucléotides a conduit à une nouvelle voie d'assemblage de nanoparticules. Cette stratégie est d'autant plus intéressante qu'elle présente un caractère réversible. Dans ses travaux, Sharma et al.[59], ont travaillé sur des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des brins d'ADN pour l'assemblage et le désassemblage de ces dernières lorsqu'elles sont soumises à différents pH.

L'utilisation de brins d'ADN a aussi conduit à la formation de structures plus complexes telles que des origamis de nanoparticules[60]. Ces origamis peuvent aller jusqu'à mimer des réseaux cristallins ou encore des conformations de molécules. Tian et al.[61] ont, par exemple, étudié l'assemblage de nanoparticules d'or sur des « empreintes » d'ADN de structures prédéfinies[62]. Ces assemblages conduisent à des structures particulières allant de la simple maille cubique à la maille tétragonale centrée (Figure I.22).

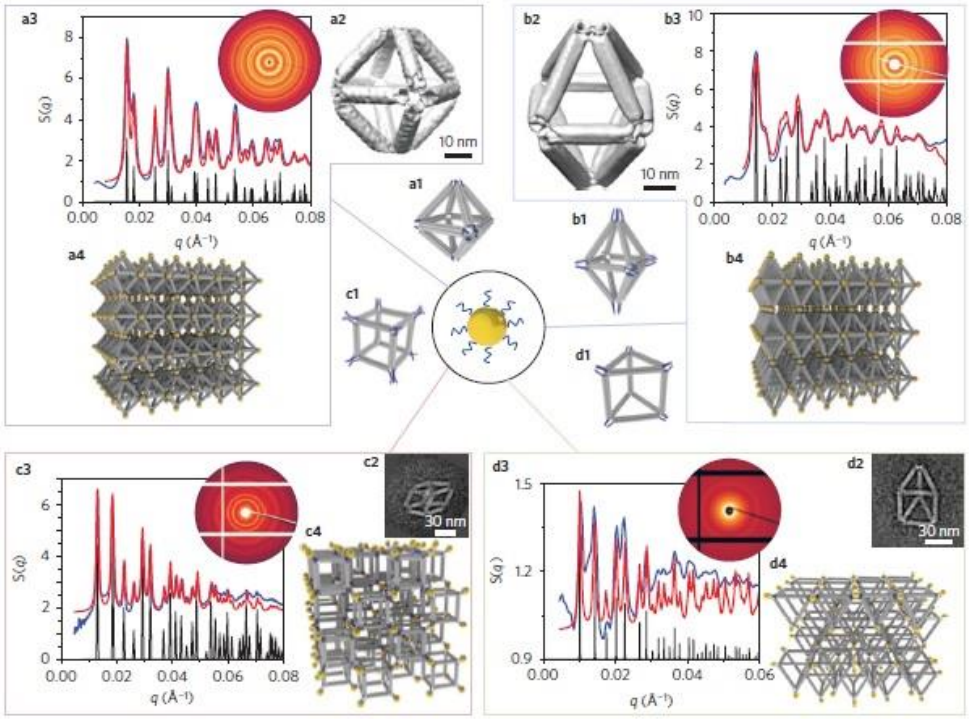


Figure I.22. Assemblage de nanoparticules fonctionnalisées avec de l'ADN conduisant à différentes structures cristallines, caractérisées en diffusion de la lumière aux petits angles (SAXS). Issue des travaux de Tian et al.[61].

Une autre méthode permettant d'assembler des nanoparticules consiste à utiliser comme « empreinte » un polymère. On peut par exemple citer les travaux de Sardar et al.[63] qui ont réalisé des assemblages de nanoparticules d'or en milieu aqueux par l'intermédiaire de liaison covalente avec différents polymères, le poly(acide acrylique) (PAAc) et le poly(allyle amine) (PAAm). Ces assemblages ont la particularité de conduire à un excellent contrôle de la distance inter-particules dans l'agrégat grâce à la distance entre les groupements fonctionnels du polymère. Le point négatif de cette méthode est son aspect multi étapes (Figure I.23).

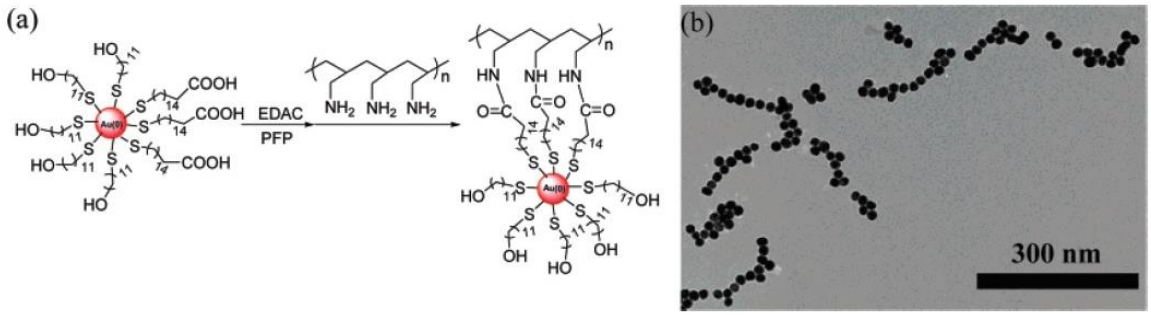


Figure I.23. (a) Schéma du mécanisme d'assemblage des nanoparticules d'or, (b) caractérisé en microscopie électronique en transmission. Issue des travaux de Sardar et al.[63].

On retrouve aussi dans la littérature la formation d'assemblages complexes de nanoparticules d'or par l'intermédiaire « d'empreintes » qui sont des particules en forme de cavités comme illustré sur la figure I.24 a. Ces travaux[64] consistent en la formation d'une particule de silice à cavités. Ces cavités contiennent des groupes pendants NH_2 permettant de les fonctionnaliser avec des nouvelles particules de silice-COOH par liaison covalente que l'on nommera particules satellites. La surface des particules satellites est ensuite aminée pour faire croître une écorce d'or (Figure I.24 a).

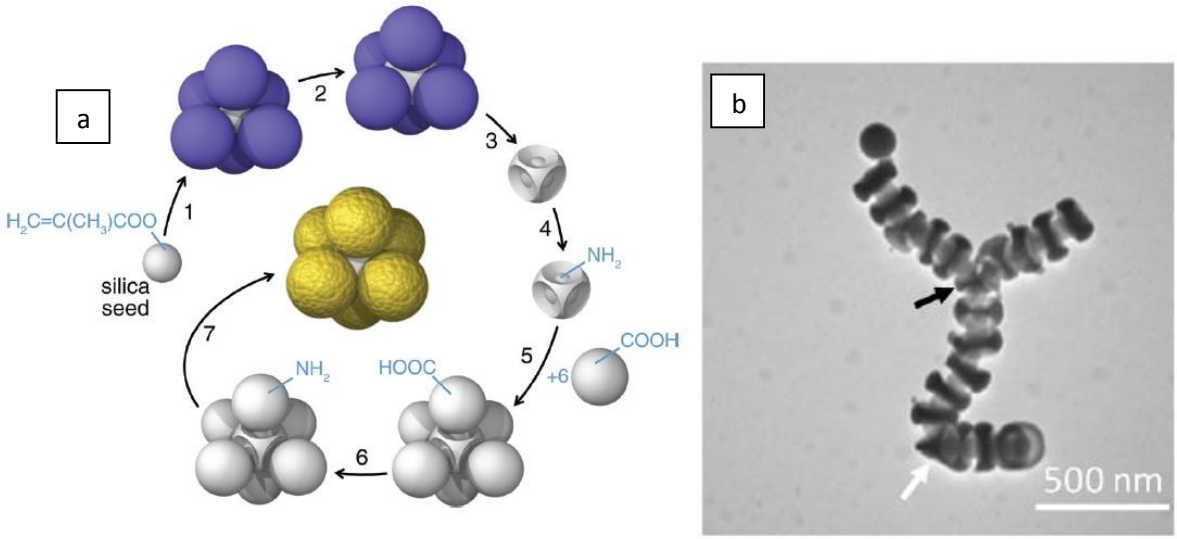


Figure I.24. (a) Représentation schématique des étapes de synthèses d'un agrégat plasmonique (issue des travaux de Tanjeem et al.[64]). (b) Cliché TEM d'un « polymère colloïdal » par l'assemblage de particules à cavités. La flèche noire montre un carrefour de trois liaisons et la flèche blanche un carrefour de deux liaisons (issue des travaux de Li et al.[65]).

Basé sur ce même principe, on peut citer les travaux de Li et al.[65] concernant la formation de polymères colloïdaux par utilisation de ces particules à cavités (Figure I.24 b).

Les méthodes citées précédemment sont réalisées par l'intermédiaire « d'empreintes » servant à ordonner les assemblages. Ces méthodes permettent d'obtenir une large variété de structures bien définies de façon contrôlée. Néanmoins, elles ont le désavantage d'être multi-étapes et nécessitent la plupart du temps des fonctionnalisations particulières des nanoparticules. De plus, cette voie présente des rendements faibles et l'empreinte utilisée reste souvent couplée aux nanoparticules et contribue aux propriétés de l'ensemble. Nous

présenterons par la suite deux voies d'assemblages faisant varier des paramètres externes permettant la formation de structures sans utilisation « d'empreintes ».

b) Assemblage par variation des forces d'interactions

La voie d'assemblage passant par la variation des forces d'interactions fait l'objet de certains travaux dans la littérature. Cette démarche consiste en l'assemblage par diverses interactions telles que les forces hydrophobes ou les forces de Van der Walls. Des cristaux colloïdaux compacts de particules monodisperses ou polydisperses[66] peuvent être ainsi obtenus en l'absence d'empreinte en contrôlant « simplement » le potentiel d'interaction des particules[67,68]. Ainsi, ce paramètre permet de moduler le caractère cristallin des structures obtenues et les seuils d'agrégation.

On peut par exemple citer les travaux de Bowden et al.[69], qui consistent à étudier les principes des assemblages à différentes échelles (nanométrique à micrométrique). Ils ont, par exemple, étudié les structures formées par des hexagones de perfluorodecalin (PFD) dans l'eau qui, sous l'effet d'interactions hydrophobes, tendent à s'organiser dans des structures de forme hexagonale par interactions entre faces (Figure I.25).

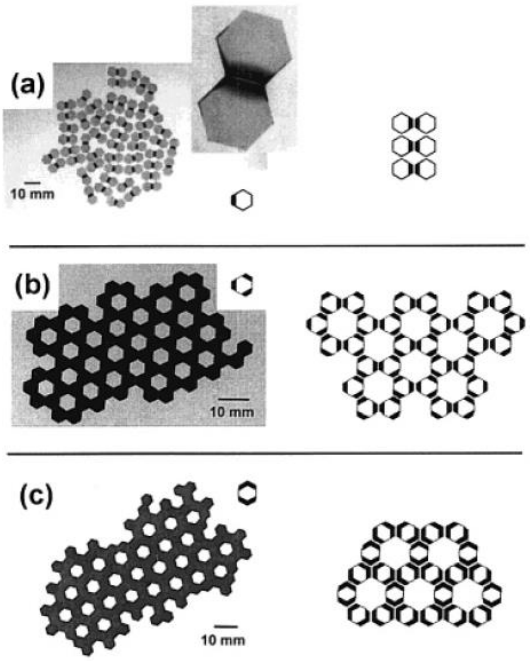


Figure I.25. (a) Assemblages en dimères selon la face hydrophobe de PFD. (b et c) Assemblage hexagonal selon les faces hydrophobes de PFD. Issue des travaux de Bowden et al.[69].

On peut également citer les travaux de Hajiw et al.[70] qui ont montré la possibilité de reproduire la phase C14 décrite par Frank et Kasper[71] en utilisant des nanoparticules recouvertes de dodécanethiol dans une émulsion aqueuse. Les forces hydrophobes et les répulsions stériques entre les ligands thiolés permettent d'obtenir, en fonction de la température différentes phases. Lin et al.[7] ont, quant à eux, réalisé l'assemblage en milieu aqueux de nanoparticules d'or citratées par ajout d'un ligand thiol, le mercaptoéthanol (MEA).

À « faible » concentration, le ligand va substituer en partie les citrates en surface des nanoparticules conduisant à une diminution de la charge de la surface des particules et ainsi à une diminution de la force de répulsion électrostatique. Par la suite, les auteurs observent la formation d'agrégats de nanoparticules unidimensionnels via une cinétique lente (Figure I.26a). Les auteurs associent le caractère unidimensionnel de l'agrégation à la contribution d'un moment dipolaire électrique attractif susceptible de dominer la répulsion électrostatique à l'échelle locale. Han et al.[72], quant à eux, parlent d'assemblages dans l'éthanol de nanoparticules d'or fonctionnalisées par un sel de phenylphosphate dipotassium dihydraté (BSPP) par un simple changement de la force ionique ou du solvant. L'augmentation de la force ionique va induire une diminution de la force de répulsion électrostatique et une agrégation provoqué par les forces de Van der Walls. La particularité de ces assemblages provient du caractère réversible de l'agrégation par le simple ajout d'eau milliQ qui tend à diminuer la force ionique du système (Figure I.26b).

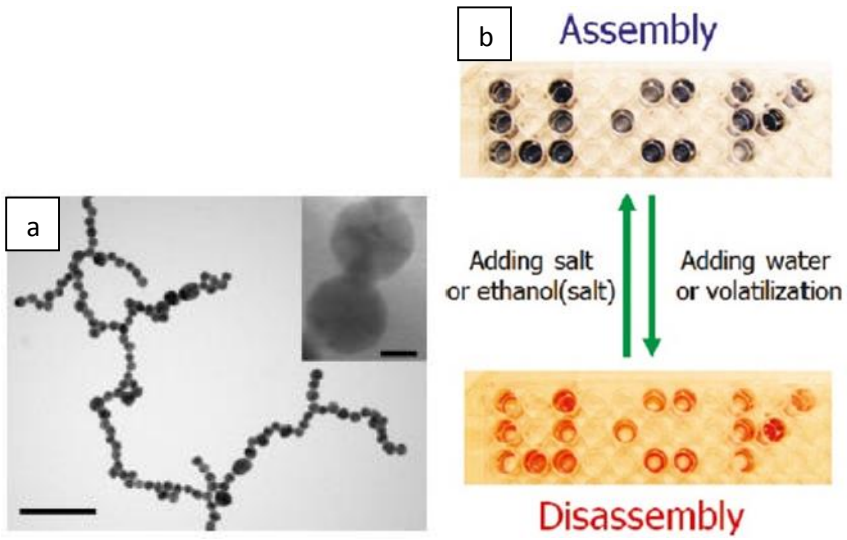


Figure I.26. (a) Cliché en microscopie électronique d'assemblage de nanoparticules d'or 24h après ajout de MEA, barre d'échelle 100 nm. Cliché TEM en grossissement de l'agrégat, barre d'échelle 5 nm (Issue des travaux de Lin et al.[7]). (b) Photos d'assemblage-désassemblage de AuNPs/BSPP par changement de la force ionique ou de solvant (Issue des travaux de Han et al.[72]).

c) Assemblage par application d'un champ de force externe

Nombreuses sont les nanoparticules pouvant être assemblées par application d'un champ magnétique ou d'un champ électrique. Comme pour la voie précédente, celle-ci présente l'avantage de ne pas passer par une « empreinte » et de faire des assemblages de manière rapide.

On peut par exemple citer les travaux de Ahniyaz et al.[73] sur la formation de structures ordonnées par application d'un champ magnétique externe dans le cas de nanoparticules de maghémite (γ-Fe_2O_3) (Figure I.27). Les nanocubes de maghémite fonctionnalisés avec de l'acide oléique sont déposés sur une grille TEM. Pendant l'étape d'évaporation du toluène, un faible champ magnétique est appliqué avec un aimant permanent pour induire l'assemblage ordonné des nanoparticules.

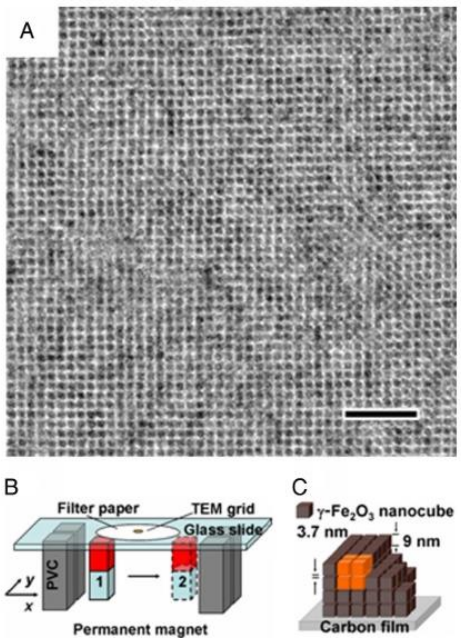


Figure I.27. (A) Cliché MET d'assemblage de nanoparticules de maghémite par application d'un champs magnétique externe, barre d'échelle 100 nm. (B) Représentation schématique du montage avec champs magnétique. (C) Représentation schématique de la structure formée par l'assemblage de maghémite. Issue des travaux de Ahniyaz et al.[73].

On peut également citer les travaux de Hermanson et al.[74] visant à assembler des nanoparticules d'or par application d'un champ électrique externe. Sous l'application de ce champ électrique, les nanoparticules vont venir se coller aux électrodes pour former des microfilaments d'or stables (Figure I.28). Les auteurs reportent la possibilité de contrôler la structure des filaments pour ajout « d'ilots » conducteur (Figure I.28 B) mais n'indiquent pas si la structure peut être conservée après arrêt du champ électrique.

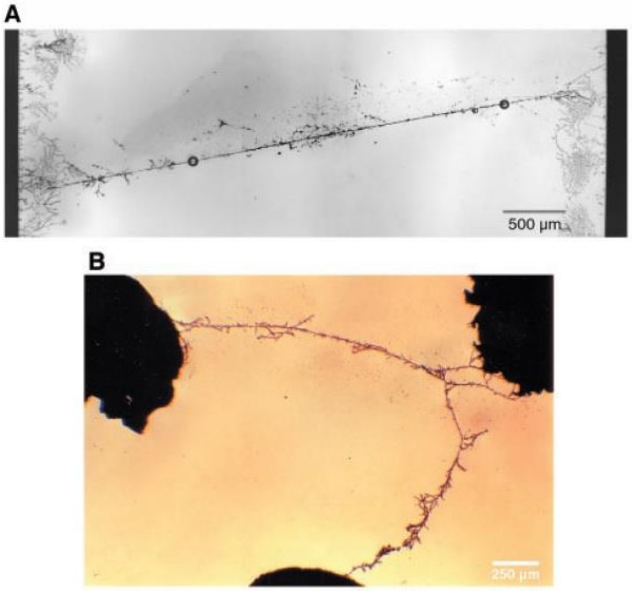


Figure I.28. Filament de nanoparticules d'or obtenu par application d'un champ électrique entre deux électrodes. (B) Structure plus complexe de filaments de nanoparticules d'or par ajout « d'ilots » conducteurs. Issue des travaux de Hermanson et al.[74].

On peut également retrouver ce type de voie d'assemblage dans les travaux de Gangwal et al.[75] visant à assembler, sous l'effet d'un champ électrique, des nanoparticules Janus métallodiélectrique PS/Au dans l'eau milliQ. Ce type de nanoparticules conduit à un large panel d'assemblages selon la fréquence et l'intensité du champ électrique appliqué (Figure I.29). Les auteurs parlent du caractère réversible de cette méthode en reportant la dispersion des particules après l'arrêt du champ électrique. Ce même groupe[76] a ensuite travaillé sur le même type de système composé cette fois-ci d'une couche de fer à la place de l'or, qui conduit à la possibilité d'assembler les nanoparticules par application d'un champ électrique ou magnétique, mais aussi à la possibilité de désassembler les structures par application d'un champ démagnétisant.

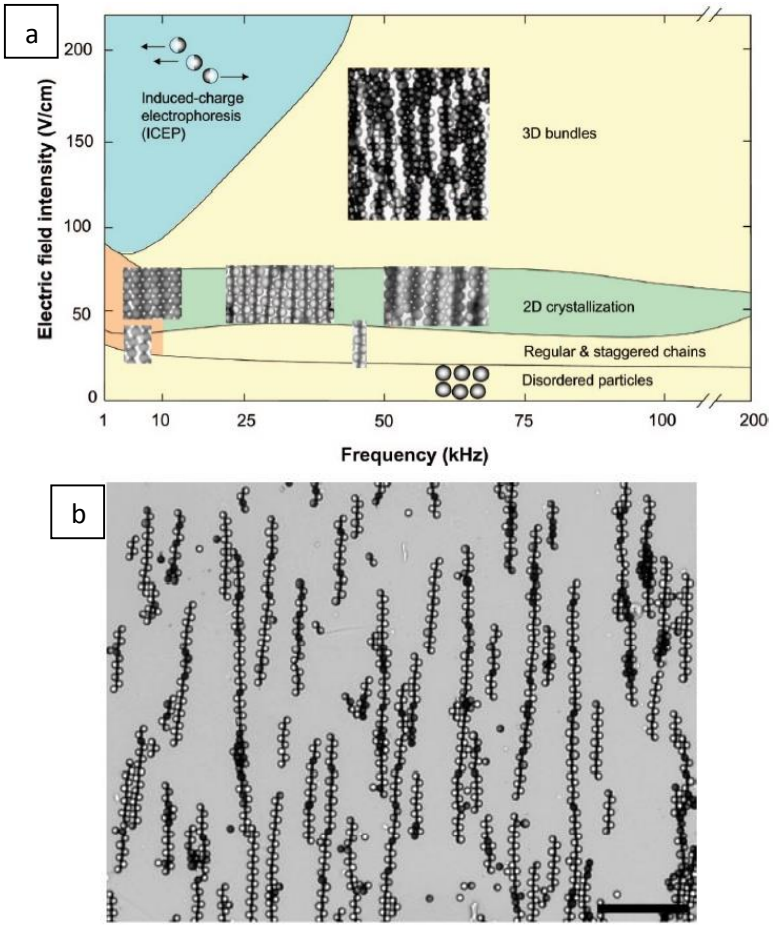


Figure I.29. (a) Diagramme de phase représentant le type de structure obtenue avec des particules Janus PS/Au en fonction de l'intensité du champ électrique et de la fréquence. (b) Cliché de microscopie optique d'assemblages obtenus pour un champ électrique de 56V/cm et une fréquence de 40kHz, barre d'échelle 70 µm. Issue des travaux de Gangwal et al.[75].

Les deux dernières voies d'assemblages (b et c), bien qu'intéressantes, présentent tout de même certaines limites. Faire varier les forces d'interactions du système permet l'assemblage, parfois linéaire, de nanoparticules, mais il est cependant difficile de contrôler le paramètre du nombre d'agrégation qui conduit à des structures de taille non contrôlée. La voie d'assemblage par application d'un champ externe présente ce même inconvénient, en plus de nécessiter parfois un dispositif expérimental plus conséquent et des nanoparticules sensibles

au champ appliqué. Par ailleurs, l'arrêt du champ électrique ou magnétique conduit souvent au désassemblage des structures.

d) Assemblage par complexation électrostatique

Avec l'émergence de nombreuses méthodes, les possibilités d'assemblage deviennent conséquentes. Cependant, il est à noter que la voie d'assemblage par complexation électrostatique avec des chaînes polyélectrolytes est peu considérée dans la littérature[77,78].

La complexation électrostatique, consiste en l'interaction de deux espèces de charges opposées. Cette interaction conduit à un diagramme de phase assez similaire quelle que soit la nature des espèces (PELs, NPs, protéines, …), montrant trois domaines. Deux de ces domaines sont des domaines « monophasiques » à l'échelle macroscopique tandis que le troisième domaine est « biphasique » à l'échelle macroscopique. Les domaines « monophasiques » sont des suspensions de complexes électrostatiques et de l'espèce introduite en excès. Le signe de la charge globale des complexes électrotatiques est le même que celui de l'espèce en excès. En régime dilué, le domaine « biphasique » se compose d'une phase dense liquide (i.e. coacervat) ou solide (i.e. précipité) contenant l'essentiel des espèces chargées et une phase de surnageant très diluée en espèces chargées. Ce domaine « biphasique » est centré autour de la ligne de stœchiométrie de charge des espèces en présence.

Les complexes entre des chaînes PELs et des nano-objets de charges opposées sont particulièrement présents dans la nature. On peut citer par exemple l'organisation de l'ADN qui, par complexation électrostatique avec les histones, donne des structures complexes (chromatine). L'information génétique est ensuite monitorée par l'ouverture ou la compaction de la chromatine[79,80] (Figure I.30).

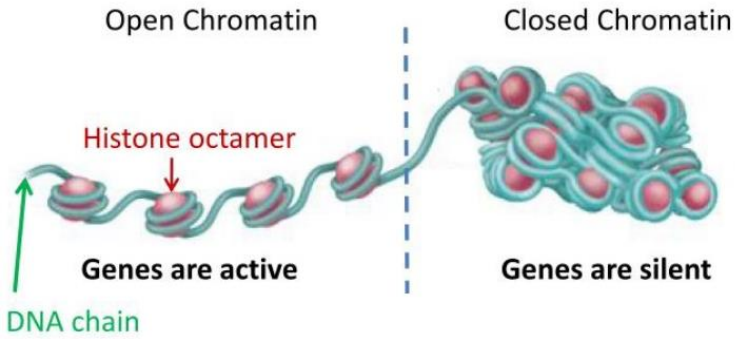


Figure I.30. Représentation schématique de la conformation d'un complexe ADN/Histone dans la chromatine. Issue des travaux de Mohd-Sarip et al.[80].

On retrouve aussi l'utilisation de complexation pour la purification des eaux usées où des PELs comme le chitosan sont utilisés pour les premières étapes de purification[81,82].

Dans le domaine des nanosciences, les PELs ont été utilisés pour la synthèse et la stabilisation de nanoparticules en présence d'un sel. On peut notamment citer les travaux de Huang et al.[83] qui ont travaillé sur la synthèse de nanoparticules d'or et d'argent en utilisant des polysaccharides (chitosan et héparine), qui joue à la fois le rôle de réducteur et d'agent

stabilisant. On notera aussi, sur le même principe, les travaux de Mulens-Arias et al.[84] qui consistent à synthétiser des nanoparticules d'or par utilisation de polyéthylène imine. Cette synthèse conduit à la formation de chaînes de nanoparticules. Cependant, cette méthode conduit à la formation de nanoparticules avec une grande polydispersité et nécessite plusieurs jours, voire semaines, avant l'obtention des structures. (Figure I.31).

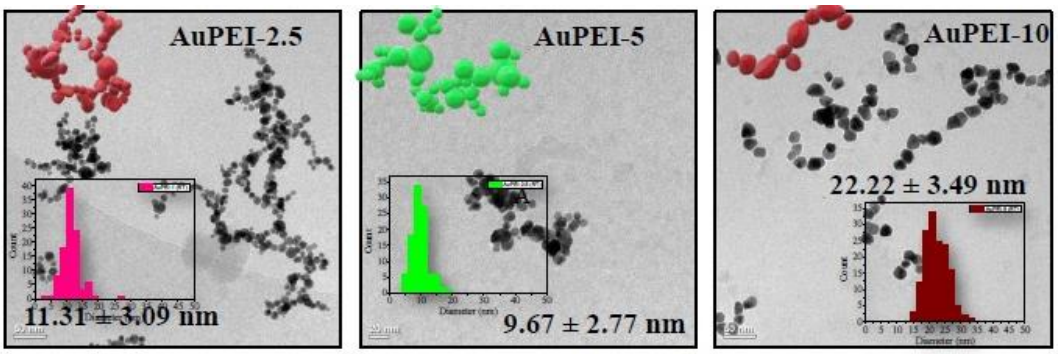


Figure I.31. Agrégats AuNPs/PEI caractérisés en cryomicroscopie électronique en transmission. Issue des travaux de Mulen-Arias et al.[84].

L'association NPs/PELs est souvent liée à la stabilisation de nanoparticules préformées par recouvrement d'une couche polyélectrolyte. La stabilisation des nanoparticules consiste en un recouvrement successif de plusieurs couches de polyélectrolytes conduisant à une stabilisation par répulsion électrostatique[85–87].

Dans l'objectif de stabiliser des nanoparticules par recouvrement avec une chaîne PEL, il est nécessaire de respecter plusieurs conditions. Il faut travailler avec un PEL flexible ($L_0 \approx 1\,nm$), fortement chargé ($b < l_B$) avec une longueur de contour faible ($L_c \leq 2\pi R_{NP}$) permettant à la chaîne de « s'effondrer » sur la nanoparticule.

D'un point de vue théorique l'étude de la conformation de longues chaînes polyélectrolytes en interaction avec des particules de charges opposées a bien été décrite.

On peut tout d'abord parler des travaux de Netz et Joanny[88] qui ont déterminé par une approche perturbative la conformation stable d'une chaîne de PEL semi flexible (de longueur L ($L \gg D$), de diamètre de chaîne D_p, densité de charge τ et de longueur de persistance $L_p = L_0 + L_{OSF}$) en interaction avec une sphère de charge opposée (de rayon D et de charge structurale Z), dans un milieu salin (Figure I.32).

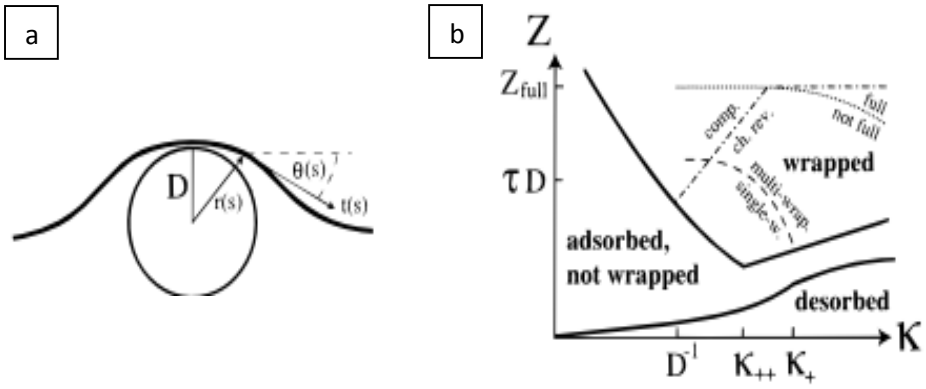


Figure I.32. (a) Représentation d'une chaîne semi-flexible en interaction ponctuelle avec une sphère de charge opposée. La conformation est caractérisée par le vecteur positon $\overrightarrow{r(s)}$, le vecteur tangent $\overrightarrow{t(s)}$ et l'angle $\theta(s)$. (b) Diagramme de phase théorique de la conformation de la chaîne PEL en interaction avec la sphère en fonction de la charge de la sphère et l'inverse de la longueur de Debye. Issue des travaux de Netz et Joanny[88].

On observe sur le diagramme différentes zones délimitées par des valeurs caractéristiques. La charge maximale de la sphère notée Z_{full} correspond à la charge permettant à une mono couche compacte de polymère de s'adsorber tel que : $Z_{full} \sim \tau D^2 / D_p$. L'inverse de la longueur de Debye pour laquelle on observe la transition « not wrapped/wrapped » est notée κ_{++}. Lorsque $\kappa_{++} > \kappa$, la charge critique de transition notée Z_w peut se déterminer par $Z_w \sim \tau D \ln(D\kappa)^{-1}$. Dans le cas où $\kappa_{++} < \kappa$, la charge critique de transition peut se noter $Z_w \sim L_0 \kappa / \tau l_B$. Ce changement correspond au fait qu'au-delà d'une certaine valeur de κ_{++} la composante électrostatique n'est plus dominante sur la flexibilité de la chaîne. La transition « adsorbed/desorbed » est obtenue par comparaison entre l'énergie de cohésion du système et l'énergie thermique $k_B T$. Ce diagramme permet donc, pour un modèle simple, de mettre en évidence le comportement d'une chaîne chargée en interaction avec une sphère de charge opposée en fonction de l'écrantage.

Si l'on vient de discuter d'un modèle chaîne/sphère unique, les travaux portant sur l'interaction de plusieurs particules avec plusieurs chaînes sont moins courants. Nous parlerons ici des travaux de Nguyen et Shklovskii[89] qui ont proposé un modèle théorique sur l'inversion de charge observée lors de la complexation électrostatique entre des sphères chargées et une longue chaîne chargée (de longueur de contour L, densité de charge η et de diamètre a) (Figure I.33).

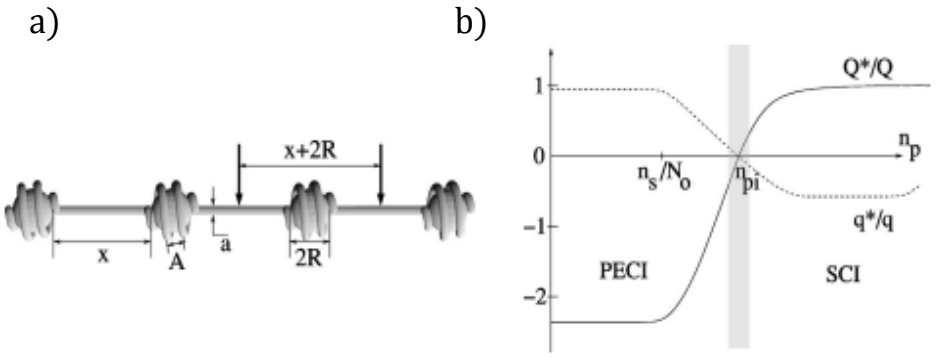


Figure I.33. (a) Représentation schématique du complexe type "collier". (b) Evolution de la charge normalisée du complexe (Q/Q) et d'une particule au sein du complexe (q*/q) en fonction de la concentration en polyélectrolyte. La zone grise représente la zone d'electroneutralité. Issue des travaux de Nguyen et Shklovskii[89].*

Dans ce modèle, les auteurs considèrent les sphères comme pouvant être globalement neutres ou chargées suivant le nombre de tours formés par la chaîne. Si des charges sont encore présentes sur les particules alors celles-ci vont s'organiser de manière régulière le long de la chaîne en raison des répulsions inter-particules. La structure optimale du complexe a été déterminée en minimisant l'énergie libre du système en fonction du nombre d'agrégation (N) et de la distance entre sphères (x). L'inversion de charge prédite par la théorie peut facilement se comprendre à partir de la figure I.33b où Q* correspond à la charge du complexe, Q à la charge de la chaîne, q* à la charge d'une sphère au sein du complexe et q la charge de la sphère. À basse concentration en polymère (n_p) le système est caractérisé par la présence de sphères libres et de complexes chargés positivement. La charge du complexe et des sphères à l'intérieur ne varie pas jusqu'à atteindre une valeur critique $n_p \approx n_s/N_0$ avec n_s la concentration en sphères et N_0 le nombre de sphères impliquées dans le complexe. En effet, avec l'augmentation de n_p donc l'ajout de nouvelles chaînes, toutes les sphères seront engagées dans la formation de complexes comprenant N_0 sphères. La valeur de la charge des sphères dans les complexes commence à diminuer en raison du recouvrement croissant de leur surface par l'apport de chaînes. La valeur de la charge des complexes, elle, va diminuer avec la compensation des charges liées aux sphères. Dans cette même zone, la diminution des répulsions va entraîner une réduction de la distance inter-particules dans l'agrégat (x). À l'électro neutralité n_{pi}, on a compensation totale des charges liées aux sphères et aux chaînes. Dans ce cas, la charge globale des complexes comme les sphères à l'intérieur est nulle Q*=q*=0 et la distance inter-particules est nulle $x = 0$. Enfin, un ajout supplémentaire de chaînes va conduire à une inversion de la charge du système donc un complexe et des sphères à l'intérieur chargés négativement jusqu'à atteindre une valeur constante. Si ces prédictions théoriques sont relativement bonnes, elles n'ont, à ma connaissance que rarement été validées expérimentalement.

D'un point de vue expérimental sur ces dernières décennies, les travaux portant sur l'assemblage PELs/NPs visaient principalement l'ADN afin de comprendre le phénomène de compaction de ces longues chaînes (i.e. $L_c \sim 2\ m$) dans le noyau cellulaire (i.e. $d_{noyau} \sim 6\ \mu m$). On peut par exemple citer les travaux de Yoshikawa et al.[90] qui ont travaillé sur un système avec de l'ADN bactériophage T4 ($L_c \approx 57\ \mu m$ et 6 e/nm) marqué au 4,6 diamidino-2-phénylindole et des particules de silice ($5 \leq R(nm) \leq 50$) rendues cationiques par adsorption de courtes chaînes de poly-L-lysine marquées à la Rhodamine-RedX. Le milieu d'étude est un milieu tampon Tris-HCl (10^{-2} M, pH 7,4). Ils ont montré que la compaction de l'ADN est une succession d'étapes, passant par la formation de structures en « collier » quelle que soit la taille des nanoparticules. Ils ont aussi conclu que l'ADN ne s'adsorbe pas de la même façon sur les nanoparticules en fonction de leur taille. En effet, il n'y aurait qu'une simple adhésion pour les particules de plus petites tailles et une adsorption d'une trentaine de tours pour les particules de plus grandes tailles.

On retrouve la molécule d'ADN dans de nombreux autres assemblages. On peut par exemple citer les travaux de Keren et al.[91] qui ont étudié les différentes phases obtenues en complexant des nanoparticules d'or ($R \approx 8\ nm$) cationiques avec des chaînes d'ADN. La concentration en nanoparticules a été maintenue constante. Les mélanges ont été réalisés dans un tampon acétate à pH 4,8. Les auteurs ont observé, selon différents ratios

n_{AuNPs}/n_{ADN}, trois phases. Une première phase avec un excès d'ADN et la présence de petites structures nanométriques. Une seconde phase, proche de la neutralité de charge, avec une augmentation de la densité optique et la présence de gros agrégats denses. Et une dernière phase en présence d'un excès de nanoparticules avec la présence de structures en « collier » semblables à celles observées lors des étapes de compaction de l'ADN (Figure I.34).

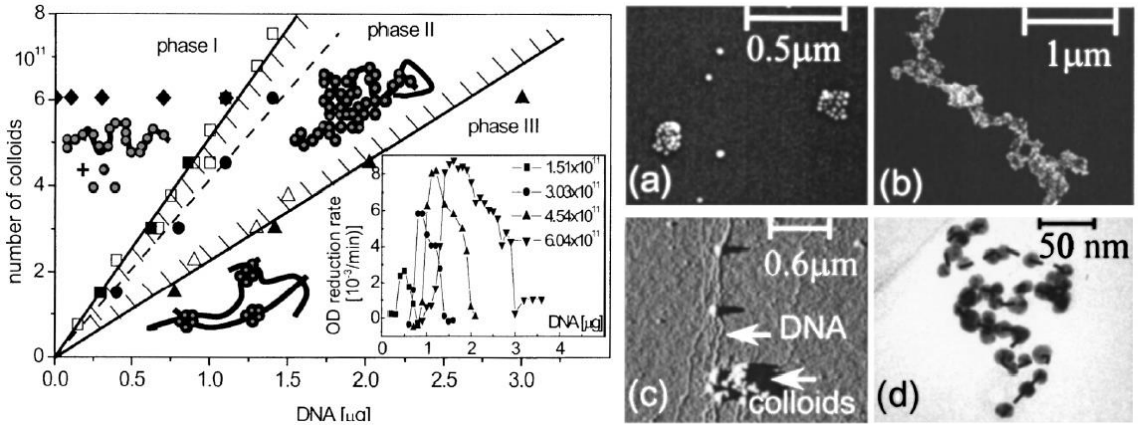


Figure I.34. Diagramme de phase pour des complexes AuNPs/ADN et (a) cliché de microscopie électronique à balayage (MEB) d'un échantillon en phase I, (b) cliché MEB d'un échantillon en phase II, (c) cliché en microscopie à force atomique (AFM) d'un échantillon en phase III et (d) cliché MET d'un échantillon en phase I. Issue des travaux de Keren[91].

On retrouve aussi dans la littérature des assemblages de chaînes d'ADN avec des nanoparticules de zircone[92] conduisant à des structures de tailles variées selon la longueur de contour de la chaîne d'ADN.

On finira par citer les travaux de Shi et al.[93] et Balfourier et al.[94] qui sont les plus proches des systèmes que nous avons étudiés pendant cette thèse. Tout d'abord, Shi et al. ont travaillé sur l'assemblage de nanoparticules de silice par complexation électrostatique avec différentes chaînes de polyélectrolytes aux paramètres intrinsèques variables (Chitosan, Hyaluronane et poly-L-lysine). Ces travaux ont permis de mettre en évidence un diagramme de phase similaire à ce qui peut être obtenu pour les systèmes vus précédemment avec l'ADN (Figure I.35).

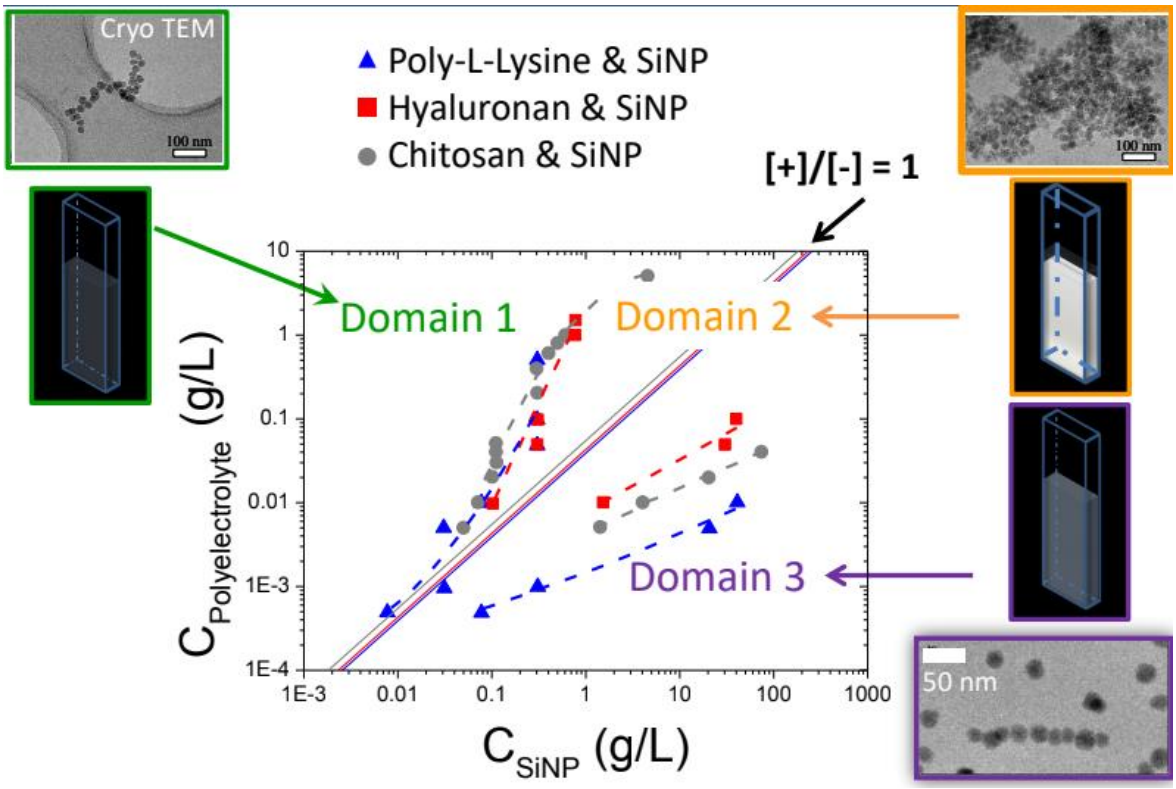


Figure I.35. Diagramme de phase résultant de la complexation électrostatique de nanoparticules de silice chargées avec des polyélectrolytes de charges opposées. Issue des travaux de Shi et al.[93].

Dans la continuité du travail précédent, les travaux de Balfourier et al.[94] ont été réalisés en utilisant des particules d'or recouvertes de citrate à la place des particules de silice anioniques dans le but de former des assemblages plasmoniques présentant des propriétés photothermiques exploitables dans le domaine. Ces travaux ont permis de montrer que les assemblages présentant le meilleur potentiel du point de vue de la photothermie étaient les assemblages les moins stables obtenus au voisinage de la stœchiométrie de charge (Figure I.36).

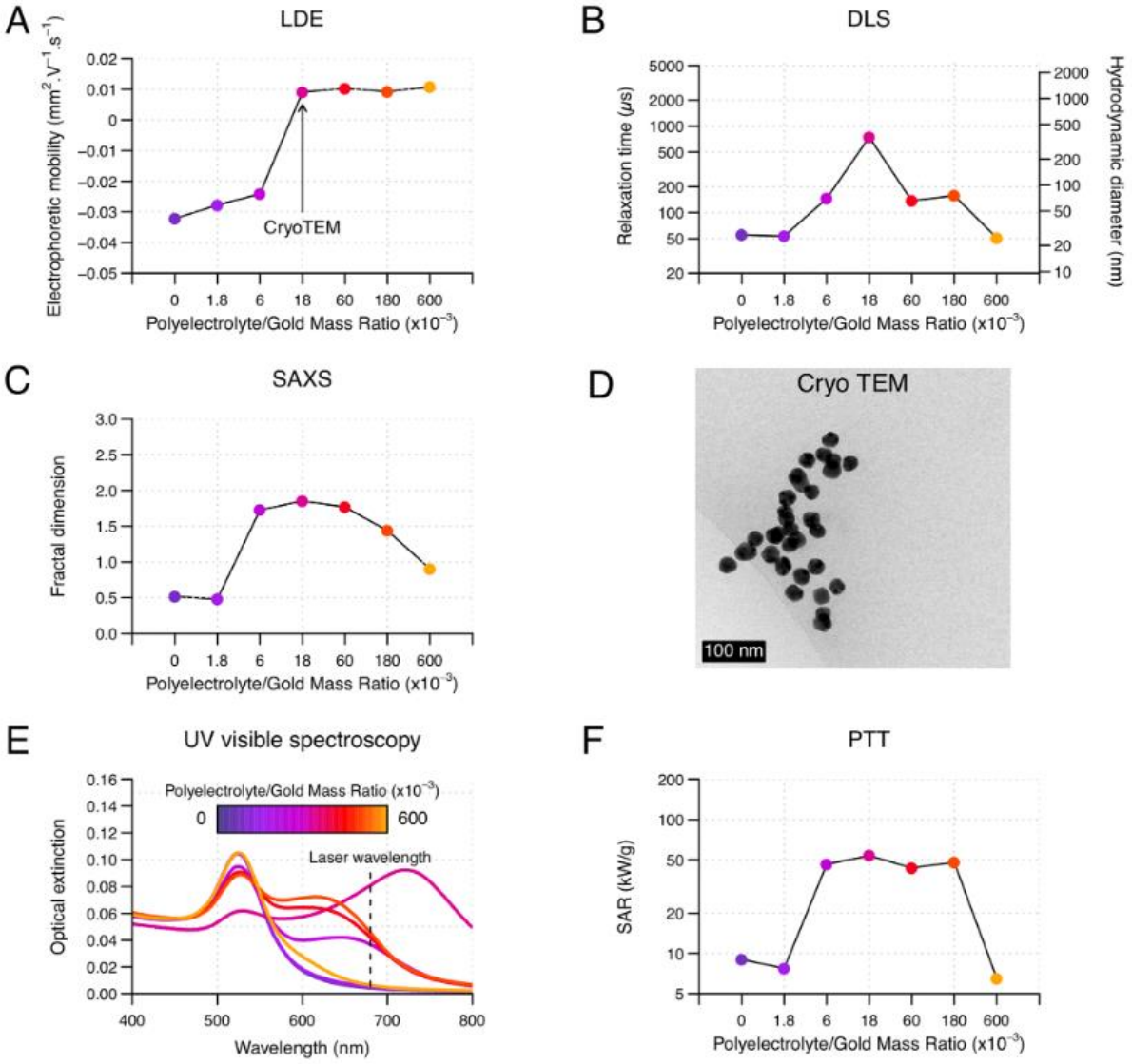


Figure I.36. Caractérisation d'agrégats AuNPs (30 nm)/ Chitosan (300 kDa) en a) mobilité électrophorétique b) diffusion statique de la lumière c) dimension fractale déduite de la diffusion aux petits angles d) cryo-MET e) UV-Vis et f) SAR (specific absorption rate) déduit des expériences de photothermie. Issue des travaux de Balfourier et al.[94].

In fine, il apparait que, bien que la voie d'assemblage par complexation électrostatique avec de longues chaînes PELs ait été peu utilisée dans le domaine des nanosciences, elle présente plusieurs avantages. En effet, elle permet la formation de nombreux complexes de manière rapide par simple mélange directement dans l'eau entre des espèces de charges opposées facilement accessibles. Cependant, cette voie est caractérisée par une certaine variabilité car le choix des espèces en présence et des conditions physicochimiques conditionnent la nature des interactions et la structure finale des assemblages. En outre, il apparait nécessaire de développer des stratégies pour stabiliser les agrégats moins stables à des stades précoces d'agrégation pour bénéficier de leurs propriétés plasmoniques dans la limite des petits nombres d'agrégation. Ce travail sera l'objet des chapitres III et IV.

CHAPITRE II

Méthodes expérimentales

Nous ferons le choix, dans cette partie, de n'expliciter que les méthodes et techniques utilisées de manière récurrente tout au long de la thèse. Les autres méthodes de caractérisation, utilisées en collaboration seront plus succinctement décrites dans les différents chapitres.

I) Synthèse de nanoparticules d'or

Un objectif de la thèse est d'exalter les propriétés collectives de particules d'or largement accessibles par un assemblage contrôlé. Nous avons donc choisi une méthode de synthèse simple à mettre en œuvre, peu couteuse et robuste donnant accès à des particules bien définies en termes de forme, de taille et de chimie de surface.

Ainsi, nous avons choisi d'utiliser le protocole établi par Bastùs et al.[8]. Cette méthode consiste d'abord à synthétiser, directement dans l'eau, des particules de 10 nm par réduction du sel d'or ($HAuCl_4.3H_2O$) avec du citrate de sodium suivant un protocole proposé par Turkevich et al. en 1951[27]. Ces particules sont ensuite utilisées comme germes dont la croissance sera contrôlée par abaissement de la température favorisant une nucléation hétérogène à la surface des germes. Dans cette synthèse, le citrate de sodium joue le rôle d'agent réducteur, d'agent stabilisant les nanoparticules par coordination à leur surface et de médiateur du pH. Ces aspects ont été bien décrits dans la littérature[95,96] ces dernières années.

Dans un ballon bicol de 250 mL, 97 mg de citrate de sodium (Sigma-Aldrich > 99 %) est dissous dans 150 mL d'eau ultrapure. La solution est portée à ébullition à reflux sous agitation en 30 min environ. Directement, après ébullition, 1 mL d'une solution de sel d'or (25 mM) (Sigma-Aldrich > 99,9 %) est ajouté à la solution puis laissé sous agitation pendant 10 min. Après la formation des germes, la température de la solution est abaissée à 90 °C avant d'ajouter une nouvelle fois 1 mL de la solution de sel d'or (25 mM). L'ensemble est laissé sous agitation pendant 30 min. Ce premier prélèvement sera par la suite qualifié de cycle 0. Le cycle suivant débute par l'ajout de 53 mL d'eau ultra pure et 2 mL de citrate de sodium (60 mM). L'ensemble est laissé sous agitation pendant 15 min afin que la température revienne à 90 °C. Une première injection de la solution de sel d'or (1 mL à 25 mM) est réalisée, suivie d'une seconde injection 30 min plus tard comme décrit précédemment. Les cycles sont ainsi répétés comme montré sur la figure II.1. Durant cette thèse, de nombreuses synthèses de nanoparticules ont été réalisées. La figure II.2 et II.3, ci-dessous, montrent les résultats et caractérisations obtenus pour une synthèse de nanoparticules d'or dont la concentration théorique varie entre $1{,}91 * 10^{12}\ NPs/mL$ et $1{,}95 * 10^{11}\ NPs/mL$.

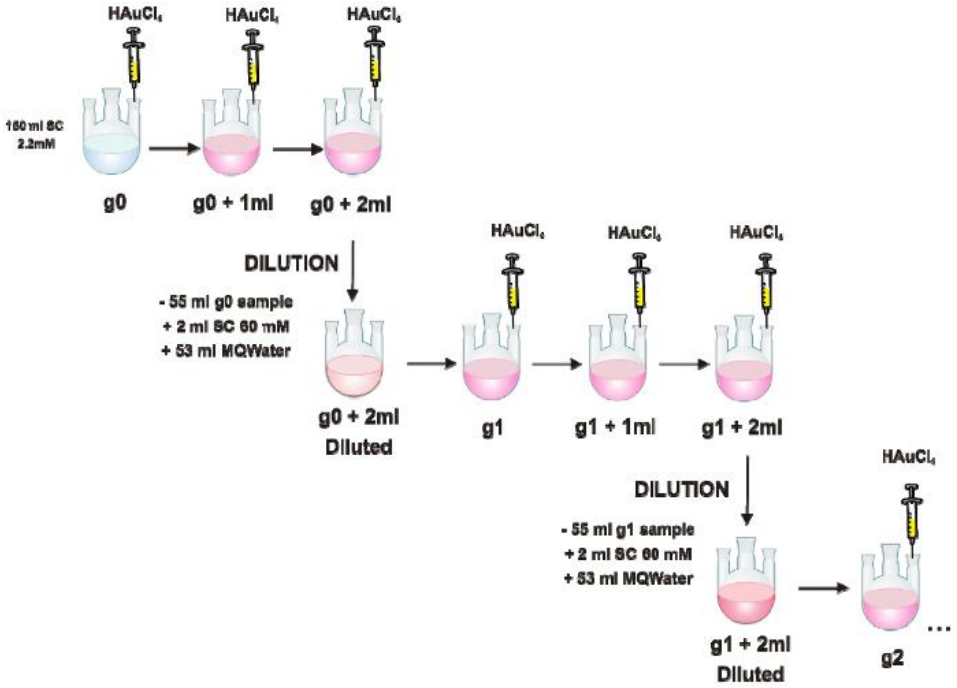


Figure II.1. Schéma du protocole de synthèse de nanoparticules d'or issu des travaux de Bastùs et al.[8].

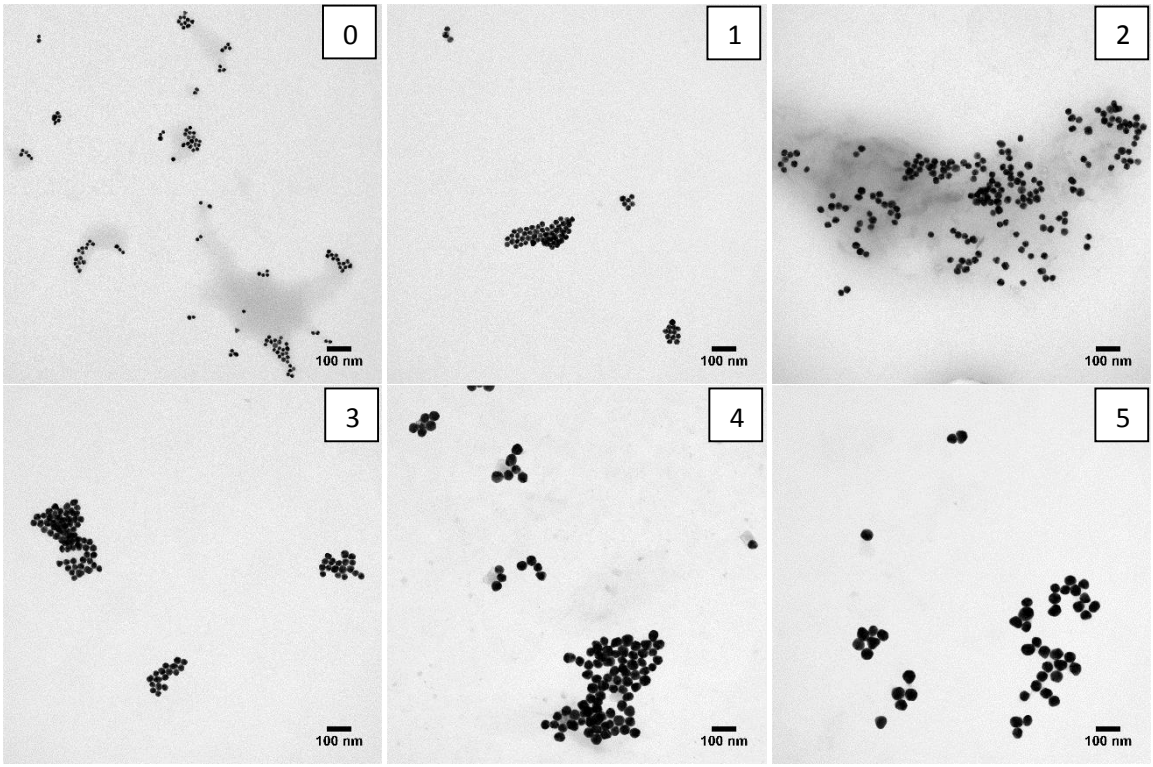


Figure II.2. Clichés MET de nanoparticules d'or au cycle 0 jusqu'au cycle 5 de croissance.

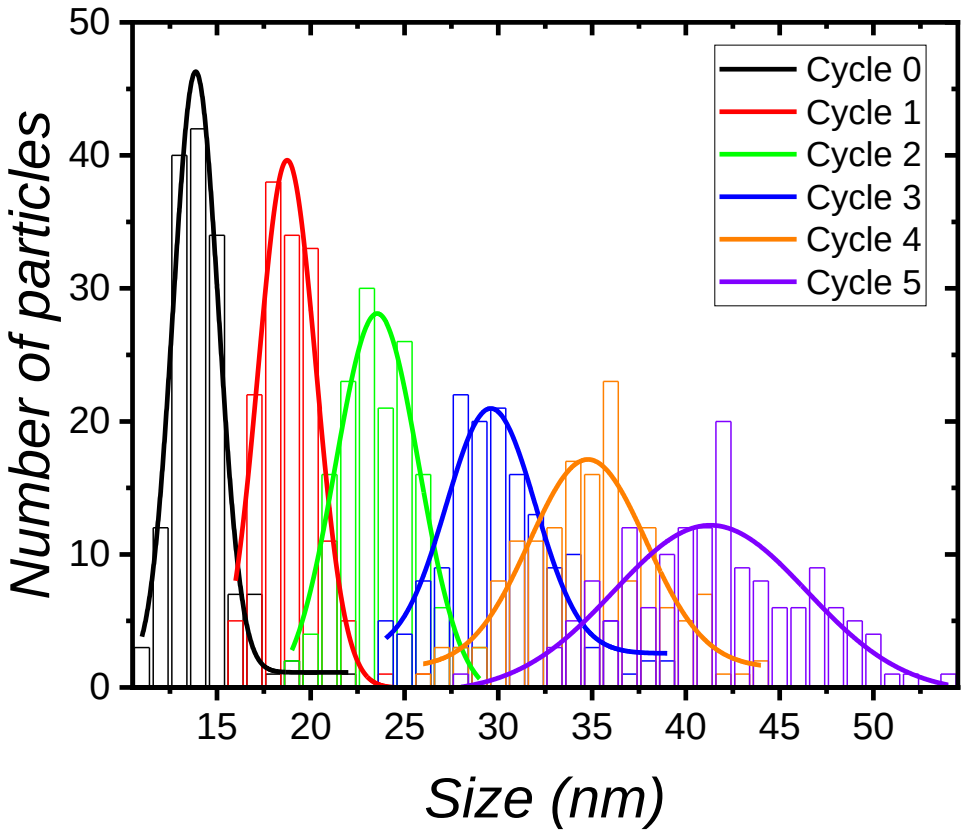


Figure II.3. Distribution en nombre du diamètre mesuré en MET des nanoparticules obtenues pour les cycles 0 à 5.

II) Diffusion du rayonnement

a) Diffusion statique et diffraction des rayons X aux petits angles

i) Notion de vecteur d'onde

La diffusion statique du rayonnement désigne un ensemble de techniques permettant de sonder la matière à un instant donné afin de caractériser sa structure globale et locale. Ici, le terme de structure se rapporte à la distribution spatiale de la matière. L'expérience concernant la diffusion statique consiste à analyser le rayonnement diffusé dans l'espace après interaction d'un faisceau monochromatique avec un échantillon. L'échelle à laquelle l'échantillon sera sondé provient principalement du type de rayonnement utilisé lors de l'expérience. En effet, il est possible de sonder des objets de taille micrométrique avec des longueurs d'onde proches de la lumière visible ou alors des objets de l'ordre de l'Angström en utilisant les rayons X.

Comme cité précédemment, le mode d'interaction rayonnement/matière dépend de la nature du rayonnement utilisé. Dans une expérience de diffusion, un faisceau incident de vecteur d'onde $\overrightarrow{k_i}$ traverse l'échantillon. Ce rayonnement va rencontrer sur son chemin des

éléments diffuseurs desquels va résulter un nouveau vecteur d'onde de diffusion $\overrightarrow{k_d}$ avec un angle θ (Figure II.4).

Les modules des vecteurs d'onde sont égaux dans l'hypothèse d'une diffusion élastique tel que :

$|\vec{k}| = \frac{2\pi n}{\lambda}$ avec λ la longueur d'onde et n l'indice de réfraction du milieu

$$|\overrightarrow{k_i}| = |\overrightarrow{k_d}|$$

De cette diffusion peut être déduit le vecteur d'onde de transfert $\vec{q}$ qui est simplement la différence induite entre le vecteur d'onde diffusé et incident :

$$\vec{q} = \overrightarrow{k_i} - \overrightarrow{k_d}$$

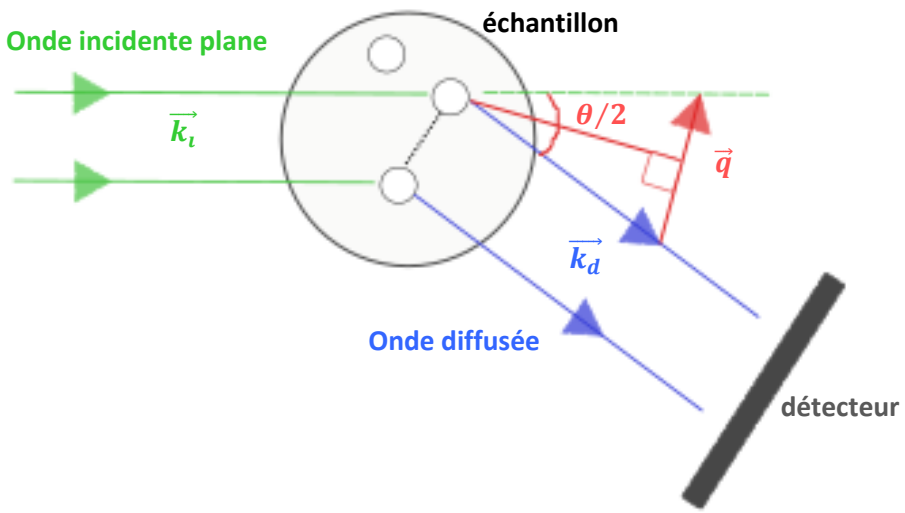


Figure II.4. Diffusion du rayonnement par un ensemble d'éléments diffuseurs.

L'égalité des vecteurs d'onde et une relation simple de trigonométrie permettent d'exprimer le module du vecteur d'onde de transfert par la relation suivante :

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda}\sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

L'inverse du module du vecteur d'onde de transfert (q^{-1}) a la dimension d'une longueur représentant l'échelle spatiale d'observation dans l'espace direct. Il est possible de sonder la matière sur une large échelle spatiale en fonction de la technique de diffusion utilisée (Tableau II.1 et Figure II.5).

Technique de diffusion	Longueur d'onde (Å)	Domaine sondé (Å)
Diffusion de la lumière	4000 < λ < 7000	300 < q^{-1} < 20000
Diffusion des rayons X	0,2 < λ < 2	2 < q^{-1} < 5000
Diffusion des neutrons	0,2 < λ < 2	2 < q^{-1} < 5000

Tableau II.1. Tableau récapitulatif des différentes techniques de diffusion et des échelles spatiales sondées.

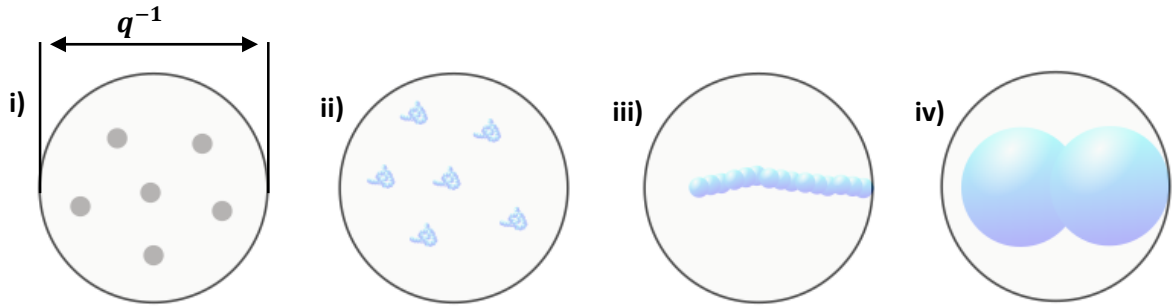


Figure II.5. Domaines d'observations en fonction du vecteur q.

La figure II.5, ci-dessus, représente l'échelle spatiale de diamètre (q^{-1}) sondée pour une solution diluée de polymère.

- (i) : aux faibles valeurs de vecteur q, les éléments diffuseurs sont détectés comme des objets ponctuels. On peut détecter le régime de Guinier
- (ii) : si le vecteur augmente d'un facteur 10, les objets sont sondés de manière plus précise et permettent de déterminer le rayon de giration par exemple.
- (iii) : pour une valeur de q encore plus élevée, il est possible de commencer à sonder la chaîne dans son ensemble.
- (iv) : aux hautes valeurs de q, il est possible d'observer la structure de la nanoparticule seule par exemple.

ii) Le facteur de structure $S(q)$ et le facteur de forme $P(q)$

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) est une méthode de diffusion statique. Il convient de rappeler certaines notions telles que le facteur de forme $P(q)$, le facteur de structure $S(q)$ et le régime de Guinier, le vecteur d'onde, …

Dans le cas d'une solution de macromolécules, l'intensité peut être exprimée en fonction du facteur de forme et du facteur de structure de la solution. Dans le cas de particules sphériques, il est possible d'écrire :

$$I(q) = A_0^2 f^2 \langle \sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1}^{N} e^{i\vec{q}\vec{r_{ij}}(t)} \sum_{k=1}^{n} \sum_{l=1}^{n} e^{i\vec{q}\vec{r_{kl}}(t)} \rangle_T = A_0^2 f^2 N P(q) S(q)$$

$\langle \ \rangle_T$ représente une moyenne temporelle sur la durée de l'expérience T, A_0^2 une constante, $P(q)$ le facteur de forme de l'objet, $S(q)$ le facteur de structure de la solution, N

le nombre d'objets (i, j) présents dans la solution et n le nombre de diffuseurs élémentaires identiques (k, l) constituant un objet, c'est-à-dire le nombre de monomères (Figure II.6).

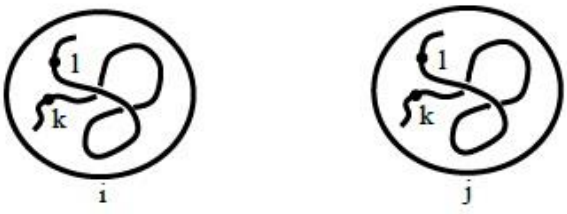


Figure II.6. Représentation des macromolécules (i, j) avec les diffuseurs élémentaires (monomères) (k, l). Figure issue de la thèse de Shi[97].

Cette diffusion correspond à la diffusion élastique par un milieu constitué de $N * n$ diffuseurs et peut être reliée aux corrélations entre paires par l'intermédiaire des vecteurs $\overrightarrow{r_{ij}}(t) = \vec{r_i}(t) - \vec{r_j}(t)$ et $\overrightarrow{r_{kl}}(t) = \vec{r_k}(t) - \vec{r_l}(t)$. Pour des particules en solution, ces vecteurs sont fonctions du temps, les particules étant soumises au mouvement brownien. C'est pour cette raison que l'intensité diffusée mesurée est moyennée sur un temps très grand T par rapport aux temps caractéristiques du système. La moyenne temporelle est alors égale à la moyenne spatiale.

Le facteur de structure caractérise l'état de dispersion des objets dans le milieu. Il est fonction des forces d'attractions, de répulsions, des interactions, etc … Il est, par définition, égal à 1 aux grands q puisque l'on sonde l'objet individuel.

Le facteur de structure normé de la solution $S(q)$ s'écrit pour $i \neq j$:

$$S(q) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1}^{N} e^{i\vec{q}\overrightarrow{r_{ij}}(t)}$$

Il mesure les corrélations spatiales entre N macromolécules (i, j) et donne ainsi des informations sur la structure en solution.

Lorsque $i = j$, le facteur de forme $P(q)$ peut s'écrire de la manière suivante :

$$P(q) = \sum_{k=1}^{n} \sum_{l=1}^{n} e^{i\vec{q}\overrightarrow{r_{kl}}(t)}$$

Il existe différents facteurs de forme selon le type d'objet considérés. Il sera forcément différent selon si l'objet est un bâtonnet, un triangle, une sphère. Par exemple, pour les nanoparticules sphériques monodisperses de rayon R, le facteur de forme s'écrit :

$$P(q) = \left[\frac{3}{(qR)^3} * (\sin(qR) - qR\cos(qR))\right]^2$$

iii) Le régime de Guinier et la dimension fractale

La grandeur caractéristique des objets est leur taille. Cette dernière peut être obtenue par interprétation du régime de Guinier défini par $qR_g \ll 1$ où le facteur de forme s'écrit :

$$P(q) = 1 - \frac{q^2}{3}\left(R_g\right)^2 \text{ avec } R_g \text{ le rayon de Guinier}$$

Dans le cadre de nos expériences, de manière plus concrète, le régime de Guinier se traduit par une rupture de pente aux petites valeurs de q conduisant un plateau. Cette valeur permet de remonter à la taille globale des agrégats dans le système, en considérant que ces derniers ont une taille comprise dans la plage sondée.

Si l'on considère un agrégat de nanoparticules, de masse M et de taille D, alors il est possible d'écrire la relation suivante :

$$M \sim D^{d_f}$$

Où d_f est la dimension fractale. Cette dimension fractale est considérée comme une dimension fractale massique. Un agrégat fractal massique peut être vu comme une large structure branchée de manière aléatoire dont la majorité de la masse M de cet objet est comprise dans une sphère de rayon D. En régime intermédiaire, l'intensité diffusée décroît en loi de puissance :

$$I \sim q^{-d_f}$$

Cette loi de puissance est proportionnelle à la dimension fractale de l'objet. Un agrégat linéaire unidimensionnel sera caractérisé par une dimension fractale proche de 1. À l'opposé, un agrégat compact et dense sera caractérisé par une dimension fractale proche de 3. Un agrégat ouvert branché de manière aléatoire sera, quant à lui, caractérisé par une dimension fractale proche de 2.

La figure II.7, ci-dessous, résume parfaitement les différents cas que l'on a rencontré pendant cette thèse.

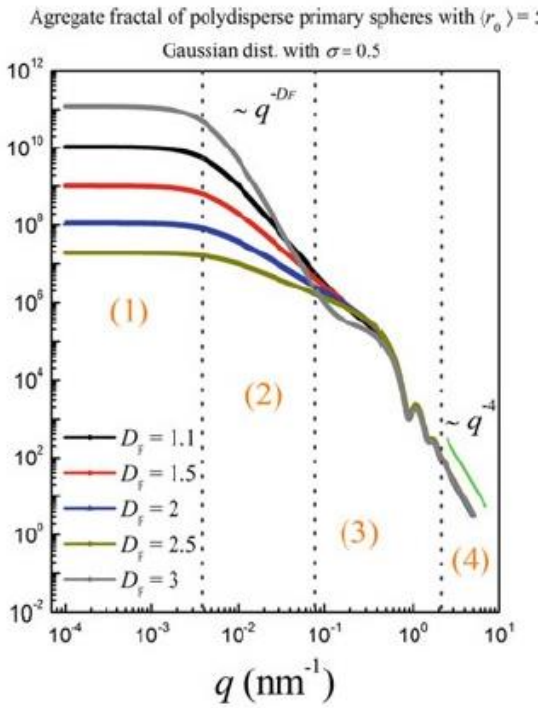


Figure II.7. Simulation de courbes SAXS pour des agrégats de sphères polydisperses (r =5 nm) avec une dimension fractale comprise entre 1,1 et 3. Issue de Londono et al.[98].

Ce graphique est composé de 4 régions :

- La région (1), aux petites valeurs de q, correspond au régime de Guinier. Dans cette région il est possible de déterminer la taille de l'agrégat aussi bien que son rayon de giration.
- La région (2) correspond au régime intermédiaire. Dans cette zone, l'intensité décroît selon une loi de puissance $I \sim q^{-d_f}$ dont l'exposant est proportionnel à la dimension fractale massique de l'agrégat.
- La région (3), aux grandes valeurs de q, est corrélée à la distribution en taille des particules primaires. Il est possible de déterminer le degré de polydispersité des particules.
- La région (4), aux « très grandes » valeurs de q, est associée au régime de Porod des particules primaires. Ce dernier ne sera pas explicité dans cette partie.

iv) L'interaction matière/rayons X

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) est une technique centrale de ces travaux de thèse. En effet, elle est particulièrement appropriée pour sonder la structure des échantillons à l'échelle d'un agrégat. Elle est sensible à la différence de densité électronique des échantillons, ce qui la rend particulièrement efficace pour l'observation de structures métalliques.

Les rayons X utilisés dans le cadre de ces expériences ont des longueurs d'ondes comprises dans une gamme étroite de 0,5 à 2,5 Å. L'énergie issue des photons du synchrotron est relativement élevée et les rayons X possèdent une énergie de l'ordre du keV.

L'interaction avec la matière est directement reliée à la structure électronique de la matière et peut avoir lieu même dans le cas où le photon n'entre pas en collision directe avec l'échantillon. Lorsque l'électron est lié, la présence d'une force de rappel induit une oscillation de l'atome à une fréquence qui correspond à un maximum de couplage photon-électron. Il est donc nécessaire de se situer en dehors de ces seuils d'absorption. Dans le cadre de cette thèse, l'or présente un seuil d'absorption à 11,9 keV.

v) Le principe de mesure

La mesure consiste à envoyer sur l'échantillon un faisceau de photons monochromatiques collimatés à l'aide d'un dispositif optique constitué d'un monochromateur et de plusieurs miroirs focalisant. Les photons diffusés par l'échantillon sont ensuite récoltés par un détecteur en fonction de l'angle de diffusion. L'intensité récoltée donne un motif de diffusion qui après traitement permet de remonter à la taille des nanoparticules, mais aussi à la masse qui l'entoure et donc la structure de l'agrégat et sa dimension fractale (Figure II.8).

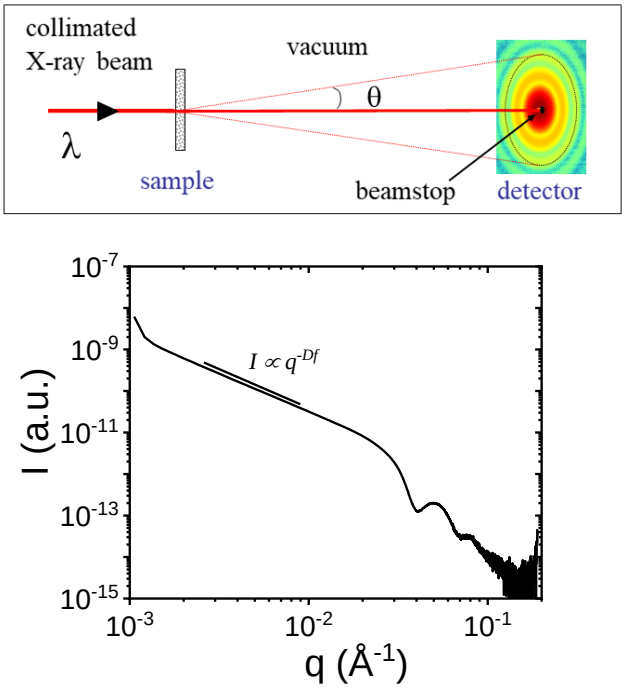


Figure II.8. Schéma simplifié de caractérisation par diffusion des rayons X aux petits angles et courbe d'un échantillon après traitement des données.

Dans le cas général, un faisceau de rayons X, de flux initial ϕ_0, irradie un échantillon placé à une distance d du détecteur. La section efficace de diffusion différentielle s'écrit :

$$\frac{d\sigma}{d\omega}(\theta) = r_e^2 \frac{1 + cos^2(2\theta)}{2}$$

Avec $r_e^2 = e^2/mc^2$, m la masse de la particule, e sa charge, c la célérité, 2θ l'angle de diffusion et r_e le rayon de l'électron. Cette équation est tout aussi valable pour des électrons que pour des noyaux. Comme la section efficace varie en m^{-2}, il est possible de négliger la diffusion des noyaux, leur masse étant nettement supérieur à celle des électrons. Par conséquent, dans une expérience de rayons X, seuls les électrons diffusent. La longueur de diffusion d'un électron s'écrit :

$$b_e = r_e \left[p(\theta)^{1/2}\right]$$

Avec $p(\theta)$ le facteur de polarisation. La section efficace de diffusion de n atomes s'écrit sous la forme :

$$\frac{d\sigma}{d\omega}(q) = A_0^2 b_e^2 f(q)^2 \sum_n^{i,j} \langle e^{i\vec{q}\vec{r_j}} e^{-i\vec{q}\vec{r_i}} \rangle$$

Avec $f(q)$ le facteur de diffusion atomique est A_0 l'amplitude du faisceau incident.
L'expression peut se mettre sous la forme :

$$\frac{d\sigma}{d\omega}(q) = K^2 f(q)^2 S_{aa}(q)$$

vi) Le contraste

Le contraste de cette méthode est proportionnel à la densité électronique du système. L'amplitude varie donc de manière croissante avec le numéro atomique Z. La densité de longueur d'onde de diffusion d'un atome se note :

$$b = Zr_e$$

Il est donc possible d'obtenir le contraste noté :

$$\Delta\rho = \left(\frac{\sum_j Z_j}{V_1} - \frac{\sum_k Z_k}{V_1}\right) r_e$$

Dans notre cas, il y aura donc un contraste important apporté par les nanoparticules d'or qui permettront une bonne observation de la structure. Cependant, dans le cadre des polymères, cette technique ne sera pas adaptée pour l'observation de leur structure en solution. Il sera préférable de passer par la diffusion des neutrons aux petits angles (SANS).

Nous listons, ici, les longueurs de diffusion RX des composants utilisés lors des expériences (Tableau II.2).

Composant	Formule	Densité SAXS ($*10^{10}\ cm^{-2}$)
Eau	H_2O	9,5
Nanoparticule d'or	Au	130
Acide hyaluronique	$C_{14}H_{21}NO_{11}$	15,1
Chitosan	$C_6H_{11}NO_4$	18,8
Chlorure d'aluminium	$AlCl_3$	20,6
Mercaptoéthanol	C_2H_6OS	10,1

Tableau II.2. Longueurs de diffusion RX pour les différents composés étudiés dans ce notre travail.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, les mesures ont été réalisées au synchrotron SOLEIL sur la ligne SWING en utilisant une configuration avec des photons à 12 keV, une gamme de vecteurs d'onde compris entre 0,0016 et 0,23 Å^{-1} et une longueur d'onde $\lambda = 1{,}033$ Å. Les échantillons sont préparés en remplissant des capillaires de 1,5 mm de diamètre à l'aide de seringues.

b) Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique permet d'étudier la dynamique de nanoparticules en suspension. En suspension, les nanoparticules sont soumises au mouvement brownien. Ainsi, leur position varie dans le temps. Ceci engendre une variation temporelle du facteur de structure de la suspension colloïdale et un déplacement de fréquence $\Delta\omega$ par rapport à la pulsation initiale ω_i. Le rapport $\Delta\omega/\omega_i$ étant très faible de l'ordre de 10^{-12}s, on parle de diffusion quasi-élastique. La variation temporelle du facteur de structure se traduit par une variation temporelle de l'intensité diffusée à un angle donné. Comme nous le verrons ci-après, ce sont ces fluctuations qui sont exploitées en diffusion dynamique de la lumière pour déterminer des tailles hydrodynamiques.

Pour une suspension de particules, l'intensité diffusée au cours du temps est la somme de l'intensité diffusée par les particules et par le solvant (Figure II.9).

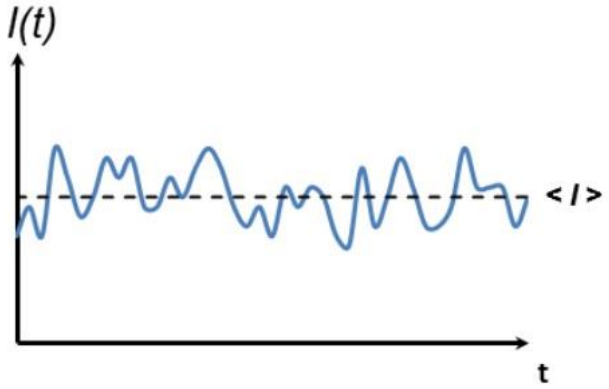


Figure II.9. Fluctuation de l'intensité I en fonction du temps autour de saleur moyenne <I>.Figure issue de la thèse de Danglade[99].

Le signal brut analysé en diffusion dynamique de la lumière est la fluctuation temporelle de l'intensité diffusée à un angle $\theta = 173°$. Comme montrée dans la figure II.9, cette fluctuation varie apparemment de façon hiératique autour d'une valeur moyenne notée $\langle I \rangle$ où $\langle \quad \rangle$ désigne une moyenne temporelle. Si l'expérience est suffisamment longue pour que les particules explorent toutes les configurations possibles du système, on est dans la situation d'ergodicité et la moyenne temporelle est équivalente à une moyenne d'ensemble.

La première étape du traitement de signal consiste à construire la fonction d'auto corrélation des fluctuations temporelles d'intensité $G^{(2)}(t) = \langle I(0)I(t) \rangle$. Cette fonction est construite grâce au corrélateur et elle permet de détecter d'éventuelles corrélations dans le temps. En général, pour un temps suffisamment court, l'intensité est similaire à celle obtenue à un instant initial choisi arbitrairement tel que $G^{(2)}(0) = \langle I(0)I(0) \rangle = \langle I^2 \rangle$. Pour des temps longs, alors il n'y a plus corrélation et dans ce cas $G^{(2)}(\infty) = \langle I(0)I(\infty) \rangle = \langle I \rangle^2$. Ces deux cas donnent donc une fonction $G^{(2)}(t)$ décroissante en fonction du temps (Figure II.10).

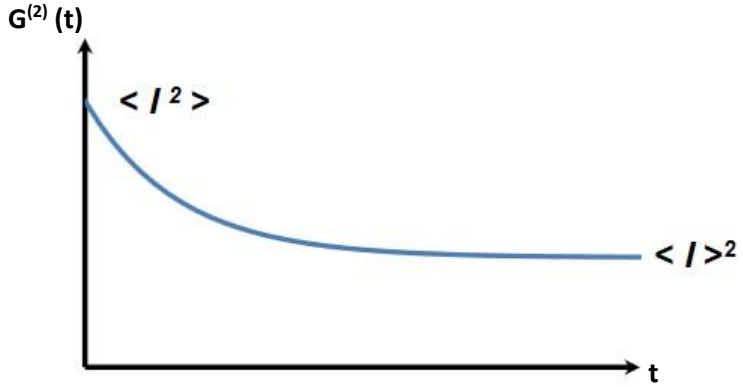


Figure II.10. Fonction d'auto corrélation $G^{(2)}(t)$ en fonction du temps. Figure issue de la thèse de Danglade[99].

Dans une expérience de diffusion dynamique de la lumière, c'est l'intensité de la lumière diffusée par la solution qui est directement mesurée. De cette mesure résulte une fonction d'auto corrélation, normée par l'intensité diffusée, qui se note $g^{(2)}(t)$:

$$g^{(2)}(t) = \frac{\langle I(0)I(t) \rangle}{\langle I \rangle^2}$$

Dans le cas où le champ électrique obéit à une distribution gaussienne, il est possible de trouver un lien entre la fonction d'auto corrélation de l'intensité diffusée $g^{(2)}(t)$ et la fonction d'auto corrélation du champ électrique diffusé $g^{(1)}(t)$ en utilisant la loi de Siegert[100] :

$$g^{(2)}(t) = 1 + \beta \left| g^{(1)}(t) \right|^2 \text{ avec } \beta \approx 1$$

$$g^{(1)}(t) = \frac{\langle E(0)E(t) \rangle}{\langle E^2 \rangle}$$

À l'étape suivante, la fonction $g^{(1)}$ est analysée pour déterminer les temps caractéristiques caractérisant les éventuels processus de corrélation. Cette analyse peut se faire suivant deux méthodes qui ont toutes deux leurs limites :

- Méthode « Contin »

Cette méthode consiste à essayer de faire une transformé de Laplace inverse de la fonction $g^{(1)}$ à l'aide d'un algorithme développé par S.W. Provencher et al.[101,102]. La transformée de Laplace s'écrit sous la forme suivante :

$$g^{(1)}(t) = \int_0^\infty G(\Gamma) exp - [\Gamma t] d\Gamma$$

Avec $\Gamma = {}^{1}/_{\tau}$ la fonction de décroissance et τ un temps caractéristique

Pour une distribution polydisperse idéale correspondant à des pics différenciés symétriques sans épaulement, cette méthode est bien appropriée pour ce type de cas.

Pour une solution polydisperse non-idéale, le pic obtenu sera large et rendra l'interprétation plus complexe.

- Méthode des cumulants

L'autre méthode utilisée, pour la présence d'un seul temps caractéristique, consiste à traiter l'écart à une mono-exponentielle en terme de cumulants[103]. Le logarithme de la fonction d'autocorrélation est développé en puissance de t :

$$\ln g^{(1)}(t)_{t\to 0} \approx k_0 - k_1 t + k_2 \frac{t^2}{2} + \cdots$$

Avec k_n les termes appelés cumulants

Pour une solution idéalement monodisperse, le développement s'arrête au seul terme linéaire avec $k_1 = \Gamma$.

Pour une solution polydisperse, le premier cumulant $k_1 = \Gamma$ donne la valeur moyenne, le deuxième cumulant $k_2 = \langle \Gamma^2 \rangle$ donne l'écart-type de la distribution et le rapport k_2/k_1^2 donne le degré de polydispersité (PDI) et la variance (σ) au carré tel que $k_2/k_1^2 = PDI = \sigma^2$.

Dans le cadre de cette thèse, les différents cas rencontrés (i.e. suspensions de particules seules ou d'agrégats) étaient traduits par une monoexponentielle étirée avec un $PDI \leq 0{,}5$. Une illustration typique de ce type d'exponentielle est représentée ci-dessous pour une solution de nanoparticules d'or (Figure II.11).

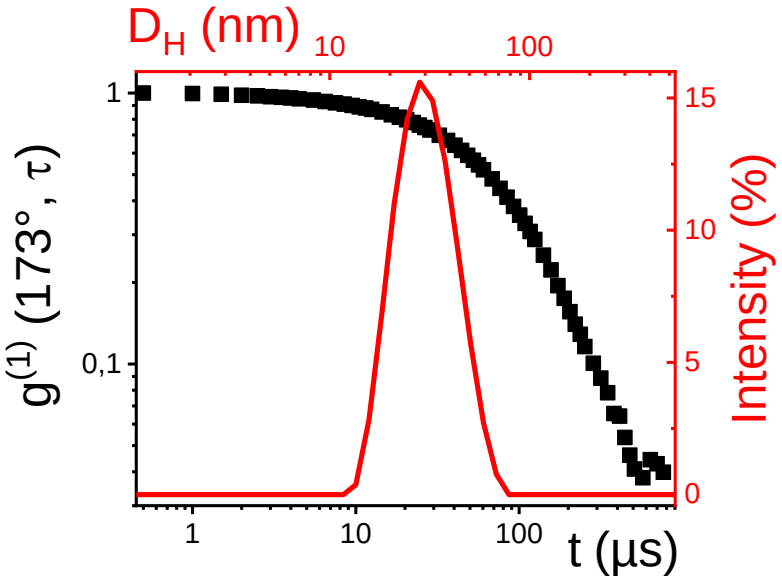


Figure II.11. Fonction d'auto corrélation (noire) et distribution en taille (rouge) pour une solution monodisperse nanoparticules d'or (cycle 3).

Pour une distribution monodisperse idéale de diffuseurs dont la statistique des déplacements est gaussienne, la fonction d'auto corrélation prend la forme d'une exponentielle avec un temps caractéristique τ, traduit par la relation suivante :

$$g^{(1)}(t) = \exp(-\Gamma t) \text{ avec } \Gamma = Dq^2$$

Si les particules se déplacent de manière brownienne alors le déplacement quadratique moyen peut être relié au coefficient de diffusion D par la relation d'Einstein[104] :

$$\langle \Delta r^2 \rangle = q^{-2} = 6D\Gamma^{-1}$$

Enfin, l'équation de Stockes-Einstein[105] permet de remonter au rayon hydrodynamique des objets en fonction de la viscosité dynamique de la solution et du coefficient de diffusion. Dans le cas d'objets sphériques l'équation prend la forme suivante :

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

Avec k la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité de la solution et D le coefficient de diffusion

La taille hydrodynamique obtenue pour une suspension de colloïdes non sphériques, comme les agrégats, est la taille équivalente d'un objet sphérique ayant le même coefficient de diffusion que les agrégats. Le rayon hydrodynamique prend en compte la particule et les entités (i.e. molécules, ions) se déplaçant avec elle (Figure II.12).

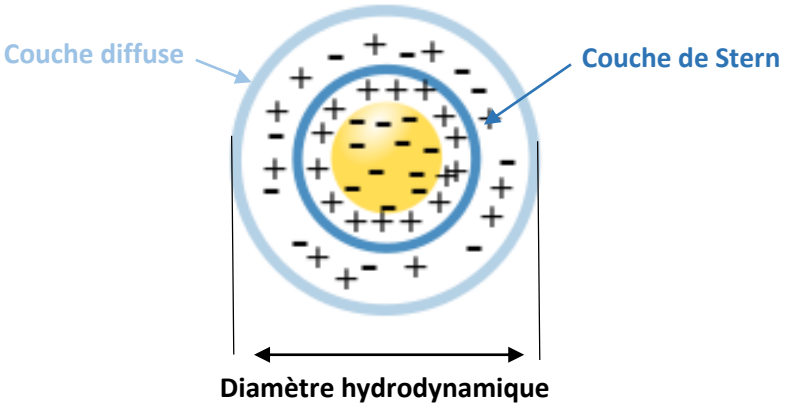


Figure II.12. Représentation schématique d'une mesure hydrodynamique d'une particule.

Dans le cadre de cette thèse, les mesures de diffusion dynamique la lumière ont été réalisées avec un appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) opérant à 632,8 nm. La fluctuation d'intensité est mesurée à un angle θ fixe de 173°.

c) Vélocimétrie laser

Nous avons utilisé la vélocimétrie par décalage Doppler pour mesurer la mobilité électrophorétique (μ). Cette méthode est basée sur le décalage de la fréquence de la lumière diffusée par l'ensemble des particules en mouvement. Le mouvement des particules est entrainé par l'action d'un champ électrique extérieur alternatif $\vec{E}$. D'après la relation de Doppler, le décalage de fréquence entre le faisceau incident et le faisceau diffusé est proportionnel à la vitesse des particules. La figure II.13, ci-dessous, est un exemple de résultats pour une expérience de vélocimétrie laser pour le cycle 3.

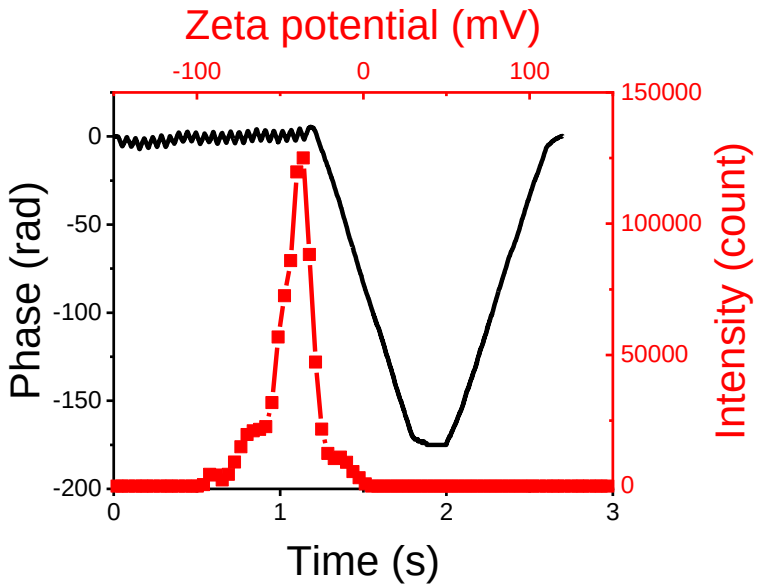


Figure II.13. Courbes de variation de la phase (noir) pour une solution de nanoparticules d'un cycle 3, avec la valeur de zêta correspondante (rouge).

Le potentiel Zeta ζ n'est pas directement mesurable, mais est lié à la vitesse des nanoparticules que l'on appelle mobilité électrophorétique et qui peut être notée :

$$\mu = \frac{2}{3}\frac{\zeta \varepsilon_{el}}{\eta} f(\kappa r)$$

Avec ε_{el} la constance diélectrique, η la viscosité de la solution, r le rayon de la particule, κ l'inverse de la longueur de Debye et $f(\kappa r)$ la fonction d'Henry

Plusieurs modèles traitent du lien entre le potentiel zêta et les grandeurs mesurées comme la mobilité électrophorétique (Henry[106], Hückel[107], Smoluchowski[108]).

Le potentiel zeta permet d'avoir une bonne vision sur la stabilité de la solution colloïdale, cette dernière étant soumise à des forces d'interactions contrées par des forces de répulsions stériques ou électriques.

Dans le cadre de cette thèse, les mesures de mobilité électrophorétique sont réalisées sur un appareil zetasizer nano ZS (Malvern Instrument) opérant avec un champ de 25 $V.cm^{-1}$ oscillant successivement à 20 Hz et 0,7 Hz pour réduire l'effet electro-osmose.

III) Méthodes de microscopie

a) Microscopie électronique en transmission

L'image par microscopie électronique en transmission (MET) fait appel à un système avec des électrons émis par un canon à électrons. Ces électrons vont être accélérés puis focalisés à l'aide de lentilles électromagnétiques sur l'échantillon. Enfin un nouveau système de lentilles va permettre de visualiser l'image sur un écran phosphorescent ou à l'aide d'une caméra CCD (Figure II.14).

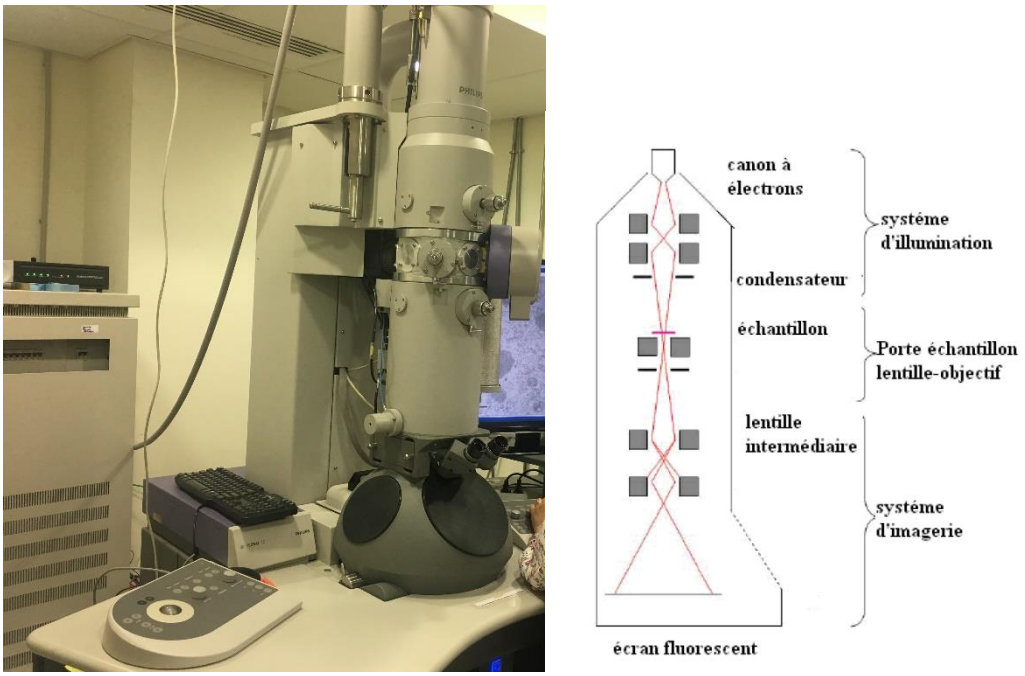


Figure II.14. Photo du microscope électronique Tecnai 12 utilisé pendant la thèse (gauche) et schéma simplifié du principe de microscopie électronique en transmission (droite).

Dans le cas de la microscopie électronique, ce sont les électrons transmis sans interactions qui participent majoritairement à la formation de l'image. Les secteurs les plus foncés de l'image sont présents lorsque peu d'électrons sont transmis, à l'inverse plus la zone est claire plus le nombre d'électrons transmis est important. Ce contraste est directement lié à trois choses : à l'épaisseur de l'échantillon, à sa cristallinité et au numéro atomique des atomes. En effet, si l'on considère, par exemple, des nanoparticules cœur écorce Au@SiO_2, le cœur d'or apparaîtra plus foncé que l'écorce de silice qui elle-même sera plus foncée que le fond de la grille en carbone.

Dans le cadre de cette thèse, les images de microscopie électronique en transmission ont été réalisées sur un microscope Tecnai 12 opérant à 80 keV (Imagoseine, Institut Jacques Monod, Paris) avec comme source d'électrons un cristal d'hexaborure de lanthane (LaB6). Les échantillons sont réalisés par déposition d'une goutte (3 µL) de solution sur une grille en carbone préalablement rendue hydrophile par traitement avec un plasma cleaner.

Une autre technique d'imagerie et caractérisation centrale de cette thèse, a été l'imagerie par microscopie électronique en transmission sous milieu cryogénique (cryoMET). Le principe fondamental est le même que pour le MET classique. La différence provient du fait que l'on observe un échantillon gelé, il y a donc une chaîne de froid à respecter dans la préparation de l'échantillon, mais également sur le microscope électronique à l'aide d'azote liquide. L'intérêt de cette méthode provient de la possibilité d'analyser un échantillon liquide sous son état natif en le gelant de manière rapide dans de l'éthane liquide, ce qui permet d'obtenir la formation d'une glace amorphe et non cristalline.

Dans ces travaux de thèse, les images de cryoMET ont été réalisées sur un microscope JEOL JEM2100 opérant à 200 keV (IMPMC, Sorbonne Université, Paris) avec comme source d'électrons un cristal d'hexaborure de lanthane. L'échantillon est préparé par dépôt d'une

goutte sur une grille carbone quantifoil présentant des trous de 2 microns espacés d'un micron. L'excès de liquide est absorbé à l'aide d'un papier filtre avant que la grille ne soit trempée de manière brutale dans l'éthane liquide pour former la glace amorphe. La grille est placée dans un support cryogénique Gatan 626 rempli d'azote liquide. L'échantillon est ensuite placé dans le microscope puis observé à basse température (93 K). Enfin, pour protéger le film de glace pendant la caractérisation, un système MDS (Minimum Dose system) JEOL est utilisé. Les images ont été enregistrées sur une caméra Gatan Ultrascan 1000 ayant un CCD de 2048*2048 pixels.

b) Cartographie élémentaire

La cartographie élémentaire a été réalisée sur un microscope électronique en transmission JEOL JEM2100F opérant à 200 keV (IMPMC, Sorbonne Université, Paris). Les images ont été enregistrées sur une camera Gatan UltraScan 4000 ayant un CCD de 4096*4096 pixels. La spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (XEDS) caractérisant la composition élémentaire est réalisée avec un détecteur XEDS JEOL avec une résolution de 140 eV. Le microscope possède aussi un module de balyage JEOL STEM avec une sonde de 1 nm opérant en HAADF (High Angle Annular Dark Field). Sur ce type d'image, les éléments lourds apparaissent en clairs. La cartographie élémentaire a été réalisée sur des grilles de carbone dans le but de cartographier l'azote ou l'aluminium et sur des grilles de nitrure de silicium dans le but de cartographier le carbone. La préparation se fait par déposition de 3 µL de la solution sur la grille puis par séchage à l'air libre (ou assisté par sèche-cheveux si le temps de séchage est trop long).

c) Suivi de nanoparticules par vidéo microscopie (NTA)

En complément de la diffusion dynamique de la lumière, nous avons suivi la diffusion des nano-objets en suspension par microscopie à l'aide d'un appareil Nanosight300 (Malvern Instrument). L'appareil est équipé d'une chambre dans laquelle est injecté l'échantillon, illuminé par une nappe laser. Les nano-objets diffusant le laser peuvent être visionnées par un objectif de microscopie relié à une caméra. L'analyse de la trajectoire par un traitement d'image permet de déterminer le déplacement quadratique moyen (Figure II.15). Après vérification du caractère diffusif, l'utilisation de la loi de Stokes-Einstein permet de remonter au rayon hydrodynamique. La concentration en particules doit être comprise entre 10^6 et 10^9 particules/mL. Les échantillons d'agrégats présentant une concentration en nanoparticules de l'ordre de 10^{11} NPs/mL ont donc dû être dilués avant mesure.

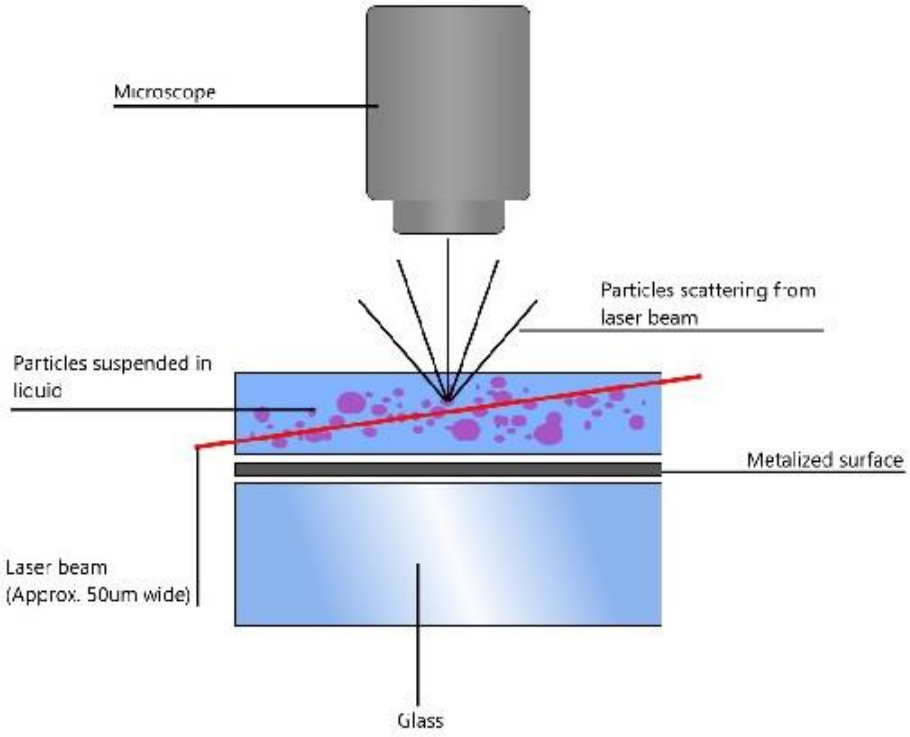


Figure II.15. Représentation schématique de la mesure par NTA. Issue du site malvernpanalytical[109].

IV) Méthodes de spectroscopie

a) Spectroscopie UV-Visible (proche infrarouge)

La spectroscopie UV-Visible permet de sonder les états électroniques d'une entité absorbante (atome, molécule, …) et ainsi de connaître sa nature et son environnement chimique. En envoyant un rayonnement incident d'énergie située dans le domaine de l'UV-Visible sur un matériau, il est alors possible de quantifier les niveaux d'énergie de ce matériau en mesurant les longueurs d'ondes absorbées, ce qui permet de définir la structure électronique de l'édifice. C'est ce qu'on appelle la spectroscopie d'absorption UV-Visible. L'analyse quantitative de ces spectres d'absorption peut ensuite être réalisée en utilisant la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon l C$$

qui relie l'absorbance A, au chemin optique l, à la concentration de l'élément absorbeur C et au coefficient d'extinction molaire ε.

Cependant, dans le cadre de cette thèse, le système est un peu différent puisque que le système étudié est une solution de nanoparticules. Les absorbances sont donc majoritairement liées aux propriétés plasmoniques des nanoparticules métalliques.

Un spectrophotomètre d'absorption UV-Visible peut être schématisé de la manière suivante : une source lumineuse polychromatique est monochromatisée avant l'échantillon afin de permettre l'analyse spectrale longueur d'onde par longueur d'onde. L'onde monochromatique est ensuite séparée en deux sous-faisceaux (un pour l'échantillon et un pour la référence) qui sont illuminés de manière saccadée grâce à un hacheur optique. La lumière en sortie de l'échantillon est ensuite récoltée par un ou plusieurs détecteurs selon la gamme spectrale sondée (photomultiplicateur pour l'UV-Visible et un détecteur InGaAs ou PbS pour le proche infrarouge NIR) (Figure II.16).

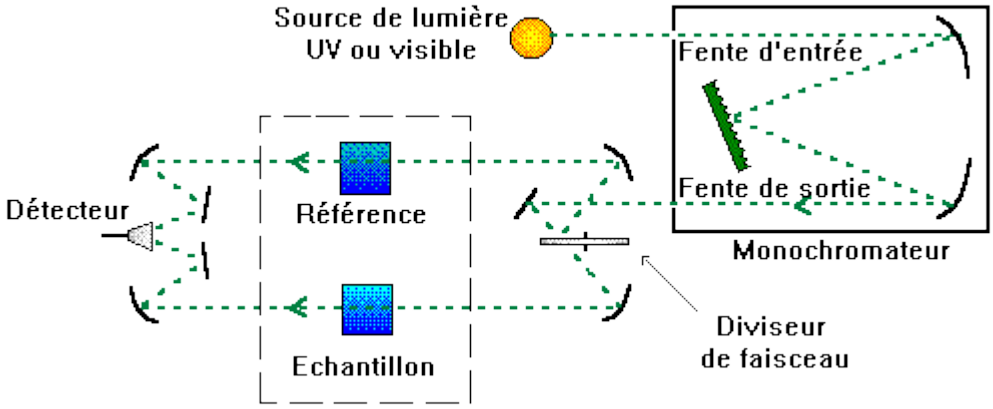


Figure II.16. Représentation schématique d'un spectrophotomètre UV-Vis[110].

Les spectres obtenus en transmittance sont ensuite convertis en absorbance. Ces spectres en absorbance mettent en évidence un pic d'absorption plus ou moins étroit (pic plasmon) lié à la présence de nanoparticules d'or. Dans le cadre de cette thèse, l'agrégation des nanoparticules doit conduire à un décalage en longueur d'onde de ce pic d'absorption qui est appelé effet batochromique.

Les spectres présentés dans cette thèse ont été réalisés sur un spectrophotomètre JASCO 770, au laboratoire. Cependant, la plus grande majorité des spectres ont été réalisés sur un spectrophotomètre Lambda 1050 Perkin-Elmer (IMPMC, Sorbonne Université, Paris) équipé d'une sphère d'intégration (Perkin-Elmer) permettant de mesurer la transmission diffuse. En effet, l'agrégation des nanoparticules induit une augmentation de la taille des objets et donc une capacité à diffuser plus importante.

b) Spectroscopie infrarouge

Les mesures en spectroscopie infrarouge sont réalisées sur un spectromètre IR-TF Nicolet™ iS™ 5 de chez Thermo Fisher Scientific. Les mesures sont réalisées sur de fins morceaux de polymère en réflectance total atténué (ATR).

c) Mesure de carbone organique total (COT)

Les mesures de carbone organique total ont été réalisées à la Plateforme d'Analyses Physico-Chimiques du Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement à Toulouse. L'appareil utilisé est un analyseur Carbone Organique Total (TOC) Shimadzu TOC-L utilisant la technique d'oxydation catalytique à 720 °C avec mesure infrarouge du CO_2 en suivant la norme NF EN 1484. Les échantillons sont pré-traités par une acidification dans de l'acide chlorhydrique pour éviter de retrouver du carbone minéral.

d) Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les caractérisations par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^{1}H) ont été effectuées par F. Ribot au laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris sur un spectromètre Bruker AV^{III} 300 opérant à 300 MHz, équipée d'une sonde Broad Band Fluorine Observation (avec gradient z, G_{max}= 47 G/cm) à 25 °C. Le solvant deutéré utilisé pour la réalisation des mesures et le diméthylsulfoxyde (DMSO-*d6*). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm.

Les analyses de diffusion par RMN Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) ont été effectuées au sein du même laboratoire, sur le même appareil et par la même personne. La séquence utilisée est une séquence standard de la librairie Bruker : ledbpgp2s. Les expériences de RMN DOSY ont été analysées suivant le protocole d'analyse exponentielle :

- Analyse exponentielle : les profils d'atténuation de chaque point du spectre (au-dessus d'un seuil) sont ajustés, au sens des moindres carrés, par 1 ou 2 ½ gaussiennes décroissantes (formule de Stejskal et Tanner). Les résultats sont représentés sous forme d'une carte 2D (D vs déplacement chimique) reconstruite à partir des résultats des ajustements.

V) Lyophilisation

La lyophilisation des polymères (chitosan quaternisé, PVA-*g*-PSS, PVA-Ts) a été réalisée sur un lyophilisateur TELSTAR LyoQuest en maintenant une température de -60 °C est une pression de 0.5 mbar. Avant lyophilisation, la solution aqueuse de polymère a été gelée dans de l'azote liquide. Les volumes de solutions lyophilisées étaient en moyenne de 30 mL et la durée était en moyenne de 2 jours pour s'assurer de n'avoir aucune trace d'eau.

VI) Chromatographie d'exclusion stérique

La mesure de la masse molaire du chitosan est réalisée à la plateforme TECHNOPOLYM à Toulouse par chromatographie d'exclusion stérique. Le montage se compose d'une colonne

cationique Tosoh TSK gel G5000 PWXL-CP (400 < M_w < 500000) et G3000 PWXL-CP (200 < M_w < 50000)), d'un réfractomètre différentiel (Shodex RI-101, T = 35 °C) et d'un détecteur de diffusion statique de la lumière (MALLS Wyatt Dawn Heleos, λ_{laser} = 658 nm, 18 angles). L'éluant utilisé pour la caractérisation est un mélange d'acétate de sodium 0,1 M et d'acide acétique pH 3 ($V_{injecté} = 50\ \mu L$ et $Q = 1\ mL.min^{-1}$). Les résultats sont ensuite traités avec le logiciel ASTRA VI.

VII) Titration des ions chlorure par conductimétrie

Le degré de substitution du chitosan quaternisé (23,4 mg) est déterminé par titration en conductimétrie des ions chlorure par une solution de nitrate d'argent (0,01 M). Ce protocole de titration est inspiré de travaux de la littérature sur la fonctionnalisation du chitosan[111,112]. Le suivi des mesures est réalisé sur un conductimètre SevenMulti METTLER TOLEDO équipé d'une sonde InLab® 731. Le polymère est dissous dans l'eau milliQ puis les valeurs de conductimétrie sont relevées en ajoutant étape par étape 200 µL de la solution de nitrate d'argent ($AgNO_3$) sous agitation. L'ajout d'ions Ag+ en présence des ions Cl^- conduit à la formation d'un précipité AgCl. A l'équivalence $n_{(Ag^+)} = n_{(Cl^-)}$, connaissant le nombre de mol d'ion Ag^+, on peut déterminer le nombre de mol de Cl^- qui permet de remonter au degré de substitution.

On notera l'utilisation d'autres méthodes pour la détermination du degré de substitution telles que l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique ou l'analyse élémentaire CHNS, mais ces deux méthodes ont conduit à des résultats aberrants ne traduisant pas la réalité de notre échantillon avec des degrés de substitution dépassant les 200 %.

CHAPITRE III

Stabilisation de complexes électrostatiques au voisinage du point isoélectrique par adsorption de longues chaînes polyélectrolytes

I) Introduction

Il est connu, depuis longtemps, que des chaînes polyélectrolytes (PELs) linéaires peuvent être mélangées à une solution colloïdale de charge opposée afin d'en favoriser l'état dispersé (i.e. stabilisation) ou d'induire une agrégation (i.e. déstabilisation)[85,86,113,114]. Dans la première situation, il est commun d'utiliser des chaînes « courtes » afin de saturer la surface des colloïdes et de les maintenir éloignés grâce aux forces de répulsions électrostatiques[87]. Dans le second cas, de longues chaînes PELs présentant une longueur de contour nettement supérieure à la taille des colloïdes peuvent être ajoutées à une concentration proche du point isoélectrique où l'on a compensation totale des charges entre le PEL et les colloïdes[115–117]. On peut citer l'exemple du chitosan qui est commercialisé comme agent de purification dans les eaux usées. L'intérêt d'utiliser de longues chaînes est de pouvoir collecter plusieurs particules par chaînes afin de former des structures importantes présentant une grande taille facile à éliminer dans un second temps par filtration. À l'échelle locale, les chaînes PELs sont supposées s'enrouler autour des colloïdes sans nécessairement recouvrir toute la surface[88,118]. Ainsi, il est possible de trouver la coexistence de charges opposées à la surface du colloïde lorsque l'on se trouve proche du point isoélectrique[119].

Dans certaines conditions, il a été démontré que de longues chaînes PELs peuvent être utilisées, à la fois comme agent de couplage et agent stabilisant. En effet, des dispersions d'agrégats formés par le couplage PELs/colloïdes ont été obtenues à faible concentration en PELs, pour de faibles conditions d'écrantage et des rapports de charge éloignés du point isoélectrique[90,91,120–122]. Ces agrégats dits « surchargés » ou complexes « primaires » sont de taille nanométrique et présentent une structure moins dense que les coacervats (i.e. phase liquide dense) ou précipités (i.e. phase solide) obtenus au voisinage du point isoélectrique. Cette distribution spatiale de la masse au sein de l'agrégat est généralement caractérisée par la dimension fractale en masse notée d_f[123]. Je précise que pour des particules de masse m_0 et de taille r_0, la masse totale de l'assemblage m varie en fonction de son rayon r mesuré à partir de n'importe quel site au sein de la structure et peut être notée :

$$m(r) \propto m_0 \left(\frac{r}{r_0}\right)^{d_f}$$

Une dimension fractale proche de 2 est typiquement représentative d'une structure ramifiée aléatoire alors qu'une dimension fractale proche de 1 ou 2,9 est caractéristique, respectivement, d'une structure 1D ou 3D compacte. Il est aussi intéressant de noter que la dimension fractale des agrégats « surchargés » a pu être modulée entre des valeurs de 1 à 2,5 en faisant varier le rapport entre la longueur de persistance totale du PEL (quantifiée par L_{pt}) et le rayon des particules[93,124].

Les agrégats de colloïdes obtenus au voisinage du point isoélectrique sont caractérisés par une distance inter-particules minimale[119] et une forte compacité ($d_f \geq 2$). Par exemple, il a

été récemment montré qu'il est possible de former des cristaux colloïdaux par complexation entre des nanoparticules d'or chargées positivement et de l'acide hyaluronique en se plaçant au voisinage du point isoélectrique et en écrantant les charges ([NaCl] = 0,1 M)[125]. Comme évoquées dans le chapitre I, ces spécificités structurelles peuvent être intéressantes pour diverses applications notamment pour des nanoparticules métalliques. En effet, dans ce cas, le couplage plasmonique et le champ électrique entre particules adjacentes devraient être maximisés, ce qui est important dans le cadre de la thermoplasmonique ou de l'amplification de signaux optiques comme la fluorescence ou la diffusion Raman[4,126].

Cependant, de tels agrégats sont potentiellement intéressants s'il est possible de les stabiliser après leur formation de manière à pouvoir les manipuler à l'état colloïdal. Cette question de la stabilisation a été peu considérée jusqu'à présent, à l'exception de travaux réalisés par le groupe de Murthy et al.[127]. Leur approche consiste à former des complexes globalement neutres de poly-L-lysine (PLL) et de nanoparticules d'or citratées, puis à les stabiliser en ajoutant un excès de nanoparticules de silice anioniques. Ces complexes présentent une structure de vésicule avec un noyau rempli d'eau et une « écorce biphasique ». La première couche, proche du centre, est composée principalement de complexes AuNPs/PLL et la partie externe est, quant à elle, constituée de nanoparticules de silice (Figure III.1). La structure finale est donc différente de la structure initiale de complexes fractaux. Le mécanisme de réorganisation avec l'ajout de nanoparticules de silice, n'a pas été clairement établi. Suite à cette étude, des complexes neutres de différentes natures (i.e. polycation/polyanion[128], ion multivalent/polélectrolyte[129–131]) ont été stabilisés par l'ajout ultérieur de nanoparticules[128,130,131] ou de molécule d'anticorps[129]. Quel que soit le système, les structures finales prennent la conformation de vésicules.

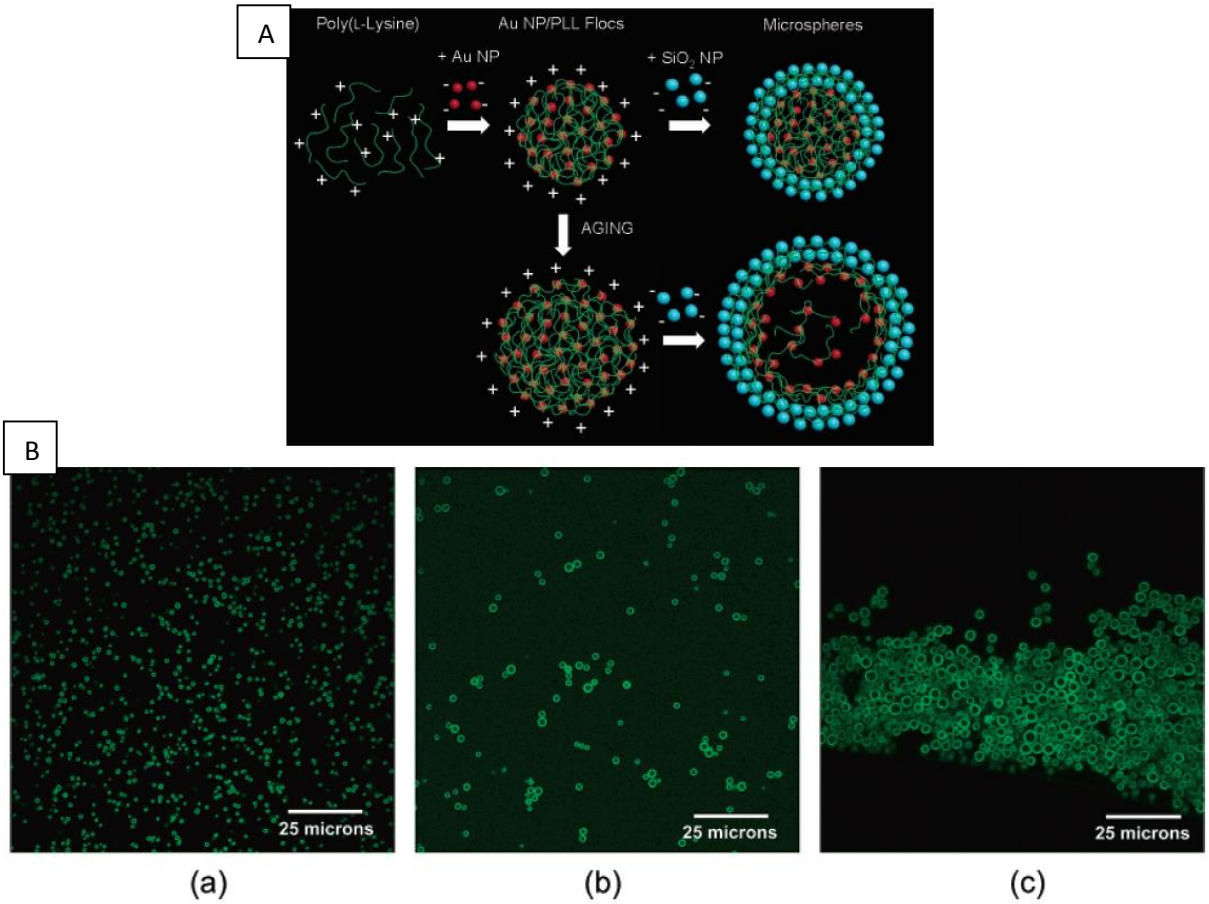


Figure III.1. (A) Représentation schématique du mécanisme de formation des "vésicules" AuNPs/PLL-FITC/SiNPs. (B) Cliché de microscopie confocale des assemblages après (a) 3 min, (b) 20 min et (c) 2h. Issue des travaux de Murthy et al[127].

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre est de stabiliser des complexes électrostatiques de PELs et de nanoparticules d'or citratées formés au voisinage du point isoélectrique par l'ajout ultérieur de chaînes PELs. À notre connaissance, et à notre étonnement, cette possibilité n'a jamais été rapportée jusqu'à présent. Comme étude de cas, nous avons considéré des nanoparticules d'or citratées et des chaînes de PELs linéaires d'origine naturelle qui étaient du chitosan quaternisé (i.e. polycation noté QC, $L_c = 1075\ nm$ et $M_w = 357000\ g/mol$) (Figure III.2). Comme évoqué à la fin du chapitre I, Le chitosan possède un pKa proche de 4 nous obligeant à travailler dans une gamme de pH entraînant la déstabilisation des nanoparticules d'or par protonation du citrate en surface ($pKa_{chitosan} \rightarrow 3{,}13 - 4{,}76\ et\ 6{,}40$). Dans cette optique, nous avions donc fait le choix de fonctionnaliser le chitosan avec un ammonium quaternaire afin de travailler sur une large gamme de pH.

Nous avons systématiquement caractérisé la taille, la structure et les propriétés optiques des assemblages en effectuant des mesures non dénaturantes par DLS, SAXS, cryo-MET et UV-Vis-NIR.

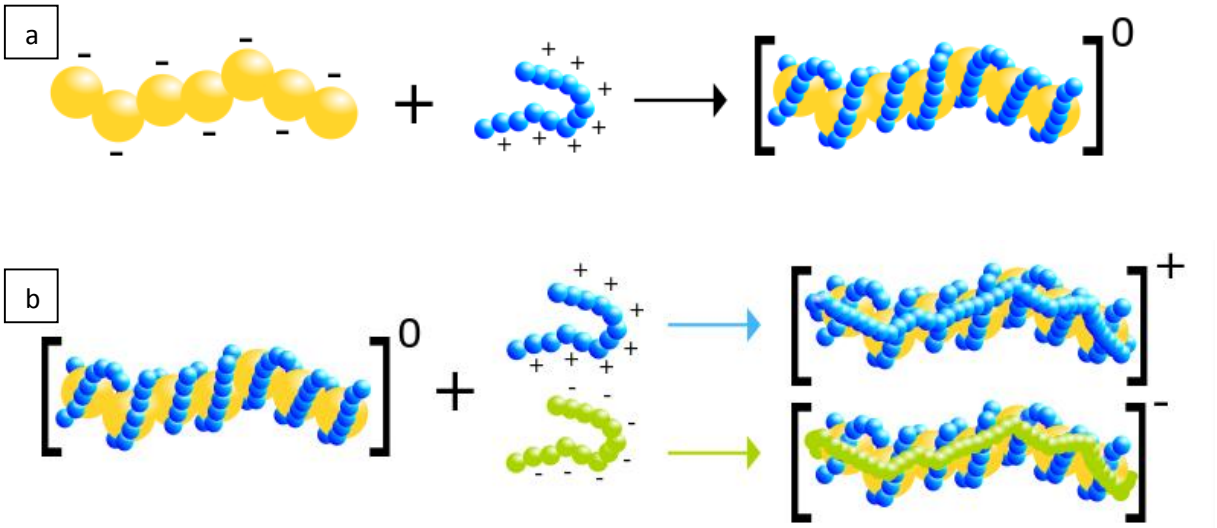


Figure III.2. Représentation schématique du mécanisme (a) d'assemblage et de (b) stabilisation des agrégats.

II) Produits chimiques

Nom (abréviation)	Formule	Masse molaire	Fournisseur
Chitosan (degré de déacétylation 75 %)	$(C_8H_{13}NO_5)_{0,25}$-$(C_6H_{11}NO_4)_{0,75}$	M_w = 310 – 375 kg/mol	Sigma-Aldrich
Glycidyltriméthylammonium chloride (GTMAC)	$C_6H_{14}NOCl$	M = 151,6 g/mol	TCI
Nitrate d'argent ($AgNO_3$)	$AgNO_3$	M = 170 g/mol	Sigma-Aldrich

Tableau III.1. Produits chimiques utilisés pour la synthèse et la caractérisation du chitosan quaternisé.

III) Synthèse du chitosan quaternisé

a) Etat de l'art

La chitine est un polysaccharide naturel (Figure III.3) synthétisé par de nombreux organismes vivants. L'abondance de la chitine fait de ce biopolymère le deuxième plus présent après la cellulose et dont la principale source actuelle est la carapace de crabe ou de crevette[132].

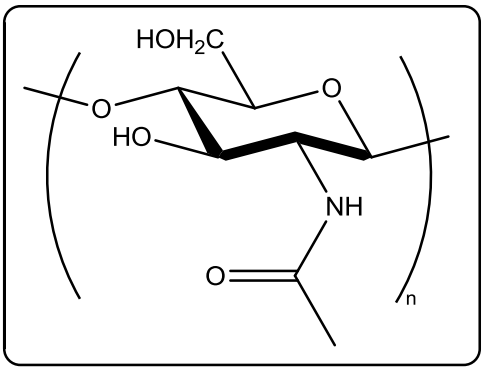


Figure III.3. Unité monomère de la chitine.

La chitine est extraite des crustacés par traitement acide pour dissoudre le carbonate de calcium suivi d'une extraction alcaline pour solubiliser les protéines. La chitine est donc une succession d'unités monomère acétylé avec une bonne solubilité dans l'eau. On peut trouver, dans les principaux dérivés de la chitine, le chitosan, polymère d'intérêt de cette thèse. Le chitosan est obtenu par déacétylation de la chitine, à l'état solide sous conditions alcalines ou par hydrolyse enzymatique. On parle de chitosan lorsque le degré de déacétylation dépasse les 50 %. Ce polymère est souvent répertorié par son degré de déacétylation (DA) (Figure III.4) qui régit aussi ses propriétés physico-chimiques comme sa solubilité. En effet, plus le chitosan aura un DA élevé plus il comportera de groupements amines ionisables rendant le polymère soluble dans l'eau.

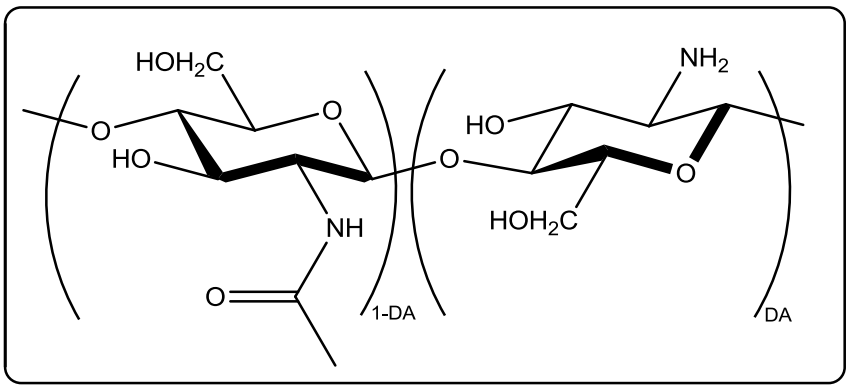


Figure III.4. Structure du chitosan partiellement déacétylé.

Le chitosan trouve son application dans plusieurs domaines tels que le traitement des eaux par floculation ou par interaction avec ions métalliques[133,134], mais aussi de plus en plus dans le domaine biomédical[135–137]. Si les applications sont variées, il est parfois nécessaire de modifier chimiquement le chitosan pour changer ses propriétés[138–142].

De nos jours, on peut trouver de nombreuses méthodes pour modifier chimiquement le chitosan. La modification de ce polymère a commencé vers le début du 20ème siècle[143]. Nous ferons le choix ici de ne traiter que le sujet de quaternisation du chitosan. Ce polymère montrant un intérêt pour des applications étroitement liées au domaine biomédical, il a été

nécessaire d'étendre son utilisation sur une large gamme de pH, le chitosan non quaternisé étant totalement chargé et soluble dans l'eau pour un pH < 4,5. Les premiers travaux évoquant la quaternisation du chitosan ont paru en 1963 avec l'étude de la méthylation du groupement amine par Wolfrom et al.[144]. Ce n'est qu'en 1985 que l'on a reporté la première synthèse du premier dérivé du chitosan avec le N,N,N-trimethyl chitosan iodide (TMC) par le groupe de Muzzarelli[145]. Ces travaux ont ouvert la voie sur la possibilité de modifier le chitosan par méthylation, notamment pour la quaternisation[146–148]. La voie de quaternisation par greffage indirect, c'est-à-dire par réaction avec une molécule comportant un groupement ammonium quaternaire, a vu le jour avec les travaux de Loubaki et al.[149] en 1991. Ces travaux consistent à faire réagir la glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC) sur le groupement amine NH_2 par ouverture du cycle epoxy. Le degré de substitution augmente en fonction du rapport molaire $n_{chitosan}/n_{GTMAC}$ avec des hauts degrés de substitution pour un rapport 1/6 (95 %). Durant ce travail de thèse, le choix a été fait de travailler sur la quaternisation du chitosan par la méthode du greffage indirect par utilisation de la molécule de GTMAC, qui est une méthode plus simple, rapide et ne nécessitant pas de solvant toxique.

Comme évoqué précédemment, il existe deux grandes voies pour le greffage d'un ammonium quaternaire sur le chitosan :

- Une synthèse multi étapes qui passe en premier par une réaction d'amination avec une chaine alkyle puis l'introduction de l'ammonium quaternaire par méthylation avec de l'iodure de méthyle[146,150,151] (Figure III.5).

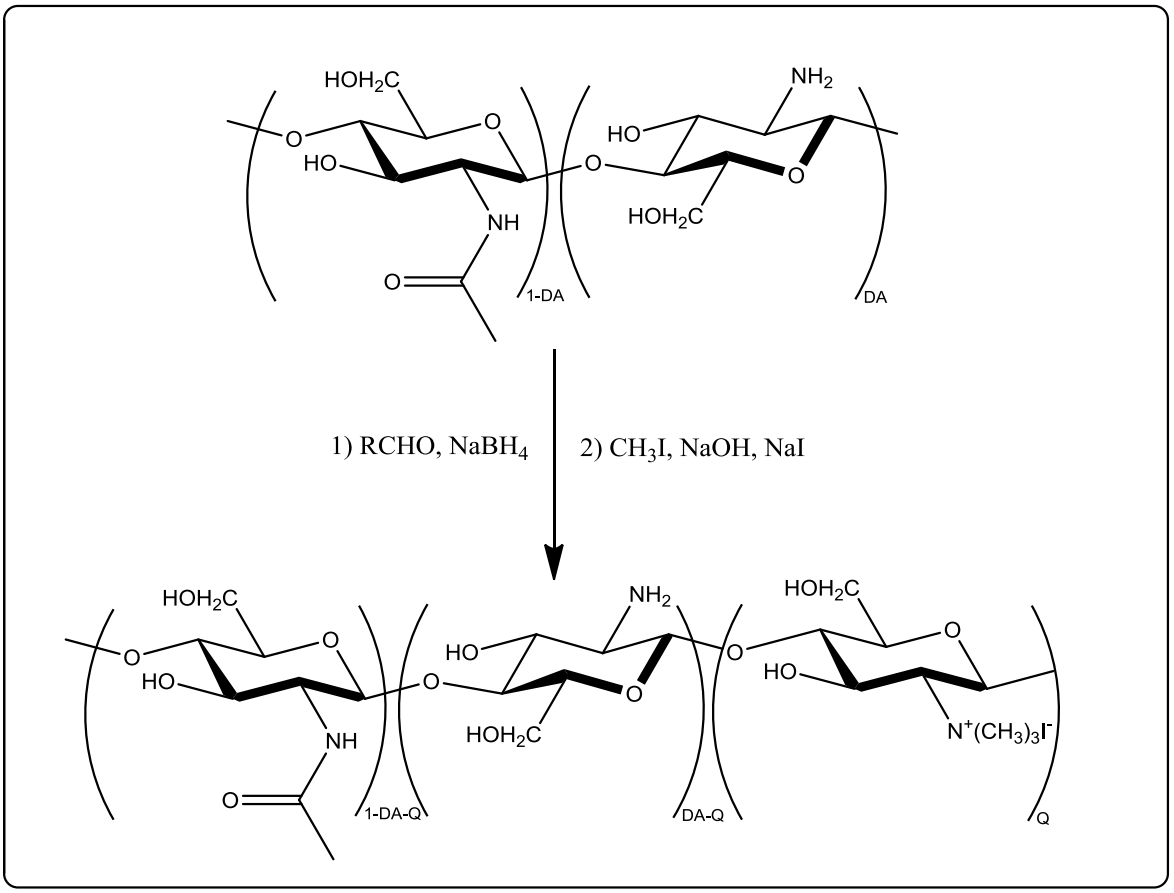


Figure III.5. Représentation de la quaternisation du chitosan par méthylation.

- L'introduction en une étape de l'ammonium quaternaire via la réaction de « ring opening » soit l'ouverture d'un cycle epoxy par l'amine du chitosan[111,149,152] (Figure III.6).

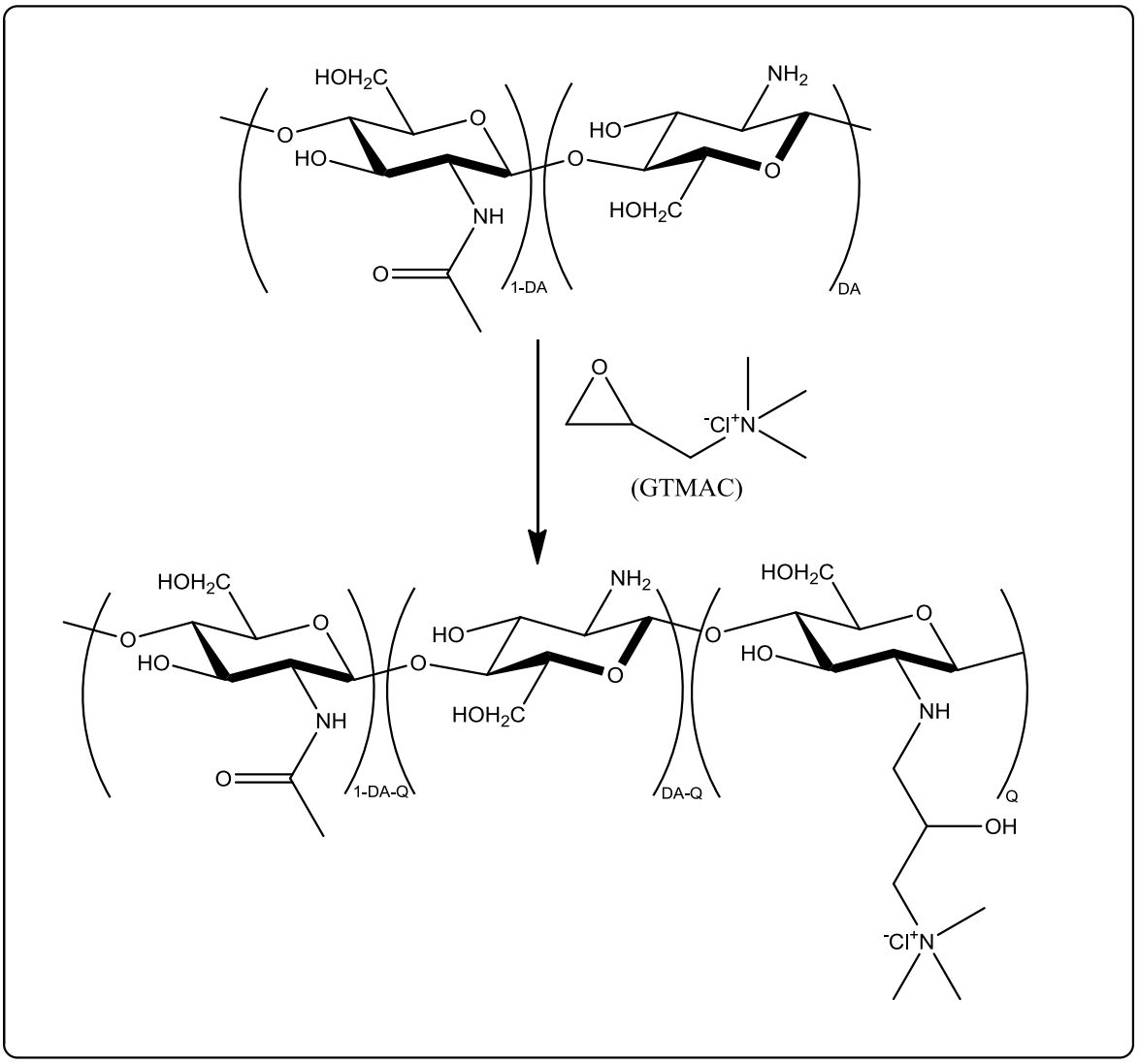


Figure III.6. Représentation de la quaternisation du chitosan par ouverture de cycle avec la molécule de GTMAC.

Cette deuxième voie de synthèse peut elle aussi se faire selon deux voies : la « voie acide »[111] ou la « voie aqueuse »[149]. Ces deux voies de synthèse conduisent à un polymère soluble dans l'eau avec un degré de substitution élevé (> 85 %). Nous nous intéresserons dans ce travail à la synthèse par ouverture de cycle en voie aqueuse permettant de travailler directement sur des fonctions amines primaires.

b) Synthèse et caractérisations

Nous allons ici décrire le protocole utilisé pour la synthèse du chitosan quaternisé (QC) avec le plus haut degré de substitution (Figure III.7). Les autres synthèses seront détaillées par la suite, dans un tableau avec le rapport $^{n_{GTMAC}}/_{n_{chitosan}}$ utilisé, le degré de substitution et la solubilité qui en résulte.

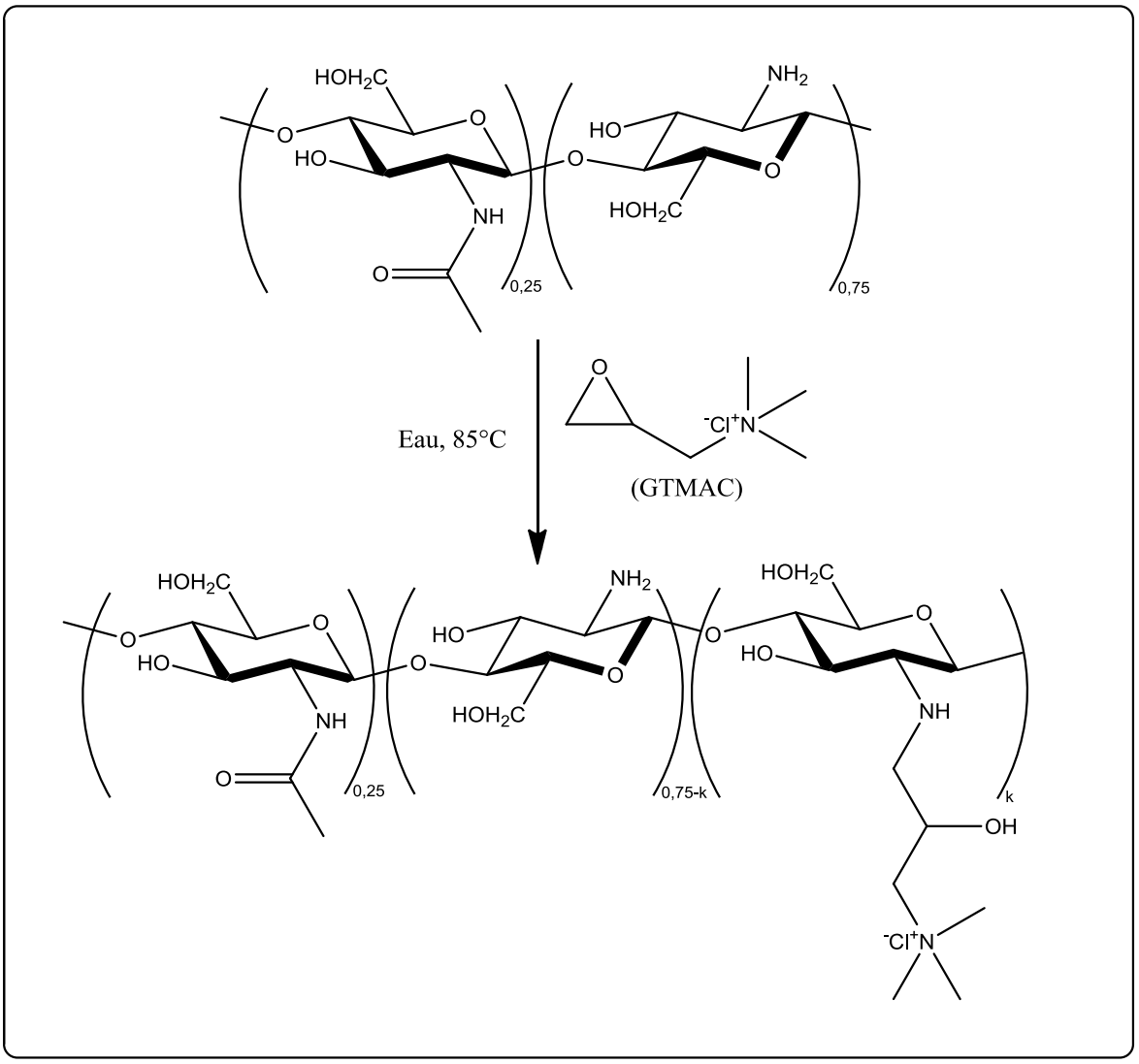


Figure III.7. Schéma de synthèse du chitosan quaternisé par ouverture de cycle en voie aqueuse.

Le chitosan de base provient de chez Sigma-Aldrich. Il présente un degré de déacétylation de 75 % et une masse molaire entre 310 et 375 kDa d'après Sigma. La valeur obtenue par chromatographie d'exclusion stérique (356,7 kDa) après analyse en chromatographie d'exclusion stérique est bien dans la fourchette des valeurs attendues. D'après cette même analyse, il présente un indice de polymolécularité, Ip = 2,1. Le glycidyltriméthylammonium chloride (GTMAC) provient de chez TCI et se présente sous la forme d'un liquide à 80 %w dans l'eau. La synthèse est inspirée des protocoles proposés par Loubaki et al.[149] et Lim et al.[153].

Dans un ballon bicol de 250 mL, disperser 6 g de chitosan dans 60 mL d'eau milliQ à 85 °C à reflux pendant 2 h pour obtenir une suspension de chitosan. À cette étape, le chitosan n'est visiblement pas solubilisé. Le GTMAC est ensuite ajouté 3 fois toutes les deux heures à raison de 10,3 mL par injection en maintenant la solution sous agitation à 1000 rpm. La solution devient rapidement visqueuse et jaunâtre au fur et à mesure des injections et de la solubilisation progressive du chitosan suivant la quaternisation. Laisser le mélange sous agitation toute la nuit. Le polymère, qui prend l'aspect d'une gomme, est ensuite ajouté dans

un excès d'acétone. Le produit est filtré sur verre fritté (pore 40-60 µm) à l'aide d'une pompe à vide, puis lavé plusieurs fois à l'acétone. Le produit récupéré est ensuite séché dans une étuve sous vide. Pour éliminer les impuretés et les traces de GTMAC qui n'aurait pas réagi, le produit est dialysé plusieurs jours contre de l'eau (coupure 14 kDa). L'eau est changée toutes les deux heures. Le produit final est ensuite récupéré à l'état solide après lyophilisation.

Le GTMAC est introduit en excès pour augmenter le degré de substitution, mais aussi, car une partie de celui-ci va s'hydrolyser et le rendre inerte vis-à-vis du chitosan (Figure III.8). C'est aussi pour cette raison que nous avons fait le choix de ne travailler qu'avec des solutions fraîches de GTMAC, c'est-à-dire, ouvertes pour une synthèse.

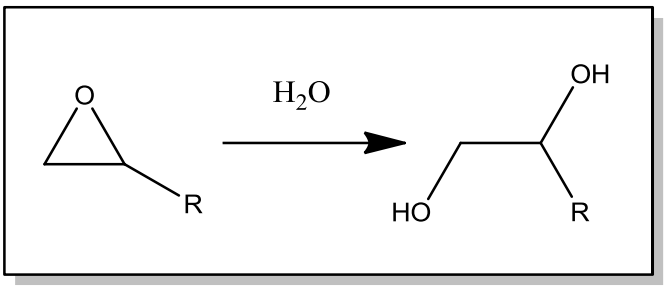


Figure III.8. Schéma de la réaction d'hydrolyse d'une fonction époxy.

Après fonctionnalisation et avant dialyse le produit prend une forme de solide jaunâtre. Le premier résultat visuel est une évidente amélioration de la solubilité du polymère dans l'eau milliQ à pH 6-7 après fonctionnalisation (Figure III.9).

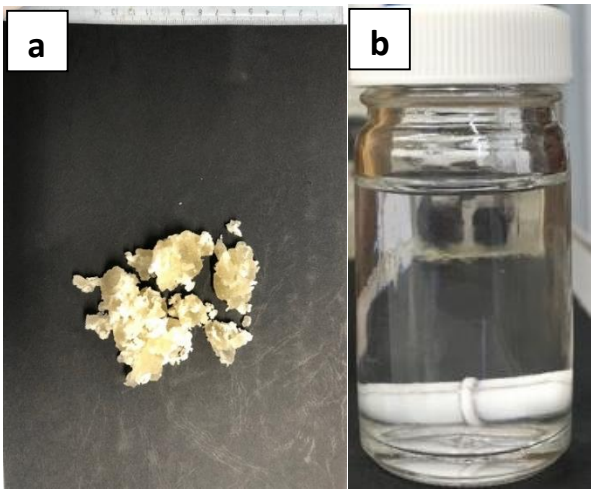


Figure III.9. Photo du chitosan quaternisé avant dialyse et lyophilisation a) sous sa forme solide, b) dispersé dans l'eau milliQ à pH 6.

Trois ratios ont été considérés pour étudier l'influence du ratio sur le degré de substitution mesuré en conductimétrie. Le pourcentage de substitution est exprimé par rapport au nombre de monomères déacétylés (Tableau III.2 et Figure III.10).

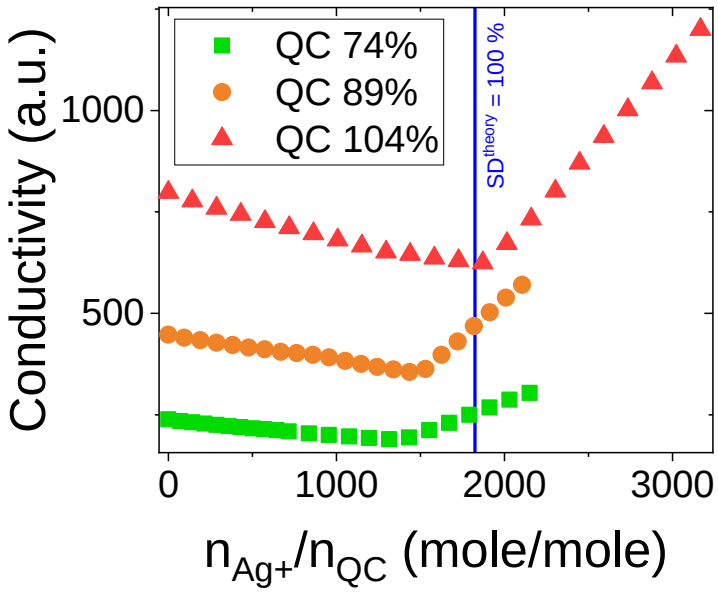


Figure III.10. Courbe de titration en conductimétrie d'une solution de chitosan quaternisé par une solution de nitrate d'argent.

n_{GTMAC}/n_{DA}	Degré de substitution	Solubilité dans l'eau MilliQ à pH 6
2 : 1	74 %	NON
3 : 1	89 %	OUI
4,5 : 1	104 %	OUI

Tableau III.2. Degré de substitution mesuré par titration en conductimétrie des ions chlorure par une solution de nitrate d'argent et solubilité du chitosane en fonction du rapport molaire GTMAC/chitosan.

Dans l'optique de déterminer le degré de substitution, le polymère a aussi été analysé en chromatographie d'exclusion stérique (colonne cationique Tosoh TSK gel G5000 PWXL-CP ($400 < M_w < 500000$)), mais les résultats ont été peu concluants avec une valeur de masse molaire $Mw \approx 1100000$ g/mol et un indice de polydispersité Ip = 3,8 très important. Ces valeurs aberrantes peuvent s'expliquer par une masse molaire trop importante du chitosan quaternisé ou la présence d'agrégats lors de la mesure.

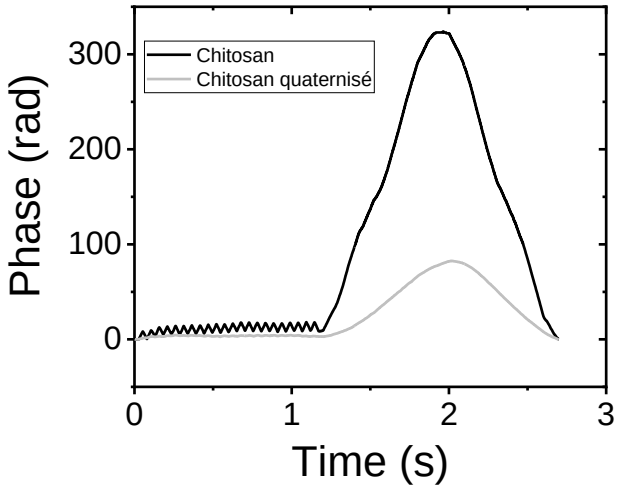


Figure III.11. Evolution de la phase pendant une mesure de mobilité électrophorétique concernant une solution aqueuse de chitosan (gris) et de chitosan quaternisé (QC 104 %) après purification (pH 6,5 et [polymère] = 0,1 g/L).

Les courbes de conductimétrie obtenues se divisent en deux parties (Figure III.10) :

- A faible n_{Ag^+}/n_{QC} (avec n_{QC} le nombre de mol d'unités monomère fonctionnalisées), la conductivité diminue doucement. Dans cette partie précédent l'équivalence, l'ion argent est en défaut. Du point de vue de la conductivité, l'ion chlorure précipite pour former un complexe (AgCl) et est remplacé en solution par l'ion ammonium dont la conductivité ionique molaire est plus faible.

$$Ag^+_{(aq)} + Cl^-_{(aq)} \rightarrow AgCl_{(s)}$$

- Après l'équivalence, la conductivité augmente plus fortement suite à l'apport des ions argent et nitrate à la solution.

À l'intersection des deux courbes, on a une équivalence $n_{Ag^+} = n_{Cl^-}$ qui permet de remonter au degré de substitution du chitosan. On notera aussi sur la figure III.10, la valeur à laquelle on obtient un taux de substitution théorique de 100 %. Ce taux de substitution théorique correspond au scénario où toutes les fonctions amines (NH_2) du chitosan ont réagi une fois avec le cycle époxy du GTMAC.

Après mesure de mobilité électrophorétique μ = 4,7 ($\times 10^8$) $m^2V^{-1}s^{-1}$, on peut conclure que le chitosan présente une mobilité électrophorétique élevée (Figure III.11) et donc la présence importante de charges positives.

Globalement, les taux de substitution mesurés sont inférieurs à ceux attendus théoriquement, mais en assez bon accord avec ceux trouvés dans la littérature (Figure III.12).

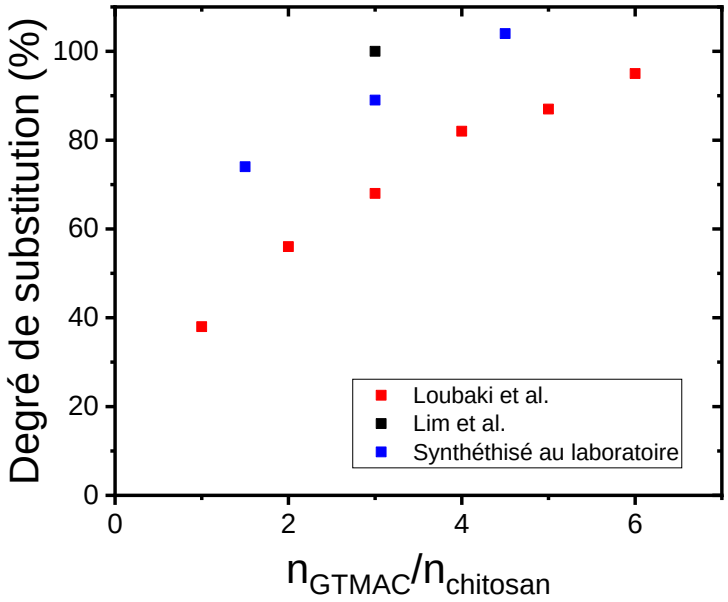


Figure III.12. Degrés de substitution mesurés en fonction du rapport $n_{GTMAC}/n_{chitosan}$ reportés par Loubaki[149], Lim[153] et d'après nos résultats.

Pour le taux de substitution le plus élevé, nous estimons une valeur supérieure à 100 %. Si l'on exclut un problème de reproductibilité et/ou un problème d'estimation de la proportion de groupements déacétylés, nous pourrions expliquer cette valeur étonnante de deux manières :

- Après une première réaction, l'amine primaire devient une amine secondaire qui reste un site encore réactif vis-à-vis du GTMAC pour donner au final une amine tertiaire (Figure III.13).

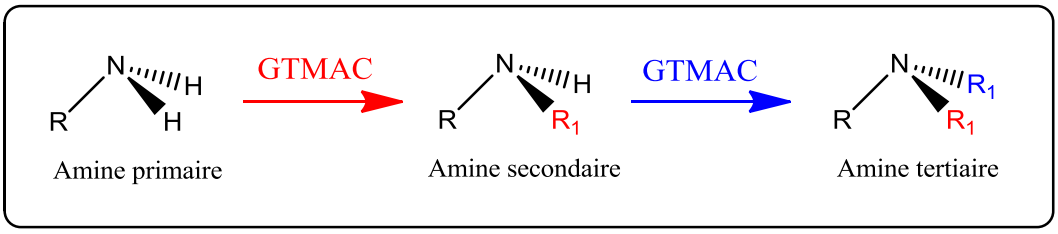


Figure III.13. Schéma de réaction sur l'amine primaire du chitosan.

- La fonction hydroxy en position 3 est aussi une fonction réactive sur laquelle peut réagir le GTMAC. Mais cette hypothèse reste peu probable, les fonctions amines étant un site préférentiel pour le cycle époxy (Figure III.14).

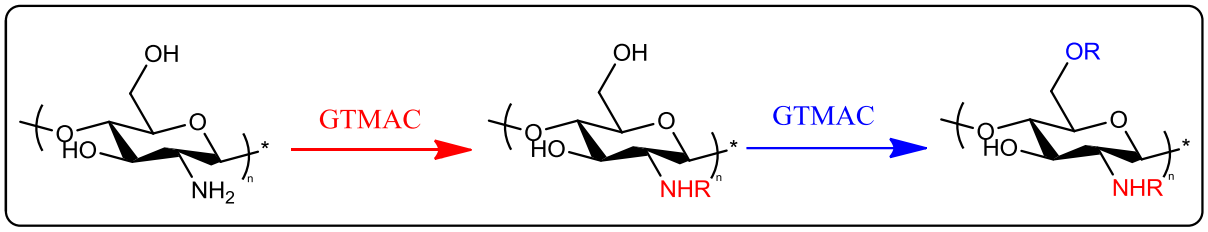


Figure III.14. Schéma de réaction de GTMAC sur la fonction hydroxy.

Le degré de substitution étant mesuré en considérant que l'amine ne réagit qu'une fois avec l'amine primaire du chitosan, il est donc possible de trouver des valeurs supérieures à 100 % si l'on considère les autres réactions citées précédemment.

Notre étude met en évidence une certaine disparité des résultats obtenus dans la littérature et une relation inattendue entre le degré de substitution théorique et mesuré. Notre résultat principal est l'obtention d'un lot de chitosan quaternisé, dont nous avons probablement fonctionnalisé tous les groupements déacétylés. Ce même lot de polymère totalement soluble dans l'eau milliQ sera utilisé pour toute l'étude suivante.

IV) Charge-Driven Arrested Phase-Separation of Polyelectrolyte-Gold Nanoparticle Assemblies Leading to Plasmonic Oligomers

Charge-Driven Arrested Phase-Separation of Polyelectrolyte-Gold Nanoparticle Assemblies Leading to Plasmonic Oligomers

F. Voisin,[1] G. Lelong,[2] J.M. Guigner,[2] T. Bizien,[3] J.M. Mallet,[4] and F. Carn[1*]

[1] Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, Université de Paris, CNRS, Paris, France.
[2] Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et Cosmochimie (IMPMC), Sorbonne Universités−UPMC Univ Paris 06, UMR CNRS 7590, Muséum National d'Histoire Naturelle, IRD UMR 206, F- 75005 Paris, France.
[3] Synchrotron Soleil, Beamline SWING, Gif SurYvette, Cedex F-91192, France
[4] Laboratoire des Biomolécules, UMR 7203, École Normale Supérieure, PSL Research University, Sorbonne Universités, CNRS, Paris, France.

[*] E-mail : florent.carn@u-paris.fr

Keywords. Gold, Chitosan, Nanoparticle, Polyelectrolyte, Self-Assembly, Complexation

Abstract

The assembly of a finite number of plasmonic nanoparticles, obtained by conventional means, in water, with a maximized plasmon coupling remain a challenge. In this article, we studied the electrostatic complexation of citrate coated gold nanoparticles with largely available polyelectrolytes of biological origin. Globally neutral charged assemblies were found to have the best plasmon coupling properties, and, the least colloidal stability. We show how the flocculation dynamic can be arrested by the addition of polyelectrolyte. It allows the stabilisation of nanoscale assemblies keeping the structure and the optical properties of the initial globally neutral complex. The overall charge of the nanoassemblies is controlled by the charge of the polyelectrolyte added in the second step. We believe that this approach provide new opportunities to master "flocculation assembly" by allowing the formation of finite size assemblies in which the inter-particle distance is minimal and the surface chemistry is adjustable.

1. Introduction

It has long been known that polyelectrolyte chains (PEL) could be added to a dispersion of oppositely charged colloids to promote colloid dispersion or to promote colloid aggregation.[1–3] In the first case, it is classical to use short chains at a concentration high enough to saturate the colloid surfaces so as to keep them apart from each other.[4] In the second situation, long PEL having a contour length (L_c) much higher than the size of the colloids are usually added at a concentration close to the isoelectric point (IEP) where the total charge of all PEL is compensated by the total charge of all colloids.[5–7] Here, the interest of using long chains close to the IEP is to allow for the collection of several colloids per chain to fasten the formation of extended structures that sediment over time. At the local scale, PEL chains should wrap around the colloids but without necessarily covering the entire surface.[8,9] Thus, patches of opposite charge can coexist on the surface of the colloids in the vicinity of the IEP even if the overall charge of the assembly is zero.[10]

Nevertheless, in certain conditions, long PEL chains can be used, both as coupling/adhesive agent and as a stabilising/repellent agent. Indeed, dispersions of finite size aggregates formed by the coupling of several colloids per PEL were obtained in the dilute domain of PEL concentration for low charge screening conditions and charge ratios far from the IEP.[11–15] These so-called 'overcharged' aggregates or 'primary' complexes are nanometric and have a less dense structure than the complex coacervates (i.e. dense liquid phase) or precipitates (i.e. solid phase) obtained by working in the vicinity of the IEP. This spatial distribution of the mass within the aggregate is generally characterized by the mass fractal dimension (d_f).[16] For particles with a mass, m_0, and a size, r_0, the total mass of the assembly, m, scales with its radius, r, measured from any site within the fractal structure, as $m(r) \propto m_0({}^{r}/_{r_0})^{d_f}$. $d_f \sim 2$ is typical of a random branched structure while $d_f \sim 1$ and $d_f \sim 2.9$ ar expected for 1D and 3D structures respectively.[17] Interestingly, the average fractal dimension of overcharged aggregates could be modulated between 1 and 2.5 by playing on experimental levers such as the ratio between the effective PEL rigidity, quantified by the total persistence length ($L_{p,T}$), and the particle radius.[18,19]

Aggregates obtained in the vicinity of IEP are characterised by a minimal inter-particle distance [10] and a high degree of compactness (i.e. $d_f \geq 2$) which can be associated with a high level of organisation with the possibility of forming colloidal crystals.[20] These structural specificities may be of interest for applications if the particles are metallic. In this case, the

plasmonic coupling and the electric field in between adjacent particles should be maximized which is important for applications in the fields of thermoplasmonic and for the amplification of optical signals such as fluorescence or raman scattering.[21,22]

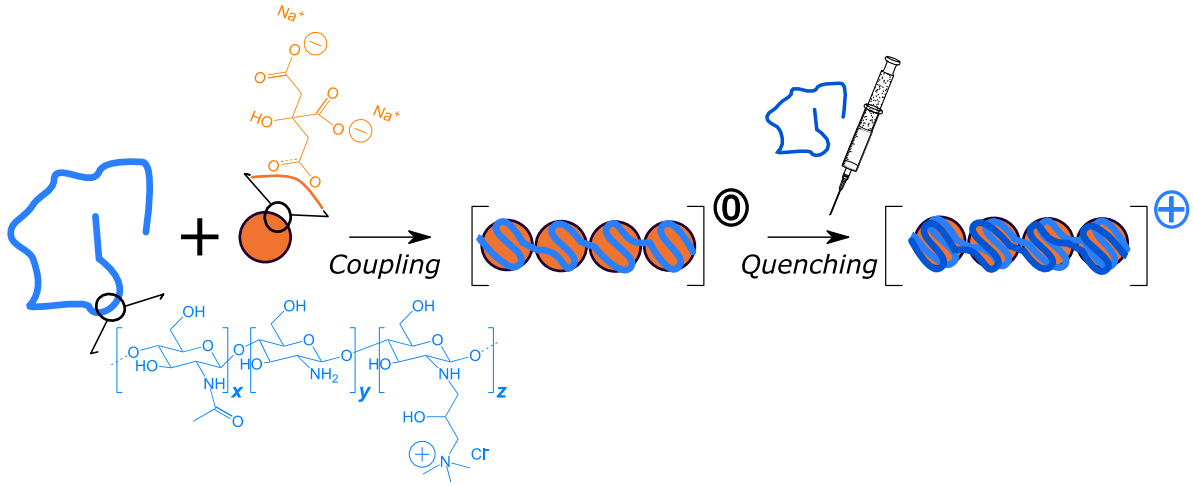
However, such aggregates are effectively interesting if they can be stabilized soon after their formation in such a way that they can be manipulated in the colloidal state. This aspect has been poorly investigated so far with the exception of work carried out by the group of Stucky and Wong.[23] Their approach consisted first in forming globally neutral complexes of poly-L-Lysine (PLL) and citrate coated gold particles in the vicinity of the IEP and then, to stabilize them by adding an excess of anionic silica particles. *In fine*, the stabilized complexes have a spherical vesicle structure with a water-filled core and a two-part shell. The inner part of the shell consists mainly of gold and PLL while the outer part is mainly composed of silica particles. The final vesicle structure is therefore different from the initial fractal structure. The mechanism of reorganization following the addition of the silica particles has not been clearly established. Following this seminal study, neutral complexes of different natures (i.e. polycation/polyanion,[24] multivalent ion/polyelectrolyte[25–27]) were stabilized by the subsequent addition of nanoparticles[24–26] or antibody molecules[27] always leading to the same type of vesicle structures.

The objective of the present work is to stabilise electrostatic complexes of PELs and nanoparticles formed at the IEP by the subsequent addition of PEL chains. To our knowledge, this possibility has never been reported so far. As a case study, we considered classical citrate coated gold nanoparticles of different sizes and linear PELs chains of natural origin which were quaternized chitosan (i.e. polycation, noted QC) and hyaluronic acid (i.e. polyanion, noted HA). We have systematically characterized the size, structure and optical properties of the PEL/particles assemblies by performing dynamic light scattering (DLS), small-angle X-ray scattering (SAXS), cryogenic transmission electronic microscopy (cryo-TEM) observations and UV-Vis.-NIR spectroscopy measurements. Our main result is that globally neutral aggregates could be stabilized at a nanometric size by the subsequent addition of PEL chains. This stabilisation is demonstrated in saline environment on a broad pH range as well as in a cell culture media over periods of several days. Contrarily to particle-stabilized complexes developped by Stucky and Wong, PEL-stabilized complexes are found to retain their initial characteristics (i.e. shape, size, internal structure and optical properties) after stabilization. Furthermore, the charge of the stabilizing chains determines the global charge of the stabilized complexes which offers interesting possibilities of post-functionalization. We believe that the

stabilization mechanism is based on the adsorption of stabilizing chains on oppositelly charged domains on the surface of the globally neutral aggregates.

2. Results and discussion

Our basal methodology consists of forming globally neutral complexes of QC chains (i.e. linear polycation) and citrate coated AuNP (i.e. spherical polyanion) and then injecting a QC solution to stop the growth of the aggregates as illustrated in scheme 1. These 2 stages will be called 'coupling' and 'quenching' stage respectively afterwards.



Scheme 1. Schematic illustration of the methodology used for the stabilisation of globally neutral aggregates composed of quaternized chitosan (QC) and citrate coated gold nanoparticles (AuNP).

2.1 Complexation between AuNPs and quaternized chitosan.

The coupling has been realized by equivolumic mixing of AuNP with radius R ≈ 11.5nm (Figure 1 of Supporting Information (SI)) and QC with Lc ≈ 1 µm (Figure 2 of SI) in milliQ water at pH ≈ 6.5. The AuNP concentration has been fixed at 1.3×10^{12} NP/mL while the QC concentration has been varied, staying in the diluted regime, to cover 4 decades of molar ratio, noted $\chi = n_{PEL} / n_{AuNP}$, with $35\times10^{-3} \leq \chi \leq 35$.

QC-AuNPs assemblies were first studied by DLS (Figure 1a) and laser Doppler electrophoresis (Figure 1b). We detected finite size assemblies with negative or positive global charge 2 min after mixing at low and high molar ratio, respectively:

- for $\chi \leq 14\times10^{-2}$: $\mu \approx -2.8 \times 10^{-8}$ $m^2V^{-1}s^{-1}$ and R_H = 34.7 nm;
- for $\chi \geq 7\times10^{-1}$: $\mu \approx 1.2 \times 10^{-8}$ $m^2V^{-1}s^{-1}$ and R_H = 34.7 nm.

Contrary to previous results obtained at pH = 3 with non-quaternized chitosan chains, these overcharged complexes show good colloidal stability for 24 h. The measured isoelectric point corresponds to $\chi^* \sim 28\times10^{-2}$. As expected, the globally neutral assemblies obtained around χ^* grow rapidly to form micrometric structures that completely sedimented after few hours. We estimate that χ^* corresponds to a charge ratio, $\left({}^{n_+}/_{n_-}\right)_{Structure} \approx 0.2$, using the structural charges (i.e. ~ 1736 e/chain and ~ 3324 e/NP with 2e/nm² [28]). The same calculation taking into account the effective charges including the effect of the condensed counterions (i.e. ~ 1438 e/chain and ~ 66 e/NP [29]) would be equal to $\left({}^{n_+}/_{n_-}\right)_{Effective} \approx 6.1$. It appears that the measured value of χ^* is in fairly good agreement with the calculations within the uncertainties and considering that the measured χ^* may result from a partial compensation of the charges on a local scale whereas the measured electrophoretic mobility is zero.

The structure of the complexes was then studied by SAXS (Figure 1b). All the curves superimpose at $q \geq 0.06$ Å^{-1} showing that the structure and concentration of the scatterers is similar at this scale. Indeed, the particle concentration is constant while the contribution of QCs to scattering is much lower than that of AuNPs. This part of the curves is thus well described by the form factor of polydisperse spheres with R ≈ 11.5 nm in accordance with TEM images (Figure S1). The curves differ for $q < 0.06$ Å^{-1}. At low χ, the curves tend towards a plateau following the form factor of isolated spheres. This shows that the signal is probably dominated by AuNPs in excess, i.e. not involved in the assemblies. Around χ^*(i.e. for $\chi = 0.35$ and 0.7), I(q) increases as a power law with an exponent ~ 2 corresponding to the average mass fractal dimension (d_f) expected for random branched structures. At low q, the curves do not reach the Guinier regime which indicates that the complexes are larger than 300 nm in agreement with DLS. In excess of QC (i.e. $\chi \geq 0.1$), d_f stabilizes at about 2 without detectable contribution from free QC chains in excess. Furthermore, it can be noted that the size of the objects decreases, keeping their structure, in excess of NP ($\chi = 0.025$) and QC ($\chi = 6.2$) with overlapping curves. Overall, the evolution of d_f with χ has a bell shape with a maximum around χ^* (Figure 1e).

This structural study was completed by observing QC-AuNPs assemblies obtained 2 min after mixing at selected χ by cryoTEM (Figure S3). Additional images are shown in the figure S3 of SI. At χ^*, all particles are involved in large aggregates with an average aggregation number, $N_{Agg} \approx 83$, and a branched structure compatible with $d_f \sim 2$. Interestingly, the assemblies obtained on both sides from χ^*, at $\chi = 14\times10^{-2}$ and $\chi = 7\times10^{-1}$, are small (i.e. $N_{Ag.} \approx 4$) and polydisperse. These samples differ by the presence of individual AuNP for $\chi < \chi^*$.

Interestingly, PEL chains were never detected because of their low concentration and low electronic contrast compared to AuNPs. In addition, the particles appears to be close together whatever the value of χ. However we underline the difficulty to measure the distance accurately due to the fragility of the ice with respect to the electron beam and the three-dimensional nature of the aggregates.

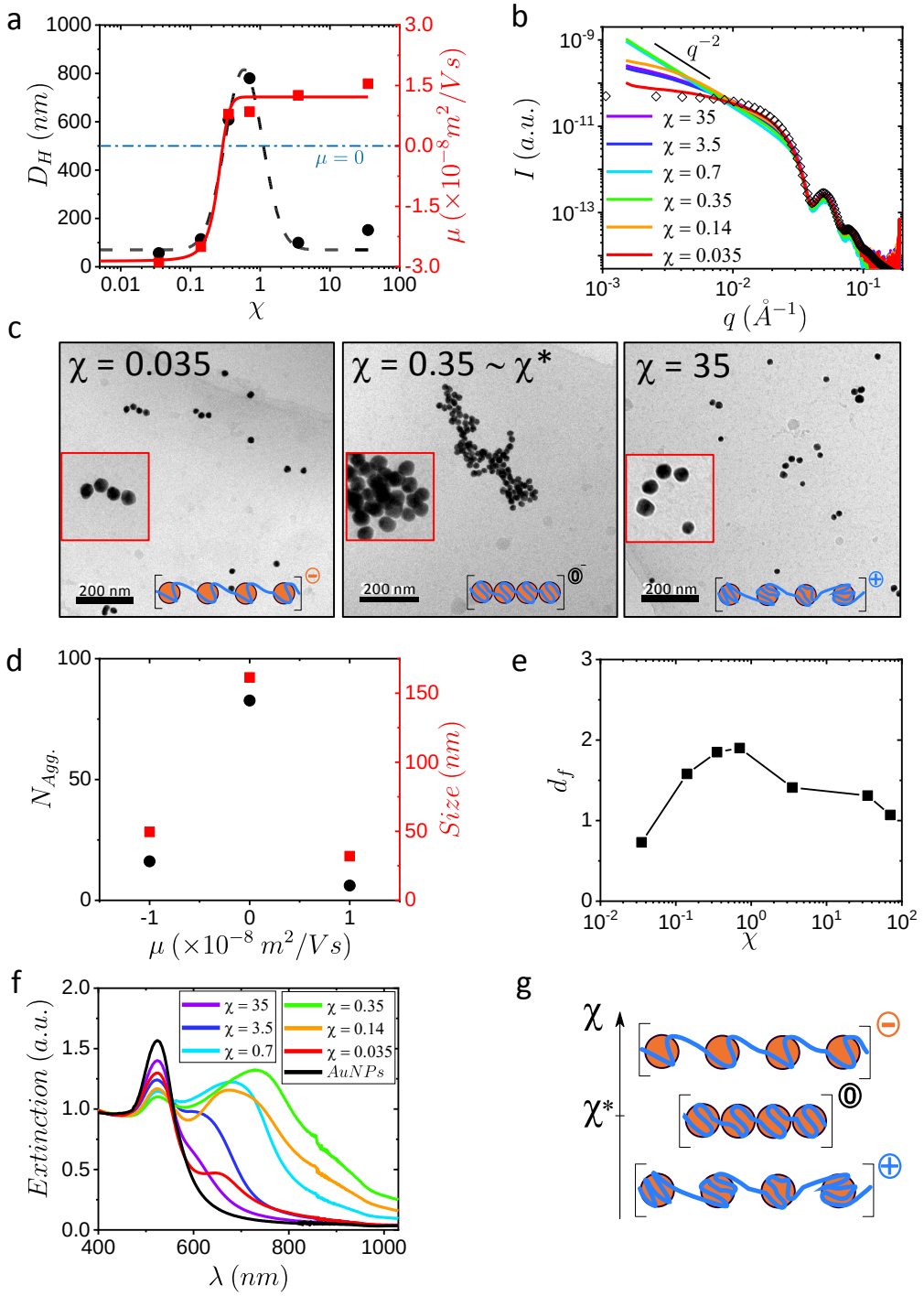


Figure 1. Characterizations of QC/ AuNP assemblies ~2 min after formation. (a) Evolution of the electrophoretic mobility (μ, red square) and hydrodynamic diameter (D_H, black disc) versus the QC/AuNP molar ratio (χ). Lines are guides for the eye. (b) log-log plots of the SAXS data obtained for different values of χ. The black diamonds represent the form factor of spheres with a log. normal polydispersity (R = 11.5 nm; PDI = 0.1). (c) CryoTEM images obtained for three values of χ (i.e. 0.035, 0,35 and 35) corresponding to assemblies with negative, neutral and positive global charges. Enlargements are shown in inset. Additional cryo-TEM images are shown in figure S3. (d) Evolution of averaged aggregation number ($N_{Agg.}$, black disc) and size (red square) determined by analysis of the cryoTEM images for assemblies with different electrophoretic mobilities. (e) Averaged mass fractal dimension (d_f) vs. χ. d_f has been determined by fitting the curves shown in figure 1b for $q < 0.025$ $Å^{-1}$. (f) UV-Vis.-NIR spectra obtained for different values of χ indicated on the plot. (g) Tentative representation of the assemblies with different global charges inspired by [10].

We performed UV−Vis.-NIR spectroscopy (Figure 1f) to shed light indirectly on the interparticle distance through the eventual detection of a collective absorption band arising from plasmonic coupling between adjacent particles. Overall, the complexation leads to a widening of the localized surface plasmon resonance (LSPR) band of individual AuNPs of around 525 nm when χ goes toward χ* but staying within the range where finite size aggregates have been detected by DLS. Around χ*, a second SPR band grows around 600 nm at the expense of the primary LSPR band. We analyze these results by considering that the presence of a secondary SPR band with a maximum at λ ~ 730 nm results from plasmon delocalization on the different particles of a given complex. Considering that the aggregates have almost the same internal structure whatever χ (Figures 1b , 1d, and S3), we believe that plasmon coupling is favored around χ* due to a smaller interparticle distance and to a higher aggregation number. This is supported by numerical simulations showing the dependence of the absorption cross-section with these two parameters for fractal aggregates of gold particles.[30]

To clarify the global picture that emerges from this first part we used the comprehensive representation introduced by Nguyen and Shklovskii [10]. At low χ, the complexes are nano-sized negatively charged aggregates with a weak plasmon coupling. One can imagine that the QC wrap around the particles so as to keep a locally negative charge after adsorption and an interparticle distance too large to allow a significant plasmonic coupling. On the other hand, high χ complexes, are nano-sized positively charged aggregates with low plasmon coupling. The local arrangement of the particles is comparable to the one observed previously, but the amount of QC/AuNP must be more important to allow a charge inversion of the particles. Around χ*, the globally neutral complexes are denser and exhibit collective plasmon band. In the following section we describe the method developped to stabilise these neutral aggregates by a second addition of PEL.

2.2 Stabilization of globally neutral complexes with long PEL chains.

We followed the dynamic of phase separation taking place around χ^* by means of UV−Vis.-NIR spectroscopy (Figure 2a). In the absence of quenching agents and mixing the relative absorbance at 400 nm decreases sharply after a characteristic time (t*) of about 40 min. At this time, large aggregates are formed and settle rapidly. Most of particles and QC chains are visibly concentrated at the bottom of the cuve after ~ 2 h. This fast kinetic is not surprising if one considers that aggregates comprising ~ 70 particles of an element as dense as gold are already formed 2 min after mixing (Figure 1d-e). We then studied the effect of the subsequent addition of PEL (i.e. quenching agent) on this phase separation process by adding 1 mL of QC at different concentrations to a dispersion of neutral aggregates (V = 3 mL, [NP] = 6.8×10^{11} NPs.mL^{-1}) prepared a few seconds before. The main effect is an increase in the characteristic time (t*) with a relationship of the type $t^* \propto \sqrt{[\mathrm{QC}]}$. At the same time the overall electrophoretic mobility of the samples becomes positive as soon as QC is added to the medium and increases in a monotonic manner with the addition of QC. We did not make measurements above 5 g/L because the samples become too viscous and difficult to handle (i.e. problem of homogeneity, bubble formation). However, if we refer to past studies[31] we can anticipate that at higher concentrations the phase separation process should be arrested without detectable sedimentation due to aggregate trapping in the 3D polymer network.

In the following, we will focus on the intermediate condition of quenching with $[\mathrm{QC}]_{\mathrm{Quench}}$ ≈ 0.5 g/L. In this concentration domain, the samples have a viscosity close to water and remain homogeneous for several hours (Video 1 in SI). Aggregates start to visibly settle down for times longer than one day (i.e. t* ~ 38 h). We emphasize that this evolution is different from a flocculation, a coacervation or a precipitation. Indeed, gentle hand mixing allows to reform an homogeneous sample with the same characteristics (UV-Vis, DLS, SAXS) as those obtained 2 min after mixing (Figure 2b-f). Individual gold particles also settle down on this time scale when their size is greater than 100 nm due to the density of gold.[32] DLS measurements show that quenched aggregates behave like the neutral aggregates characterized just before the quenching (Figure 2c) while cryo-TEM observations reveal a conservation of the size distribution. The UV-Vis-NIR spectra (Figure 2b) are also similar before and after quenching suggesting a conservation of the aggregate structure in agreement with SAXS measurements (Figure 2e) and cryo-TEM images (Figure 2f-S4). The aggregates obtained after quenching are

positively charged (Figure 2d) with an electrophoretic mobility close to that of the aggregates prepared by direct coupling above χ*.

In a second step, we studied the influence of a semi-flexible polyanion on the dynamic of AuNP/QC phase separation around χ*. As a case study, we chose hyaluronic acid, noted HA, with Mw ≈ 177000 g/mol. We observed the same type of concentration-dependent behaviour as that observed with QC. Working at intermediate HA concentration, around 0.5 g/L, one could stabilise nanoscale aggregates (Figure 2c) without structural (Figure 2e-f,S4) or optical (Figure 2e) modification by giving them an overall negative charge (Figure 2d).

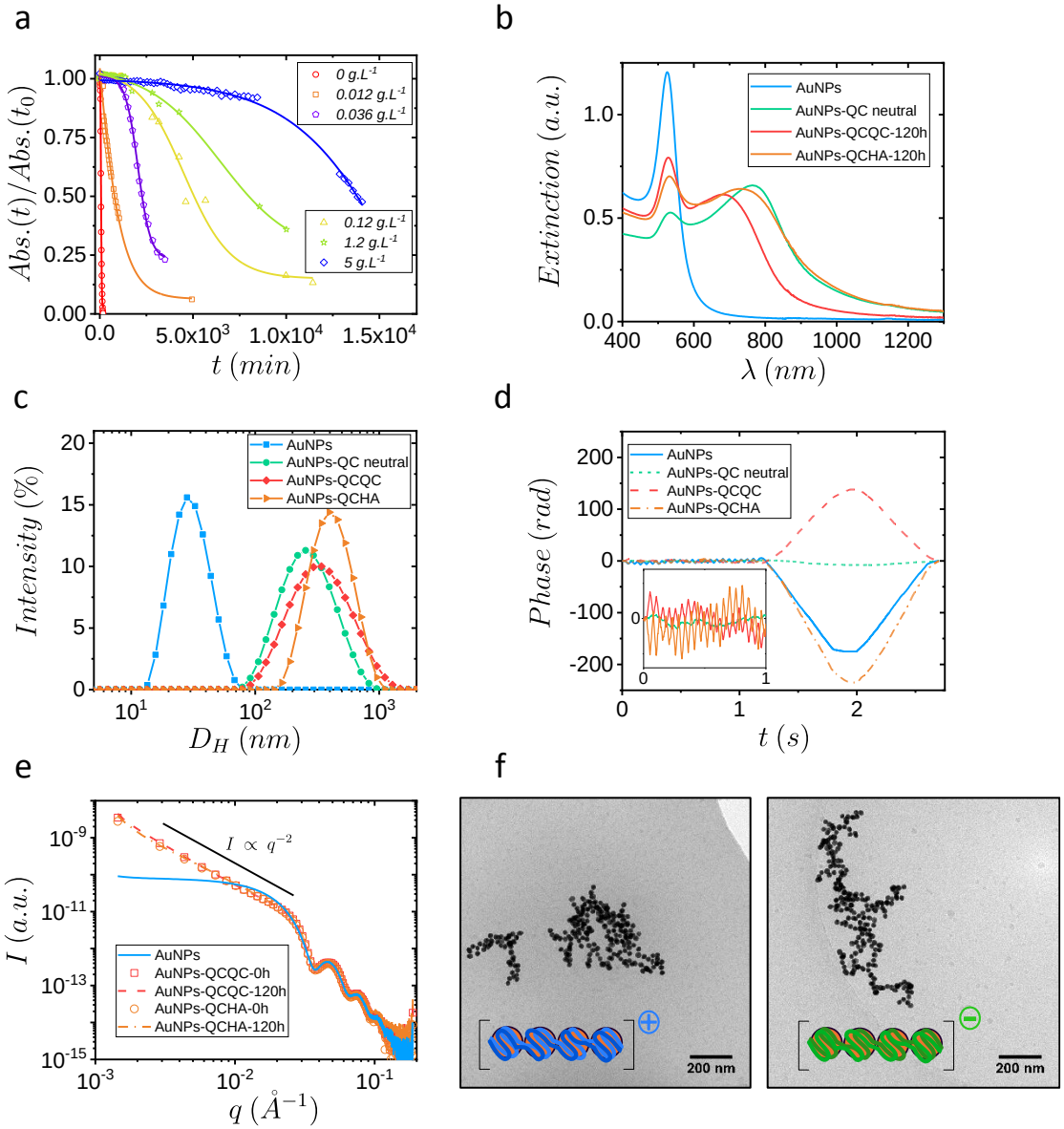


Figure 2. Characterizations of QC/AuNP electrostatic assemblies prepared at χ^* and then stabilized, by quenching, using either QC or hyaluronic acid (HA). (a) Temporal evolution of the relative absorbance ($Abs.(t)/Abs.(t_{30s})$) determined at λ = 400 nm for stabilized and non-stabilized samples. (b) UV-Vis.-NIR spectra obtained for stabilized and non-stabilized samples 2 min and 120 h after coupling. (c) Intensity weighted distribution of hydrodynamic diameters determined for stabilized and non-stabilized samples 2 min after mixing. (d) Temporal evolution of the phase during electrophoretic mobility measurements for electric field oscillating at 20 Hz (Time < 1.2 s) and then 0.2 Hz (Time > 1.2 s). The inset is an enlargement of the phase evolution during the first second. (e) SAXS curves obtained for stabilized and non-stabilized samples 2 min and 120 h after coupling. (f) Typical cryoTEM images obtained after quenching with QC or HA. Complementary cryoTEM images are shown in figure S4.

Although we cannot directly characterize the conformation of PEL chains on the surface of particles and aggregates without denaturing the system, the different results allow us to propose the following mechanism of stabilisation. At χ^*, the complexes are globally neutral but the particles constituting these complexes should be covered with an unsaturated layer of PEL so that the surface has both positive and negative charges. The presence of these domains allows the absorption, by electrostatic interaction, of additional PEL chains (i.e. cationic or anionic), until an homogeneous surface charge is established. Thus, as shown in figure 2, the progressive addition of PEL on neutral complexes leads to a progressive increase of the charge of the complexes (i.e. the electrophoretic mobility increases while the size does not change) until they are stabilised against aggregation by electrostatic repulsion.

In summary, we showed that the aggregation process occuring around χ^* could be arrested by the addition of long PEL chains and could lead to a dispersion of nanometric aggregates with a good colloidal stability. These aggregates have the size, structure and optical properties of the initial neutral aggregates while the charge is set by the nature of the quenching agent which can be cationic or anionic regardless of the coupling agent.

2.3 Colloidal stability of quenched aggregates.

To appreciate the robustness and applicative interest of the stabilisation process we studied the stability of quenched aggregates in different medias (Figure 3). First, we have investigated the influence of dilution in milliQ water by means of SAXS measurements (Figure 3a). In contrast with DLS and UV-Vis spectroscopy, the high sensitivity of SAXS allowed us to detect the structural signature of the aggregates even after dilution by a factor 50. It appeared that the scattering pattern normalized by the particle concentration are superimposed over a period of 5 days if one gently shake the samples aged over two hours to counterbalance the gravity driven sedimentation mentioned in section 2.2. This means that the average structure of the aggregates and their colloidal stability are not affected by dilution. Then, we investigated the influence of

ionic strength. As shown in figure 3b, the dispersion of quenched aggregates in saline water have no effect on the scattering patterns over a period of 3 days for NaCl concentrations up to 0.15 M. We point out that, contrary to our expectations, the dispersion of the aggregates in a saline environment does not increase the fractal dimension of the aggregates. This result agrees with spectrocopic measurements which did not show any variation of the optical spectra with the salt concentration. These results suggest that the particle assembly is quite rigid. We also showed that the stability of the aggregates was maintained for 3 days at acidic pH whatever the coating (Figure 3c).

To make a further step towards complexity we considered the dispersion of quenched aggregates in RPMI cell culture media supplemented with 10 % of fetal bovine serum (FBS). Remarkably, we observed different behaviours depending on the sign of the surface charge of the aggregates (Figure 3d). Indeed, the positively charged aggregates obtained with QC as quenching agent, present a lower colloidal stability than the negatively charged aggregates prepared with HA. The size and structure of the aggregates, seen by SAXS at t_0, being roughly the same, it suggests that the nature of the adsorbed proteins and/or their conformation at the aggregate's surface varies with the charge of the polymer covering the aggregates. Such influence of surface charge on the nature and dynamics of protein corona formation has been demonstrated in various studies using cationic or anionic gold particles dispersed in different types of culture media.[33,34]

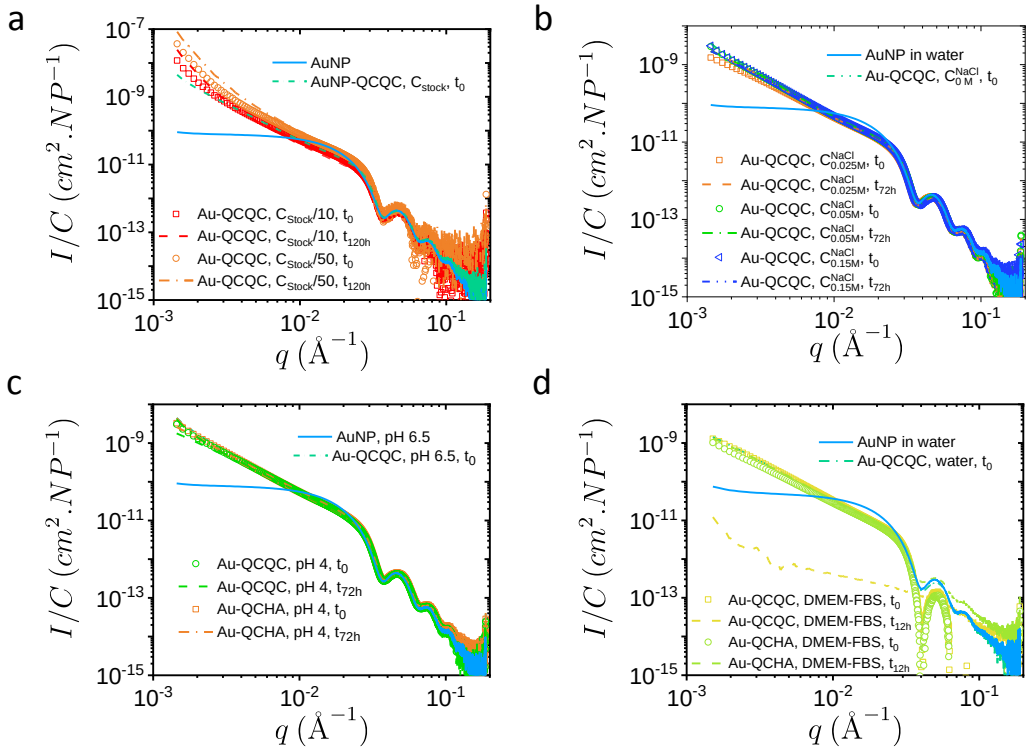


Figure 3. SAXS characterizations of quenched aggregates (Au-QCQC or Au-QCHA) at different times after dispersion in different media. (a) Dilution in milliQ water by a factor 1 (i.e. no dilution), 10 and 50. (b) Dilution by a factor two in NaCl aqueous solutions with NaCl concentration (C^{NaCl}) ranging from 0 to 0.15 M. (c) Dilution by a factor two in NaCl aqueous solutions with NaCl concentration (C^{NaCl}) ranging from 0 to 0.15 M. (d) Dilution by a factor two in acid (pH 3, H_2O-HCl) or basic media (pH 12, H_2O-NaOH). (d) Dilution by a factor two in DMEM-FBS (10 %) media without phenol red. After 12 h all samples were gently shaken 5 min before measurement to counterbalance the gravity driven sedimentation mentioned in section 2.2.

3. Conclusions

In this article we show that electrostatic complexes of polylectrolytes (PEL) and nanoparticles formed at the isoelectric point could be stabilized by the subsequent addition of long polyelectrolyte chains. The colloidal stabilisation is demonstrated by using polylectrolyte chains of biological origin and gold nanoparticles in saline environments, at different pH, as well as in cell culture media over periods of several days. Contrarily to protocols developed in the past to stabilize globally neutral complexes by adding nanoparticles, PEL-stabilized complexes are found to retain their initial characteristics/properties (i.e. shape, size, internal structure and optical properties) after stabilization. Thus, the plasmonic coupling is maximized in the case of PEL-stabilized neutral complexes compared to electrostatic complexes formed by direct mixing at a similar charge stoichiometry far from the IEP.

Furthermore, the charge of the stabilizing chains (i.e. polyanions or polycations) determines the global charge of the stabilized complexes whatever the charge of the

polylectrolyte used to form the globally neutral complex. We believe that this approach provide new opportunities to master “flocculation assembly” by allowing the formation of finite size assemblies in which the inter-particle distance is minimal and the surface chemistry is adjustable.

Experimental Section

Materials. Gold (III) chloride trihydrate ($HAuCl_4.3H_2O$, > 99.99 %), trisodium citrate dihydrate ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$, ≥ 99 %), acetone (C_3H_6O, 99.5 %), chitosan ($C_8H_{13}NO_5$, degree of N-deacetylation ~ 75 %, M_w ~ 310-375 kg/mol according to the supplier and ~ 380 kg/mol after SEC measurement) were purchased from Sigma-Aldrich. Glycidyltrimethylammonium chloride, noted GTMAC ($C_6H_{14}ClNO$, 80 wt% in water) was purchased from Tokyo Chemical Industry. Sodium hyaluronate from bacterial fermentation ($C_{14}H_{20}NO_{11}Na$, M_w ~ 177 kg/mol according to SEC measurement) was provided under the name BASHYAL by Soliance (Givaudant SA). All solutions were prepared with milliQ water (R = 18.2 MΩ).

Gold Nanoparticles (AuNPs) synthesis. Citrate stabilized gold nanoparticles were first synthesized by seeded growth protocol proposed by N.G. Basteús *et al.* .[35] All the content of a gold salt powder was used at the first opening to prepare, using a glass spatula, a stock at 10 g/L that was stored for period not exceeding 3 months in dark. All glassware and teflon-coated magnetic bars were washed thoroughly with freshly prepared aqua regia and rinsed with milliQ water after each synthesis. Briefly, 97 mg of citrates (0.33 mmol) were put in 150 mL of water (2.2 mM solution) and refluxed for 15min, before adding 1 mL of a 10 g/L solution of $HAuCl_4.3H_2O$.[36] The solution was kept on reflux for 10 min, then the heating was slowly cooled down to 90 °C. The seeds had their size increased by repeating several growing cycles as followed: 55 mL of the solution were withdrawn, followed by the addition of 53 mL of water and 1 mL of a 60 mM citrates solution. As soon as the temperature reached 90 °C again, 1 mL of $HAuCl_4$ were added and the solution was stirred for 30 min. Then, 1 mL of $HAuCl_4$ were added and the solution was stirred again for 30 min. These growing cycles were repeated up to the desired size of AuNPs. Typically, 4 cycles were required to obtain particles with an diameter D_H ~ 22 nm. Between the seeds and the fourth cycle, theoretical gold nanoparticles concentration varies from 3.0×10^{12} NPs/mL to 4.8×10^{11} NPs/mL. The characterizations of the nanoparticles used in this study are presented in figure S1 of the supporting information (SI).

Chitosan quaternization. Quaternized chitosan (QC) was synthetized in aqueous medium by ring opening between the chitosan's primary amine and the epoxy cycle of glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC). The protocol was adapted from literature.[37–40]

In a 250 mL two necked round bottom flask, 6 g of chitosan powder (see Materials section) was dispersed in 60 mL of milliQ water at 85 °C at reflux with a heating mantle during 2 hours leading to a suspension of partially solubilized chitosan (pH ≈ 6.5). 6.20 mL of glycidyltrimethylammonium chloride, noted GTMAC, was then added three times every two hours. The viscous yellow mixture was kept under magnetic stirring at 800 rpm during ~ 10 h. The polymer was 'precipitated' adding an excess of acetone and washed with acetone several times. After drying in oven at 60°C during two days one typically recovers 16 g of the polymer in the form of a yellow vitreous solid. It was then purified by dispersion in milliQ water at pH 6.5 and dialysed (cutoff ~ 14 kda) against milliQ water during four days to eliminate unreacted GTMAC. The water was changed every three hours. One finally recovers quaternized chitosan (QC) after freeze drying (~ 24 h).

Substitution degree (SD) was determined by conductimetric titration of chloride (23.4 mg of quaternized chitosan) with silver nitrate (0.01 M) and expressed as a percentage of the initial number of deacetylated groups. As shown in Figure S2, SD could be varied between 74 % and 104 % by modifiying the GTMAC/chitosan molar ratio between 2:1 and 4.5:1 in qualitative agreement with previous studies. We point out that SD could exceed 100% due to the occurance of different reactions such as (i) a second reaction with the amine or (ii) a reaction between GTMAC and hydroxy groups. All the experiments presented in the article were carried out with the same batch of QC with a SD = 104 %. These chains are fully soluble in water at pH 6.5 and present an electrophoretic mobility, μ = + 4.7 μmcm/Vs. The characterizations of the polymers are presented together with polymer-specific characterization methods in the SI.

Name	**Acronym**	M_w^{PEL} **g/mole**	$M_w^{monomer}$ **g/mole**	L_c **nm**	**σ e/nm**
Chitosan	C	**357000**	**166**	**1075**	**1.5**
Sodium Hyaluronate	HA	**177000**	**401**	**441**	**1**

Table 1. Main characteristics of the polyelectrolytes (PEL) used in this study with their acronym: mass averaged molecular mass of the PEL (M_w^{PEL}) determined by size exclusion chromatography, molecular mass of the monomer ($M_w^{Monomer}$) contour length (L_c), structural linear charge density (σ). L_c and σ were calculated assuming a monomer size of 5 Å and 10 Å for C and HA respectively. The chitosan described in the table is the one on which the quaternization was performed.

Particles self-assembly. AuNPs and PELs solutions were prepared separately in milliQ water and mixed together at 50 : 50 volume ratio. Gold nanoparticles concentration remains constant for each mixtures, the concentration in polymer varies in order to obtain severals molar ratio $\chi = {}^{n_{polymer}}/_{n_{AuNPs}}$ ($35*10^{-4} < \chi < 35$). Mixtures were mixed 3s with a vortex to ensure homogenization and then characterized in UV-Vis, DLS and electrophoretic mobility.

Methods.

Dynamic light scattering (DLS) experiments were carried out with a NanoZS apparatus (Malvern Instrument) operating at $\lambda = 632.8$ nm and $P \leq 4$ mW. The fluctuations of the scattered intensity with time, noted I(q,t), was measured at fixed angle $\Theta = 173$ ° or, equivalently, at a given scattering wave vector whose norm is $q = (4\pi n/\lambda)\sin(\theta/2)$ with n the solvant refractive index. These fluctuations reflect the brownian motion of the scattering objects. I(q,t) is first transformed into the normalized time auto-correlation function of the scattered intensity: $g^{(2)}$ (q,t). For a diffusive process, $g^{(2)}(q,t) \sim e^{-2qDt}$ with D the mutual diffusion coefficient. The hydrodynamic radius, R_H, of the brownian objects is determined with the Stokes–Einstein relation. The size distribution was derived from the inverse Laplace transform of the correlation function approximated with the CONTIN algorithm.

Laser Doppler velocimetry. Electrophoretic mobility (μ) was measured with a NanoZS apparatus (Malvern Instrument). This set-up operates with an electrical field of 25 $V.cm^{-1}$ oscillating successively at 20 Hz and 0.7 Hz to reduce the electroosmosis effect due to the surface charge of the capillary cell. The particle' velocity was measured by LASER Doppler velocimetry.

Ultraviolet visible spectroscopy (UV-vis) was performed on Cary 50 Scan UV-Visible spectrophotometer (Varian). The 5 mm thickness Hellma cell (quartz) were filled in by the diluted AuNPs solutions. The absorbance values were recorded after baseline correction. `

Ultraviolet visible near-infrared absorption spectroscopy (UV-vis-NIR) measurements were performed on a Perkin Elmer Lambda 1050 spectrophotometer. 5 mm thickness Hellma cell (quartz) were filled in by the diluted AuNPs, QC and PEL. The diffuse transmission was measured by collecting the light exiting the sample using an integrating sphere (Perkin Elmer Accessory). Spectra were corrected from the quartz cell filled in with water.

Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) images were taken on an Ultrascan 1000, 2k x 2 k CCD camera (Gatan, USA), using a LaB_6 JEOL JEM 2100 (JEOL, Japan) cryo-microscope operating at 200 kV with a JEOL low dose system (Minimum Dose System, MDS) to protect the thin ice film from any irradiation before imaging and to reduce the irradiation during the image capture. The images were recorded at 93 K.

Small angle X-ray scattering (SAXS) experiments were performed on SWING beamline (SOLEIL synchrotron, Saint-Aubin, France) with a photon energy of 12 keV and a sample-to-detector (Eiger 4M) distance of 6 m leading to the following q-ranges: $0.0016 \leq q\ (Å^{-1}) \leq 0.23$. We recall that the norm of the scattering wave vector is $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$, where θ is the scattering angle and $\lambda = 1.033$ Å is the wavelength. Samples were inserted into cylindrical quartz capillaries of 1.5 mm diameter that were sealed and left vertical in the field of gravity. Typically, 10 successive frames of 0.5 s each were recorded and compared to check the absence of beam damage. The scattering patterns were always isotropic. Each frame was first angularly averaged over all frames and the pure solvent spectrum was subtracted.

Acknowledgements.

ANR (Agence Nationale de la Recherche) and CGI (Commissariat à l'Investissement d'Avenir) are gratefully acknowledged for their financial support of this work through Labex SEAM (Science and Engineering for Advanced Materials and devices). F.C. and F.V. thank the ANR Coligomere-18-CE0006 for funding. We are indebted to N. Sanson (Soft Matter Sciences and Engineering, ESPCI, PSL University, Sorbonne Université, CNRS) for his assistance during preliminary TOC measurements. We acknowledge the technopolym platform (Université de Toulouse III-Paul Sabatier) for SEC and TOC measurements. We also acknowledge synchrotron SOLEIL (SWING beam line, Saint-Aubin, France) for the SAXS beam time allocation.

References.

[1] BUNGENBERG DE JONG H G and KRUYT H R 1929 Coacervation (Partial miscibility on colloid systems) *PROCEEDINGS OF THE KONINKLIJKE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN TE AMSTERDAM* 849–56

[2] Pugh T L and Heller W 1960 Coagulation and stabilization of colloidal solutions with polyelectrolytes *Journal of Polymer Science* **47** 219–27

[3] Napper D H 1983 *Polymeric stabilization of colloidal dispersions* (London [usw.]: Acad. Pr)

[4] Schneider G and Decher G 2008 Functional Core/Shell Nanoparticles via Layer-by-Layer Assembly. Investigation of the Experimental Parameters for Controlling Particle Aggregation and for Enhancing Dispersion Stability *Langmuir* **24** 1778–89

[5] Spalla O and Cabane B 1993 Growth of colloidal aggregates through polymer bridging *Colloid & Polymer Science* **271** 357–71

[6] Spalla O 2002 Nanoparticle interactions with polymers and polyelectrolytes *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **7** 179–85

[7] Chapel J-P and Berret J-F 2012 Versatile electrostatic assembly of nanoparticles and polyelectrolytes: Coating, clustering and layer-by-layer processes *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **17** 97–105

[8] Netz R and Joanny J-F Complexation between a Semiflexible Polyelectrolyte and an Oppositely Charged Sphere

[9] Ulrich S, Laguecir A and Stoll S 2005 Complexation of a Weak Polyelectrolyte with a Charged Nanoparticle. Solution Properties and Polyelectrolyte Stiffness Influences *Macromolecules* **38** 8939–49

[10] Nguyen T T and Shklovskii B I 2001 Complexation of DNA with positive spheres: Phase diagram of charge inversion and reentrant condensation *The Journal of Chemical Physics* **115** 7298–308

[11] Keren K, Soen Y, Yoseph G B, Gilad R, Braun E, Sivan U and Talmon Y 2002 Microscopics of Complexation between Long DNA Molecules and Positively Charged Colloids *Physical Review Letters* **89**

[12] Zinchenko A A, Yoshikawa K and Baigl D 2005 Compaction of Single-Chain DNA by Histone-Inspired Nanoparticles *Physical Review Letters* **95**

[13] Shi L, Carn F, Boue F, Mosser G and Buhler E 2012 Nanorods of Well-Defined Length and Monodisperse Cross-Section Obtained from Electrostatic Complexation of Nanoparticles with a Semiflexible Biopolymer *Acs Macro Letters* **1** 857–61

[14] Shi L, Carn F, Boue F, Mosser G and Buhler E 2013 Control over the electrostatic self-assembly of nanoparticle semiflexible biopolyelectrolyte complexes *Soft Matter* **9** 5004–15

[15] Shi L, Buhler E, Boué F and Carn F 2015 Shape-Tailored Colloidal Molecules Obtained by Self-Assembly of Model Gold Nanoparticles with Flexible Polyelectrolyte *Langmuir* **31** 5731–7

[16] Lin M Y, Klein R, Lindsay H M, Weitz D A, Ball R C and Meakin P 1990 The structure of fractal colloidal aggregates of finite extent *Journal of Colloid and Interface Science* **137** 263–80

[17] Jullien R and Botet R 1987 *Aggregation and fractal aggregates* (Singapore: World Scientific)

[18] Shi L, Carn F, Boue F and Buhler E 2016 Role of the ratio of biopolyelectrolyte persistence length to nanoparticle size in the structural tuning of electrostatic complexes *Physical Review E* **94** 032504

[19] Jonsson M and Linse P 2001 Polyelectrolyte–macroion complexation. II. Effect of chain flexibility *The Journal of Chemical Physics* **115** 10975–85

[20] Shi L, Carn F, Goukassov A, Buhler E and Boué F 2020 Self-Induced Crystallization in Charged Gold Nanoparticle-Semiflexible Biopolyelectrolyte Complexes *Langmuir* **36** 7925–32

[21] Novotny L and Hecht B 2012 *Principles of nano-optics* (Cambridge: Cambridge Univ. Press)

[22] Baffou G, Cichos F and Quidant R 2020 Applications and challenges of thermoplasmonics *Nature Materials* **19** 946–58

[23] Murthy V S, Cha J N, Stucky G D and Wong M S 2004 Charge-Driven Flocculation of Poly(L -lysine)Gold Nanoparticle Assemblies Leading to Hollow Microspheres *Journal of the American Chemical Society* **126** 5292–9

[24] Murthy V S, Kadali S B and Wong M S 2009 Polyamine-Guided Synthesis of Anisotropic, Multicompartment Microparticles *ACS Applied Materials & Interfaces* **1** 590–6

[25] Plush S E, Woods M, Zhou Y-F, Kadali S B, Wong M S and Sherry A D 2009 Nanoassembled Capsules as Delivery Vehicles for Large Payloads of High Relaxivity Gd^{3+} Agents *Journal of the American Chemical Society* **131** 15918–23

[26] Rana R K, Murthy V S, Yu J and Wong M S 2005 Nanoparticle Self-Assembly of Hierarchically Ordered Microcapsule Structures *Advanced Materials* **17** 1145–50

[27] Yu J, Javier D, Yaseen M A, Nitin N, Richards-Kortum R, Anvari B and Wong M S 2010 Self-Assembly Synthesis, Tumor Cell Targeting, and Photothermal Capabilities of Antibody-Coated Indocyanine Green Nanocapsules *Journal of the American Chemical Society* **132** 1929–38

[28] Franco-Ulloa S, Tatulli G, Bore S L, Moglianetti M, Pompa P P, Cascella M and De Vivo M 2020 Dispersion state phase diagram of citrate-coated metallic nanoparticles in saline solutions *Nat Commun* **11** 5422

[29] Belloni L 1986 Electrostatic interactions in colloidal solutions: Comparison between primitive and one- component models *The Journal of Chemical Physics* **85** 519–26

[30] Khlebtsov B, Zharov V, Melnikov A, Tuchin V and Khlebtsov N 2006 Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters *Nanotechnology* **17** 5167–79

[31] Morfin I, Buhler E, Cousin F, Grillo I and Boué F 2011 Rodlike Complexes of a Polyelectrolyte (Hyaluronan) and a Protein (Lysozyme) Observed by SANS *Biomacromolecules* **12** 859–70

[32] Midelet J, El-Sagheer A H, Brown T, Kanaras A G and Werts M H V 2017 The Sedimentation of Colloidal Nanoparticles in Solution and Its Study Using Quantitative Digital Photography *Part. Part. Syst. Charact.* **34** 1700095

[33] Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh G J and Puntes V 2010 Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona *ACS Nano* **4** 3623–32

[34] Moore T L, Rodriguez-Lorenzo L, Hirsch V, Balog S, Urban D, Jud C, Rothen-Rutishauser B, Lattuada M and Petri-Fink A 2015 Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions *Chemical Society Reviews* **44** 6287–305

[35] Bastús N G, Comenge J and Puntes V 2011 Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening *Langmuir* **27** 11098–105

[36] Shi L, Buhler E, Boue F and Carn F 2017 How does the size of gold nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question *Journal of Colloid and Interface Science* **492** 191–8

[37] Gu P, Xu, Sui, Gou, Meng, Sun, Wang, Qi, Zhang, He and Tang 2012 Polymeric micelles based on poly(ethylene glycol) block poly(racemic amino acids) hybrid polypeptides: conformation-facilitated drug-loading behavior and potential application as effective anticancer drug carriers *International Journal of Nanomedicine* 109

[38] Sui B, Xu H, Jin J, Gou J, Liu J, Tang X, Zhang Y, Xu J, Zhang H and Jin X 2014 Self-Assembled Micelles Composed of Doxorubicin Conjugated Y-Shaped PEG-Poly(glutamic acid)2 Copolymers via Hydrazone Linkers *Molecules* **19** 11915–32

[39] Daly W H and Poché D 1988 The preparation of N-carboxyanhydrides of α-amino acids using bis(trichloromethyl)carbonate *Tetrahedron Letters* **29** 5859–62

[40] Moller K, Bein T and Fischer R X 1999 Synthesis of Ordered Mesoporous Methacrylate Hybrid Systems: Hosts for Molecular Polymer Composites *Chemistry of Materials* **11** 665–73

Supporting Information

Charge-Driven Arrested Phase-Separation of Polyelectrolyte-Gold Nanoparticle Assemblies Leading to Plasmonic Oligomers

F. Voisin,[1] G. Lelong,[2] J.M. Guigner,[2] T. Bizien,[3] J.M. Mallet,[4] and F. Carn[1*]

[1] Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, Université de Paris, CNRS, Paris, France.
[2] Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, UMR 7590, Sorbonne Université, CNRS, Paris, France.
[3] Synchrotron Soleil, Beamline SWING, Gif SurYvette, Cedex F-91192, France
[4] Laboratoire des Biomolécules, UMR 7203, École Normale Supérieure, PSL Research University, Sorbonne Universités, CNRS, Paris, France.

[*] E-mail : florent.carn@u-paris.fr

1. Synthesis and characterization gold nanoparticles

Citrate-stabilized gold nanoparticles were first synthesized in aqueous medium by seeded growth process. The nanoparticles, noted AuNPs have a final concentration of 1.3×10^{12} $NP.mL^{-1}$. DLS measurements revealed a single population of NPs with $R_{H\ (AuNPs)}$ = 11.5 nm (Figure S1a). As expected, such nanoparticles dispersed at pH = 6.5 were negatively charged with an averaged electrophoretic mobility μ = - $3{,}43.10^{-8}$ $m^2V^{-1}s^{-1}$ (Figure S1b), that can be related to a ζ -potential of - 42,6 mV according to the Debye−Hückel model. The as-obtained red dispersion displays a surface plasmon resonance (SPR) absorption band at 525 nm (Figure S1f). A more accurate determination of the size distribution was obtained by TEM and small angle X-Ray scattering (SAXS). The SAXS pattern obtained for a dilute dispersion of AuNPs (Figure 1d) was well fitted by the form factor P(q) of spheres with R = 11.5 nm. The slight intensity upturn observed at low q indicates the presence of small NP clusters. One can estimate an average aggregation number of two NPs/cluster by dividing the total scattered intensity by the form factor of individual NPs. Accordingly, TEM observations (Figures S1c) revealed isotropic nanoparticles R = 11.5 nm.

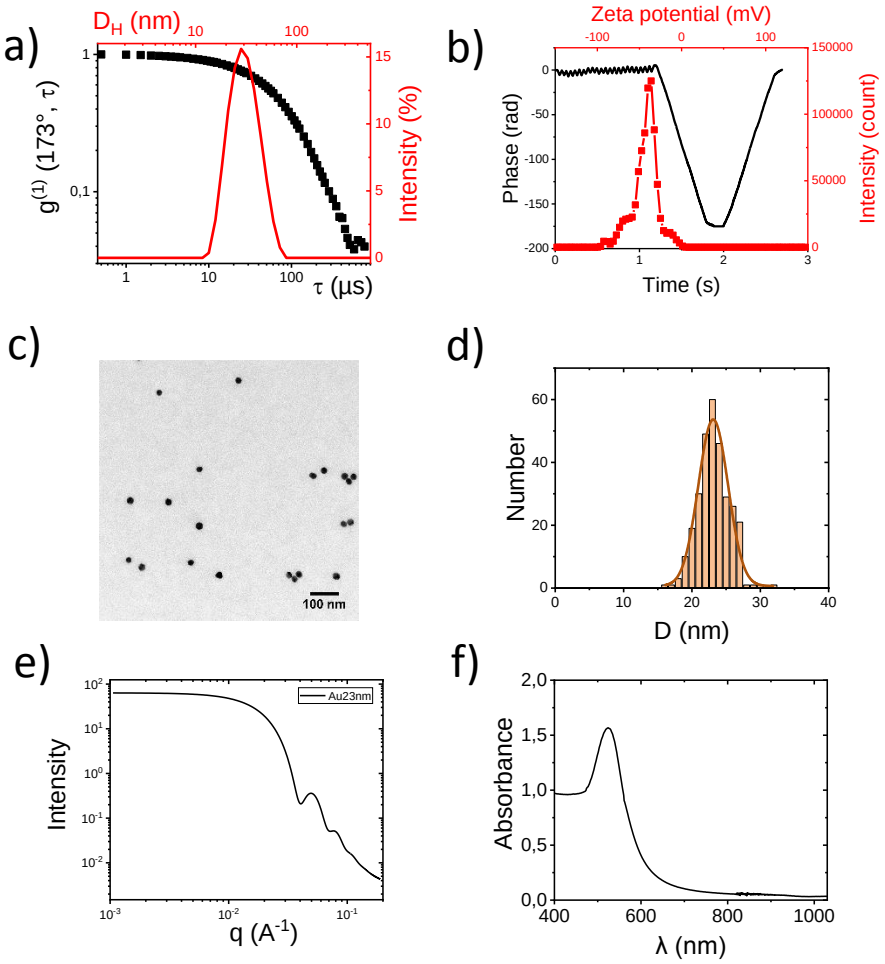


Figure S1. Optical and structural characterizations of citrate coated AuNPs. (a) Scattered electric field autocorrelation function $g^{(1)}$ (173°,t) and corresponding normalized distributions of the scattered intensity as a function of size by applying the Contin method to our data. (b) Time evolution of the phase for electric field oscillating at 20 Hz and 0.2 Hz. Corresponding distribution of electrophoretic mobility (µ). (c) TEM image (scale bar 100 nm). (d) corresponding histogram of size distribution. (e) SAXS fit curve of the data using the form factor calculated for a sphere. (f) UV−Vis. spectra

2. Characterizations of chitosan and quaternized chitosan (QC)

Details regarding the protocol used for chitosan quaternization are given in the main article.

a. Titration of the substitution degree by conductimetry

Chloride ions titration was performed with a conductimeter SevenMulti from METTLER TOLEDO equipped with a probe InLab® 731. Quaternized chitosan was dissolved in milliQ water and 200 µL of a $AgNO_3$ solution was added drop by drop.

b. Characterizations of QC aqueous solutions

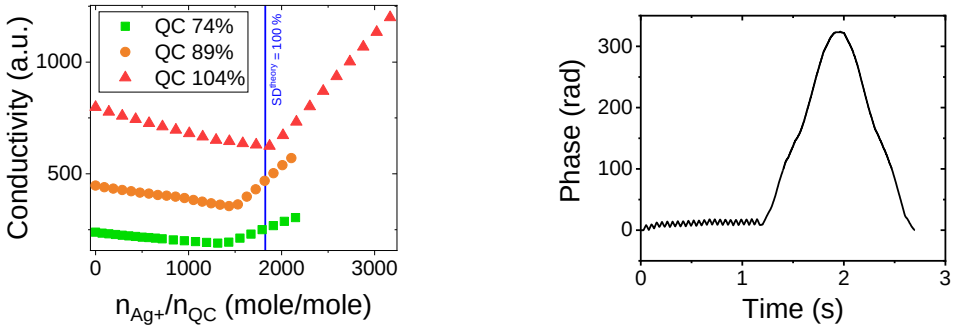


Figure S2. Characterizations of QC solubilized in milliQ water (pH 6.5). (a) Chloride ions titration curves obtained by conductimetry for GTMAC/chitosan molar ratio ranging between 2:1 and 4.5:1. The substitution degrees (SD) given in the inset correspond to the calculated values derived from the titration. The blue line represents the equivalence ratio corresponding to a substitution degree of 100%. (c) Temporal evolution of the phase during electrophoretic mobility measurements for electric field oscillating at 20 Hz (Time < 1.2 s) and then 0.2 Hz (Time > 1.2 s). The curve corresponds to an average electrophoretic mobility: µ = + 4.7 µmcm/Vs.

3. Complexation between AuNPs and quaternized chitosan

a. AuNPs/QC assemblies 2 min after formation without quench

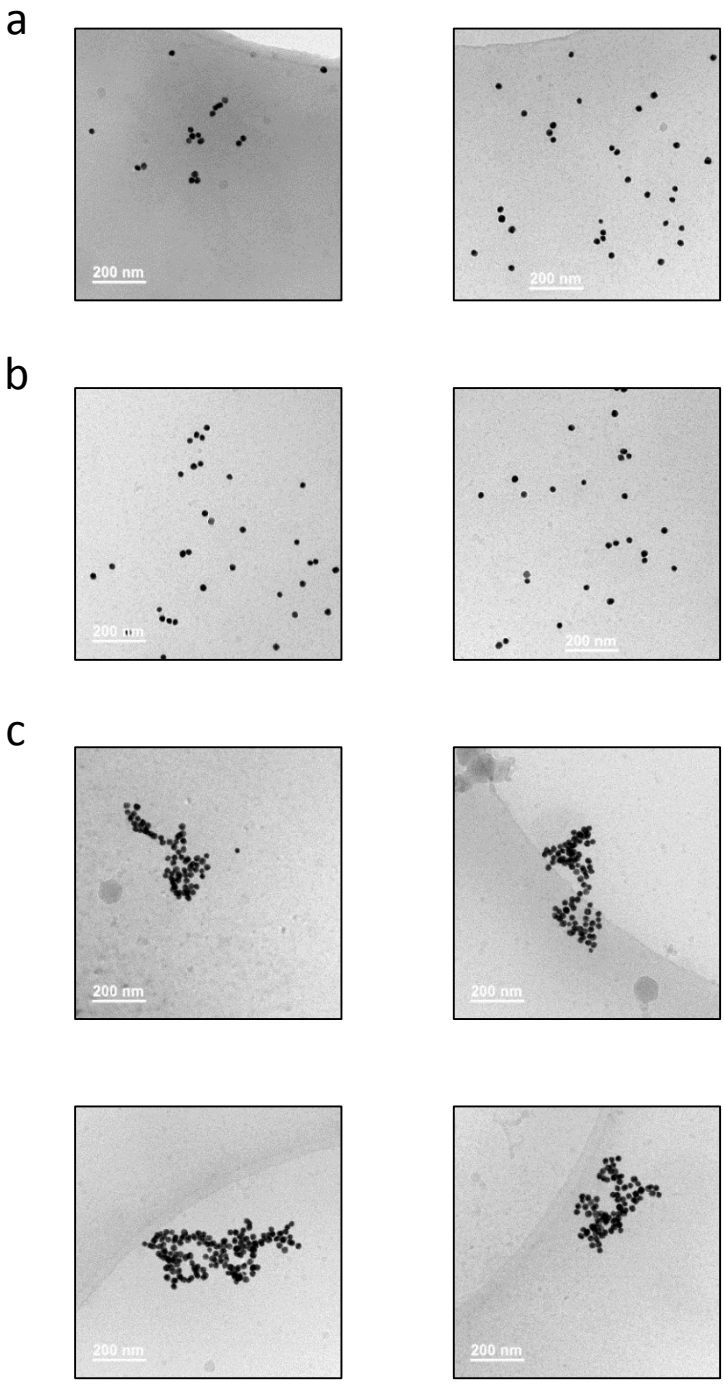


Figure S3. CryoTEM images of aggregates obtained (a) with an excess of AuNPs.(i.e. χ = 0.035) (b) with an excess QC (i.e. χ = 35) and (c) at charge neutrality.(i.e. $\chi = \chi^* = 0.35$).

b. AuNPs/QC assemblies quenched with QC or HA

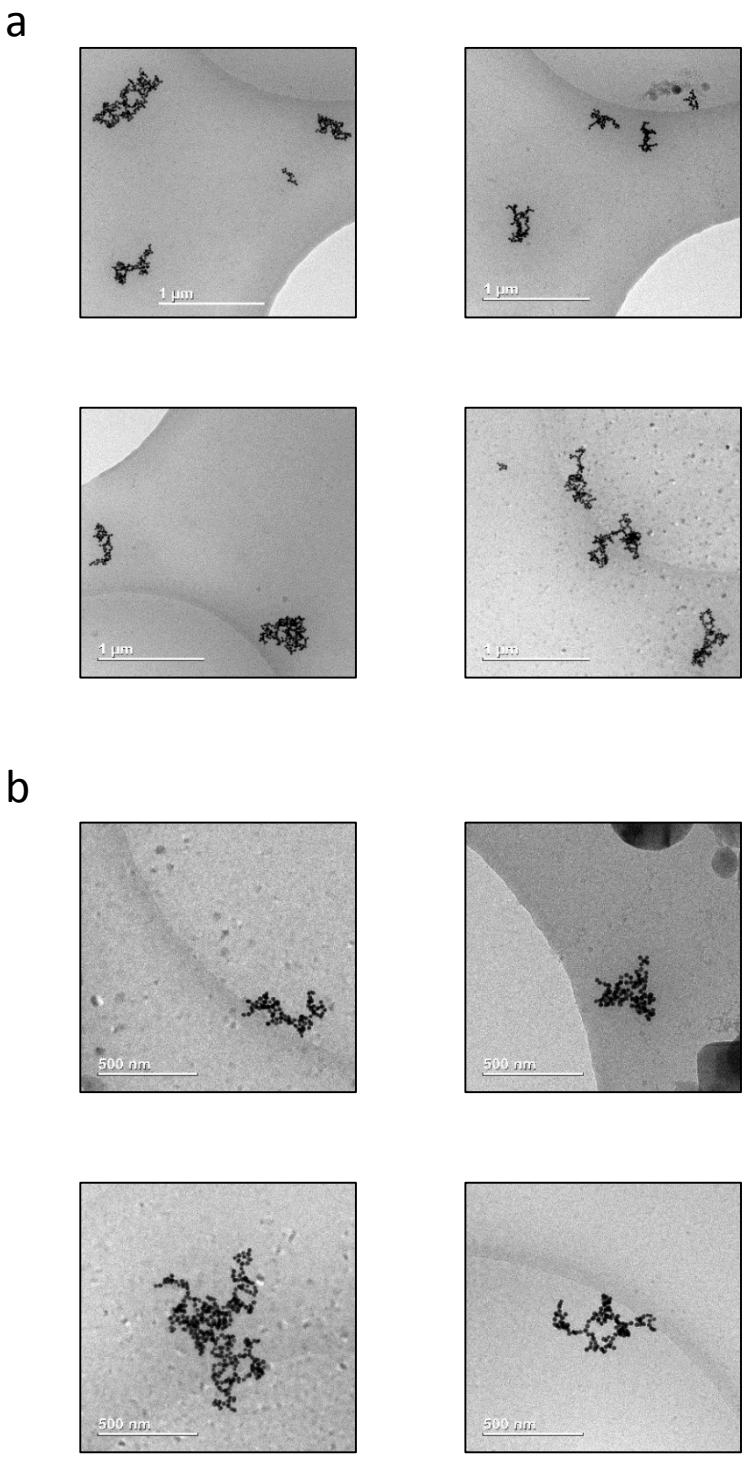


Figure S4. CryoTEM images of aggregates quenched (a) with QC or (b) with HA.

V) Caractérisations complémentaires

On évoquera dans ce paragraphe des résultats complémentaires concernant le mécanisme de stabilisation et la contribution du polymère stabilisant (i.e. quantité adsorbée, conformation à la surface). Ces résultats jugés peu concluants n'ont pas été mentionnés dans l'article mais nous avons choisi de les mentionner ici pour donner une vision complète du travail entrepris.

A priori, la stabilisation des agrégats peut résulter de deux mécanismes :

- Un premier mécanisme correspondrait au passage dans un régime semi-dilué suivant l'ajout de polymère stabilisant. Cette transition empêcherait, ou limiterait, l'agrégation des assemblages préformés en les piégeant dans le réseau de polymère (Figure III.15).

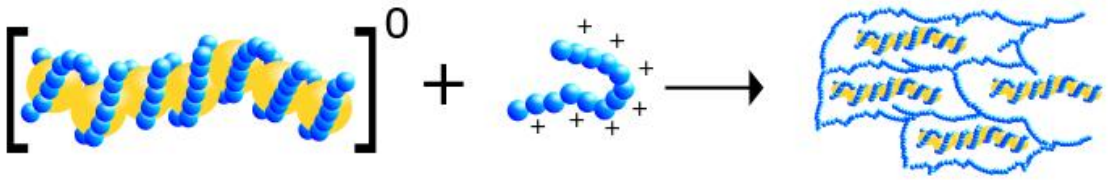


Figure III.15. Schéma du mécanisme de stabilisation d'agrégat neutre par passage dans le régime semi dilué.

- Le deuxième mécanisme mettrait en jeu l'adsorption du polymère stabilisant à la surface des assemblages neutres pour former des assemblages portant les charges du polymère stabilisant (Figure III.16). L'adsorption serait de nature électrostatique et impliquerait des zones chargées à la surface de l'assemblage globalement neutre.

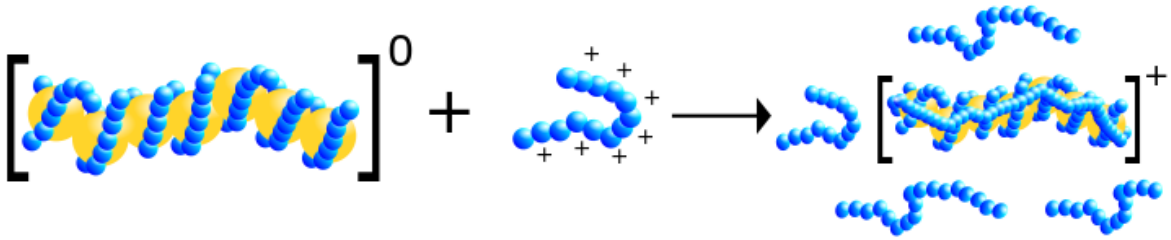


Figure III.16. Schéma du mécanisme de stabilisation d'agrégats neutres par recouvrement avec du chitosan quaternisé.

Une combinaison des deux mécanismes est évidemment possible.

Dans l'article, nous proposons d'expliquer la stabilisation par le second mécanisme en considérant plusieurs arguments :

- La taille hydrodynamique des agrégats stabilisés reste comparable à la taille moyenne des agrégats déterminée par cryoMET en considérant la viscosité de l'eau à 25°C dans la relation de Stokes-Einstein.

- Les agrégats stabilisés sédimentent aux temps longs en conservant leur taille, structure et propriétés optiques comme le font des particules d'or non agrégées du fait de leur densité.
- La présence de polymère n'a jamais été détectée en cryoMET autour des agrégats comme en volume.
- Les mesures de mobilité électrophorétique ne laissent entrevoir aucune contribution d'un réseau de polymère qui pourrait induire une atténuation des oscillations de phase.
- La stabilité est assez bien conservée par dilution.
- Un étude préliminaire montre que la quantité de polymère nécessaire à la stabilité ne dépend pas significativement de la force ionique alors que le seuil de concentration du régime semi-dilué en dépend fortement.

a) Mesures de carbone organique total (COT)

Des mesures de carbone organique total ont été réalisées. L'idée était, en premier lieu, de savoir quelle quantité de polymère participe à la stabilisation des agrégats et ensuite déterminer si le mécanisme est celui du recouvrement. Tous les échantillons ont été faits dans des récipients en verre afin d'éviter toute pollution.

Les mesures se sont portées sur plusieurs échantillons (Figure III.17) :

- Un échantillon d'agrégats stabilisés passé en centrifugation. La centrifugation fait tomber les agrégats avec les chaînes de polymère participant à la stabilisation. Le surnageant contenant le reste du polymère en excès est ensuite prélevé.

- Des échantillons d'agrégats, avec des concentrations de polymère stabilisant de 0,05 / 0,5 et 5 g/L, que l'on laisse sédimenter, puis dont le surnageant est prélevé pour mesurer la quantité de carbone. Après sédimentation des agrégats si la quantité de carbone est très proche de la quantité injectée pour la stabilisation, alors l'hypothèse de stabilisation pourrait être celle du passage dans un régime semi-dilué.

- Une série de solutions de chitosan quaternisé à concentrations connues, donc à quantité de carbone connue. Ces solutions sont centrifugées, ou non, pour voir l'effet de la centrifugation sur la quantité de carbone finale.

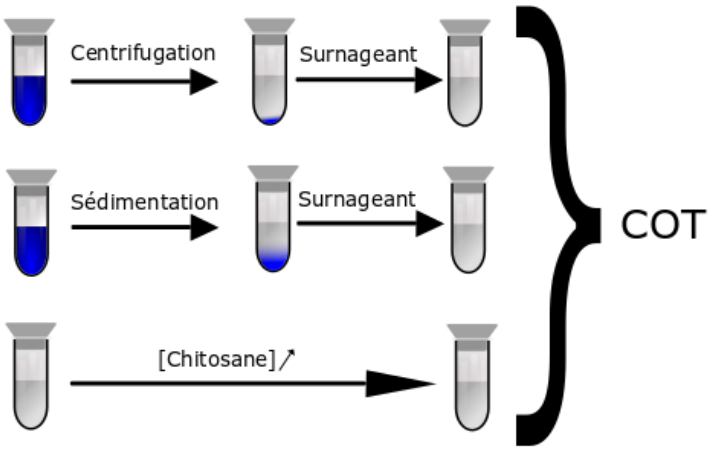


Figure III.17. Schéma des échantillons utilisés pour la mesure de carbone organique total.

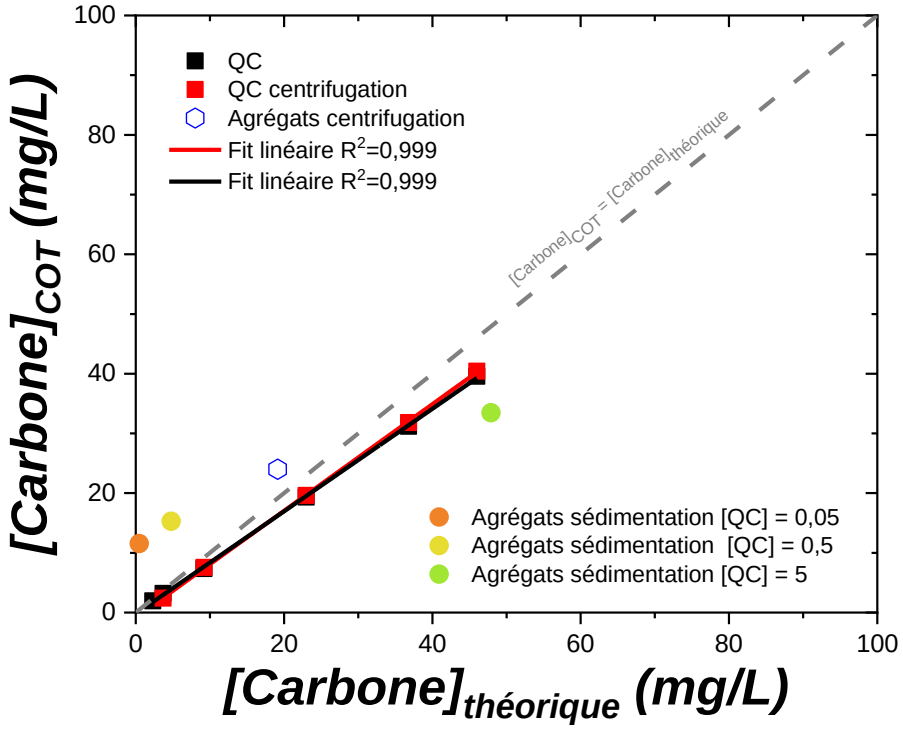


Figure III.18. Courbes de la concentration en carbone mesurée en fonction de la concentration en carbone théorique.

Les résultats obtenus en mesure de carbone organique total sont assez disparates (Figure III.18). On peut tout d'abord observer que l'étape de centrifugation a peu d'impact sur la mesure de carbone organique si l'on compare les deux courbes étalons des solutions de chitosan sans ou avec centrifugation préalable.

Si le mécanisme de stabilisation s'avérait être lié au régime semi dilué, alors la quantité de carbone mesuré devrait être équivalente à la quantité de carbone théorique injectée. Or ici, ce n'est pas le cas.

Si le mécanisme de stabilisation devait être un recouvrement de la surface des agrégats, alors la quantité de carbone mesurée devrait être inférieure à la quantité de carbone théorique injectée, une partie des chaînes de polymère participant ou non à la stabilisation. Or ici, ce n'est pas le cas.

Les mesures de carbone organique conduisent à une quantité de carbone toujours supérieure à celle injectée ce qui donne des résultats aberrants et donc non exploitables. Il n'est donc pas possible de favoriser une des deux hypothèses de stabilisation par l'intermédiaire de cette caractérisation.

b) Microscopie électronique après marquage du polymère

Une autre stratégie pour déterminer le mécanisme de stabilisation des agrégats a été de réaliser un marquage du polymère avant observation en microscopie électronique en transmission. La technique de marquage est déjà couramment utilisée en particulier dans le domaine des copolymères à bloc pour pouvoir observer les structures en différenciant les blocs[154–157] (Figure III.19). On trouve de nombreux agents contrastants, mais on citera les plus couramment rencontrés comme l'osmium (OsO_4) pour marquer les doubles liaisons que l'on peut retrouver dans du polybutadiène par exemple ou encore le ruthénium (RuO_4) pour le marquage des sites aromatiques.

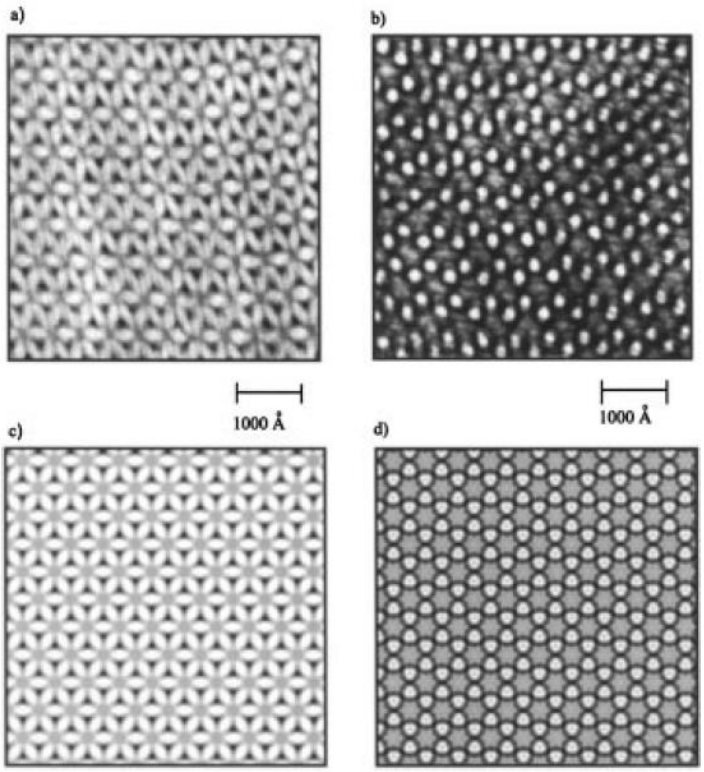


Figure III.19. Clichés MET d'une fine section d'un copolymère ISD (isoprene-styrene-diméthylsiloxane) a) non marqué et b, c, d) marqué au tetraoxide d'osmium. Issue des travaux de Shefelbine et al.[157].

L'idée de cette caractérisation a été de marquer le polymère pour déterminer si ce dernier se localisait préférentiellement autour des agrégats. Ces caractérisations ont été réalisées à la plateforme d'imagerie ImagoSeine en marquant le polymère par de l'acétate d'uranyle [$UO_2(CH_3COO)_2$] puis en réalisant des clichés MET de la solution (Figure III.20).

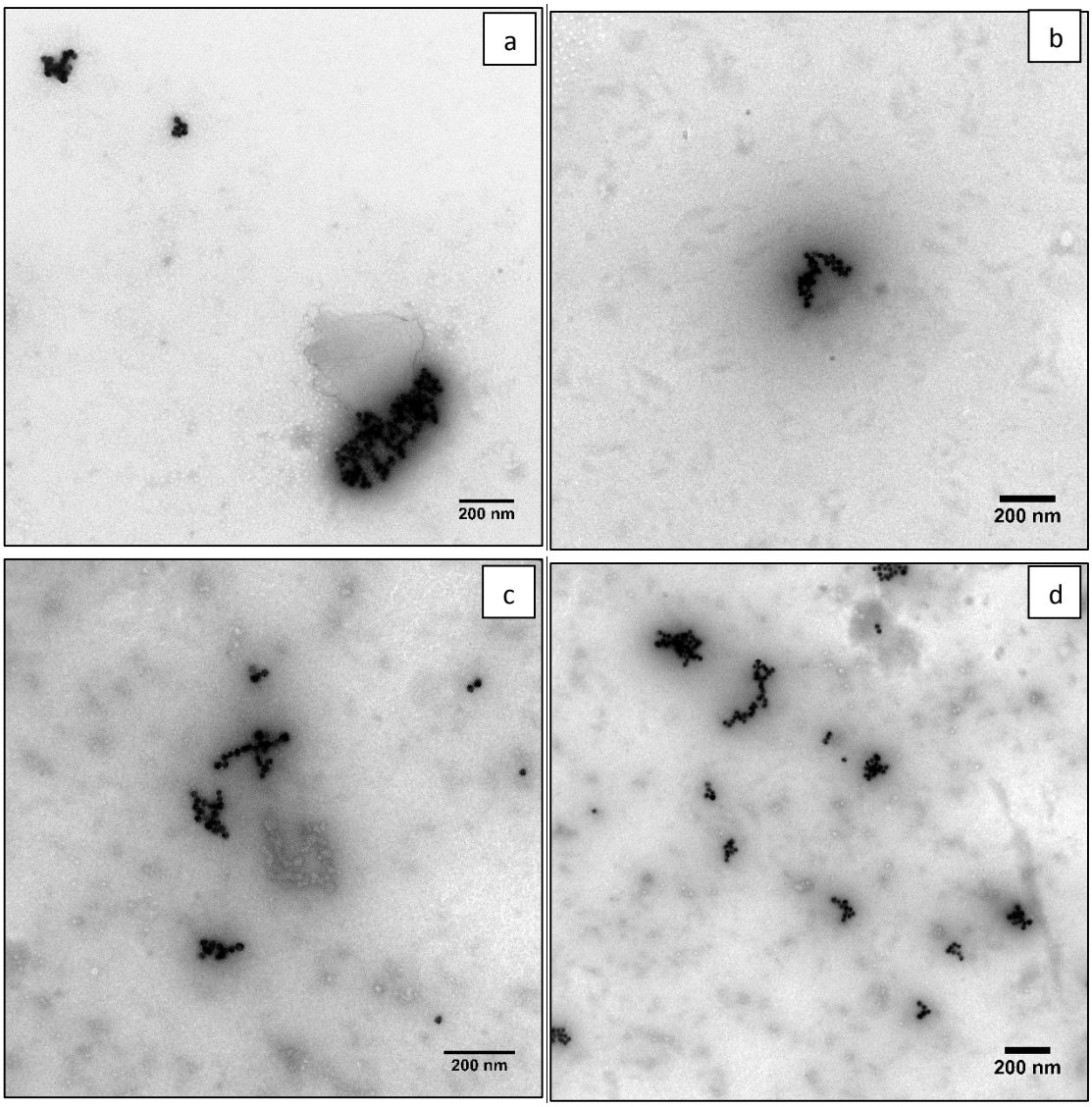


Figure III.20. Clichés MET typiques d'une solution d'agrégats marqués à l'acétate d'uranyle (a et b) quenché avec de l'acide hyaluronique et (c et d) quenché avec du chitosan quaternisé.

Il est assez compliqué de tirer des conclusions sur les clichés obtenus même si ces derniers laissent penser que le polymère se met préférentiellement autour de nos agrégats. Cependant, cet effet peut être amplifié ou provoqué par un effet de séchage.

L'échantillon stabilisé par l'acide hyaluronique montre de très faibles contrastes avec l'acétate d'uranyle. Un marquage par l'intermédiaire d'un autre agent contrastant aurait pu se montrer plus judicieux comme le tungstene utilisé pour marquer les acides carboxyliques.

c) Cartographie élémentaire

Une dernière technique d'imagerie a été envisagée. Cette dernière consiste à déposer des objets sur une grille de microscopie électronique puis à réaliser une cartographie des éléments chimiques. Deux voies ont été mises en oeuvre :

- Une première consistant à déposer une goutte de suspension d'agrégats stabilisés sur une grille classique recouverte d'un film de carbone puis à cartographier l'azote que l'on retrouve dans les unités monomères du chitosan (Figure III.21).

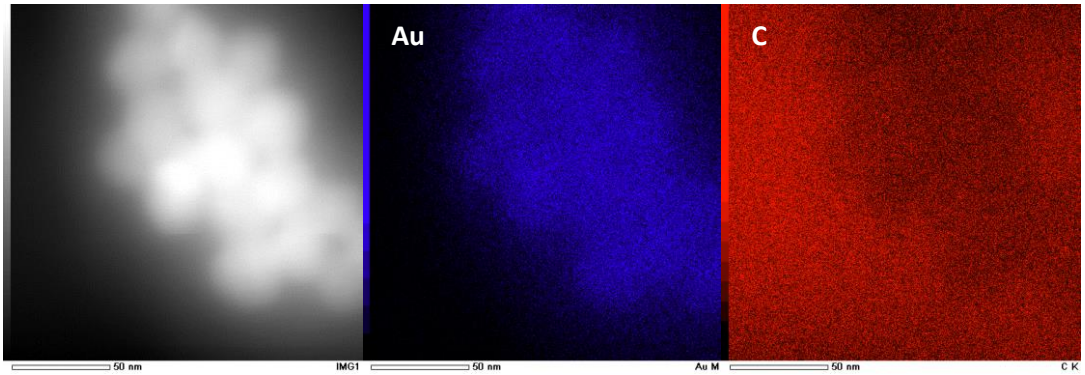


Figure III.21. Clichés STEM-HAADF-EDX d'un agrégat de nanoparticules avec la cartographie élémentaire de l'or et du carbone.

- Une deuxième consistant à déposer une goutte d'agrégats sur une grille de nitrure de silicium. Dans ce cas on écarte l'analyse de l'azote qui est le composant principal de la grille, on cartographie l'élément carbone (Figure III.22).

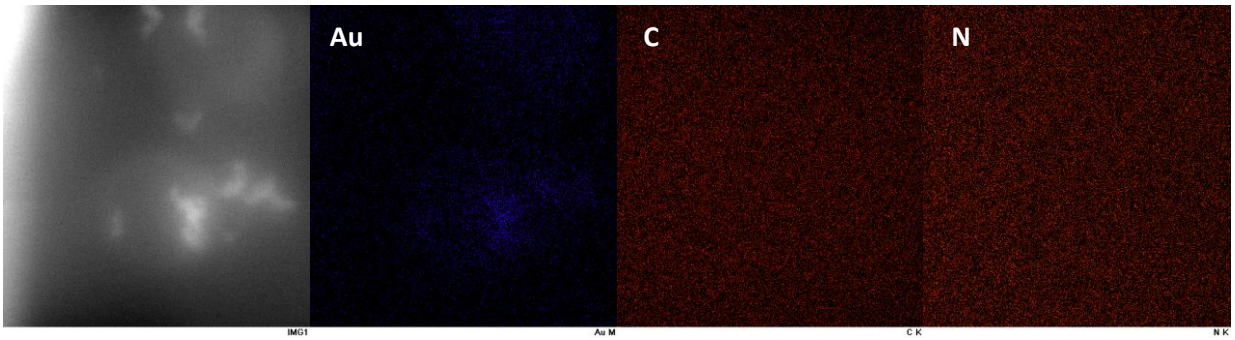


Figure III.22. Clichés STEM-HHADF-EDX d'un agrégat de nanoparticules avec la cartographie élémentaire de l'or, du carbone et de l'azote.

Concernant la première méthode, les résultats sont peu concluants. En effet, il n'est pas possible de cartographier correctement l'azote, car le pic d'énergie de ce dernier est en grande partie noyé dans le signal du carbone.

La deuxième voie avec la grille de nitrure de silice conduit au même problème. Ce problème n'est pas rare, en effet Gundanna et al.[158] ont, par exemple, fait la cartographie de

core-shell Au@SiO_2 avec un signal de l'oxygène difficilement exploitable alors que cet élément ne doit être retrouvé que dans l'écorce de silice (Figure III.23).

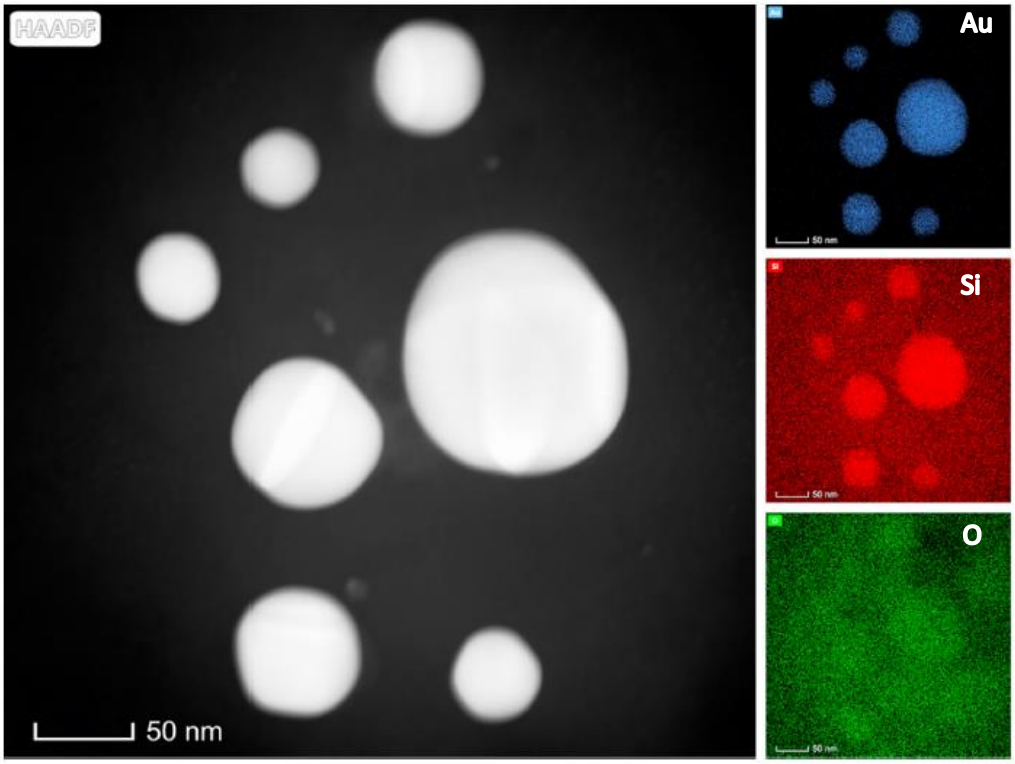


Figure III.23. Cartographie élémentaire en STEM-HAADF-EDX de nanoparticules Au@SiO2 sur des grilles Si_3N_4 en milieu N_2. Issue de stravaux de Gundanna et al.[158].

d) Analyse nanoparticle tracking analysis (NTA)

Nous avons déterminé le coefficient de diffusion des agrégats stabilisés par la méthode NTA. Comme indiqué dans le chapitre II, cette technique permet de calculer le coefficient de diffusion à partir de la trajectoire des objets diffusant observées par microscopie optique. Cette technique, complémentaire de la DLS, permet de vérifier le caractère diffusif du mouvement et d'apprécier visuellement le caractère homogène de l'échantillon. Pour ces mesures les échantillons ont du être dilués par un facteur 20 et 10 afin de limiter le nombre d'objets par image.

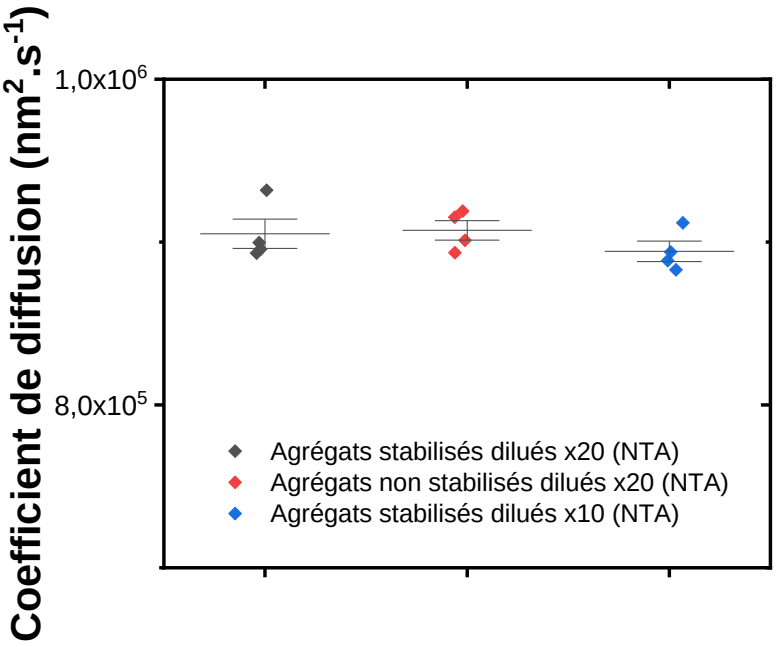


Figure III.24. Coefficient de diffusion d'une solution d'agrégats stabilisés dilués par 20 (noir), non stabilisés dilués par 20 (rouge) et d'agrégats stabilisés dilués par 10 (bleu).

Les résultats obtenus en NTA sont en bonne adéquation avec ceux de DLS malgré un facteur de dilution différent (Figure III.24). Ce résultat nous amène à penser que les objets ne sont pas piégés dans un réseau de polymères, mais plutôt recouverts par ce dernier.

VI) Conclusion

Notre principal résultat est que des complexes électrostatiques de particules et de chaînes polyélectrolytes (PELs) formés au voisinage de la stœchiométrie de charge peuvent être stabilisés à une taille nanométrique par l'ajout ultérieur de chaînes polyélectrolytes. Cette stabilisation est démontrée dans un environnement salin, sur une large gamme de pH, ainsi que dans un milieu de culture cellulaire sur des périodes de plusieurs jours. Contrairement au cas d'une stabilisation induite par l'ajout de particules chargées, les complexes stabilisés par l'ajout de PELs conservent leurs caractéristiques initiales (i.e. leur forme, leur taille, leur structure interne et leurs propriétés optiques) après stabilisation. De plus, la charge des chaînes stabilisantes (i.e. polyanions ou polycations) détermine la charge globale des complexes stabilisés, ce qui offre des possibilités intéressantes de post-fonctionnalisation. Nous pensons que le mécanisme de stabilisation est basé sur l'adsorption des chaînes stabilisatrices sur des domaines de charge opposée à la surface des agrégats globalement neutres.

Malgré un nombre conséquent de caractérisations, la combinaison des différents résultats n'aura pas permis de déterminer précisément la contribution du second polymère dans le processus de stabilisation.

Ce travail a aussi montré que le processus de complexation mis en jeu est très rapide. On a ainsi observé la formation d'agrégats globalement neutres impliquant une centaine de particules, quelques secondes après la mise en présence des différents partenaires. Cette rapidité ne permet pas un contrôle précis de la taille des agrégats par une méthode de mélangeage manuelle. Or, il pourrait être intéressant de former des assemblages impliquant un plus faible nombre de particules afin de minimiser les problèmes de sédimentation et maximiser les facteurs d'amplification de section efficace d'absorption par unité de matière[35].

Sur la base de ce constat, nous avons tenté de développer une approche de mélangeage microfluidique rapide que nous présentons dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV

Formation, stabilisation et contrôle des assemblages par l'utilisation d'un système microfluidique

I) Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré qu'il est possible de stabiliser des complexes électrostatiques de particules et de chaînes polyélectrolytes formés au voisinage de la stœchiométrie de charge par l'ajout de chaînes polyélectrolytes. Les agrégats obtenus présentent une dimension fractale moyenne de 2 avec des tailles avoisinant les 300 nm. Nous nous sommes demandés si nous ne pouvions pas contrôler la taille des assemblages pour maximiser la section efficace d'absorption des agrégats par unité de matière. En effet, les simulations numériques de Khlebtsov et al.[35] (Figure IV.1) ont montré que le facteur d'amplification de la section efficace d'absorption augmente avec le nombre d'agrégation jusqu'à une valeur au-delà de laquelle l'effet d'amplification sature en raison de la « limite de chaîne infinie »[36–38]. Pour une longueur d'onde de 800 nm, ce nombre d'agrégation limite se situe entre 8 et 30 particules par agrégats suivant la structure du complexe et la distance inter-particules. Nous avons donc essayé de développer une approche permettant d'arrêter l'agrégation à des stades précoces du processus. Cela est important si l'on considère le prix des métaux nobles et la nécessité de minimiser les doses de nanoparticules à injecter pour des applications biomédicales. En outre, une minimisation de la taille des agrégats minimiserait les effets de sédimentation observés pour les assemblages obtenus au chapitre précédent.

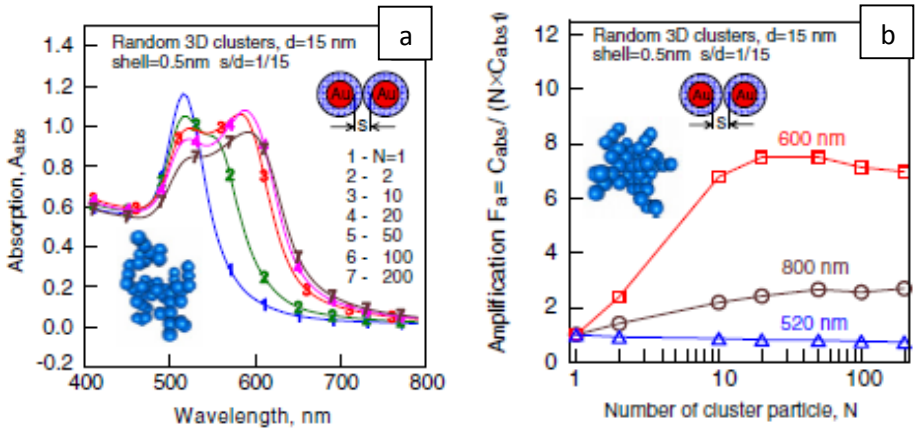


Figure IV.1. Courbe a) de spectres UV-Visible attendus théoriquement pour des agrégats 3D de nanoparticules de 15 nm recouverts par une écorce de polymère d'épaisseur sp = 0,5 nm (s =2sp), b) du facteur d'amplification en fonction du nombre d'agrégation. Issue des travaux de Khlebtsov et al.[35].

En premier lieu, nous avons essayé de contrôler la taille des agrégats en injectant l'agent stabilisant à la main à différents temps. Deux temps de stabilisation ont été considérés : un temps court (t_{quench} < 1 s) et un temps long (t_{quench} > 1 s). Les mélanges étant réalisés à la main, les temps de quench sont peu précis, mais permettent tout de même de valider le principe de la démarche (Figure IV.2).

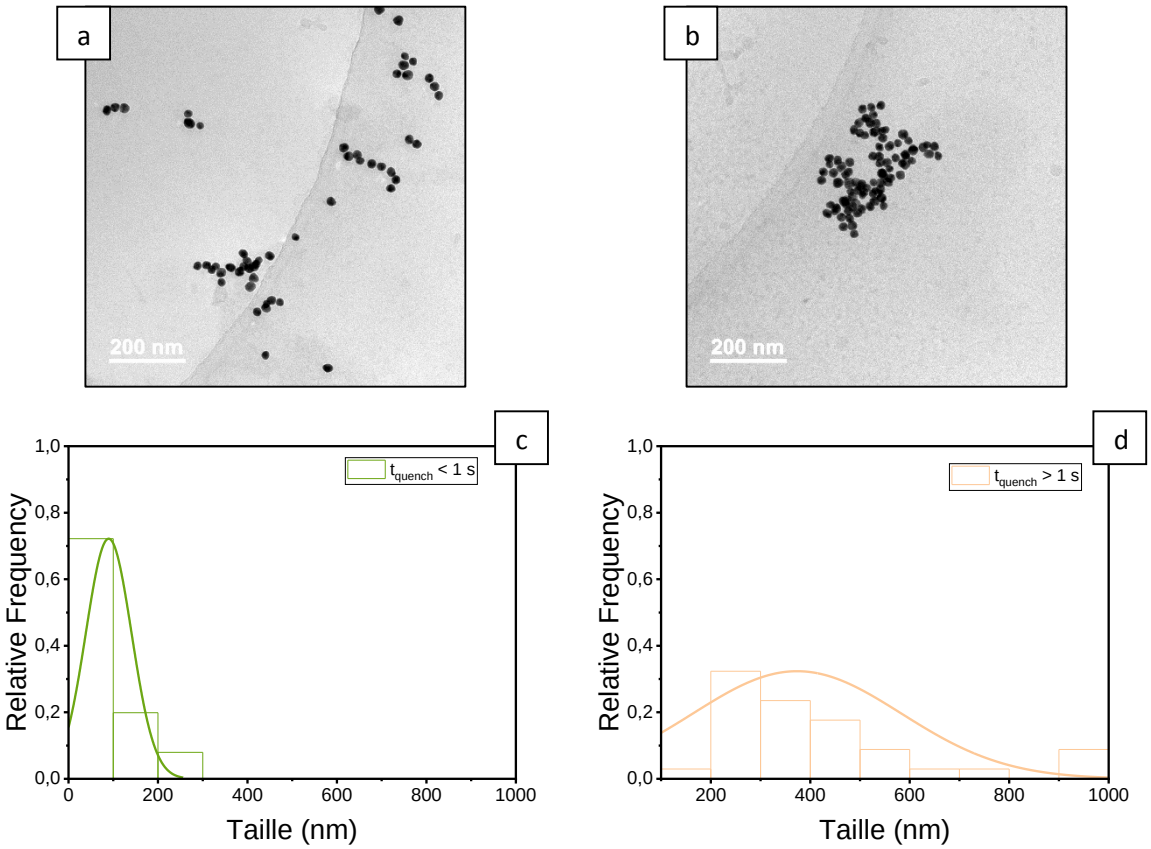


Figure IV.2. Clichés de cryoMET et étude statistique de la taille (a et c) d'agrégats stabilisés aux temps courts, (b et d) d'agrégats stabilisés aux temps longs.

En effet comme le montrent les clichés de cryoMET ci-dessus, les agrégats stabilisés aux temps « longs » présentent des structures fractales et une taille proche des 300 nm. A l'inverse, une stabilisation aux temps « courts » conduit à la formation d'agrégats de taille plus petite, proche de 50 nm. Ces solutions présentent tout de même une importante polydispersité avec la présence de « monomères », « dimères » ou « trimères » en plus des agrégats. Sur cette base, nous avons décidé de travailler avec un système microfluidique permettant un contrôle plus fin du temps auquel est ajouté l'agent quenchant.

L'idée de contrôler des processus réactionnels rapides à l'aide d'un dispositif microfluidique disposant de mélangeurs rapides n'est pas nouvelle en chimie. En effet, ces dernières années l'équipe de Yoshida[159] a montré qu'il est possible d'utiliser ce type de dispositif pour synthétiser des molécules organiques à l'échelle préparative par des réactions rapides qui ne peuvent pas être réalisées par des méthodes classiques en ballon. Ces travaux nous ont donc amené à travailler avec le même type de système pour obtenir des agrégats de tailles différentes par l'utilisation d'un mécanisme StopFlow qui est un appareil permettant l'injection de plusieurs composés sur des temps qui peuvent être très courts (≈ ms). À notre connaissance, ce type d'approche n'a jamais été utilisé dans le domaine des colloïdes pour contrôler des assemblages rapides hors équilibres.

L'appareil utilisé pour la réalisation des agrégats est un mélangeur StopFLow SFM 400 (Bio-Logic) présent à la plateforme SOLEIL. L'appareil est équipé d'une unité de contrôle des

seringues. Les quatre seringues mécaniques de 10 mL permettent d'injecter les solutions avec des flux modulables (≈ mL/s). Le mélange a lieu en amont d'un capillaire en quartz à l'aide d'un mélangeur de type Ball-Berger. Selon l'utilisation, une seringue de récupération peut être placée à la sortie du capillaire. Le mélangeur peut aussi être directement placé sur la ligne SAXS afin d'étudier directement la cinétique d'agrégation (Figure IV.3). L'ordre de position des seringues (S1 : eau / S2 : AuNPs / S3 : agent agrégant / S4 : agent stabilisant) a été optimisé pour obtenir des assemblages de manière répétable mais aussi afin d'éviter toute pollution préalable avec la seringue S1 permettant de laver tout le circuit.

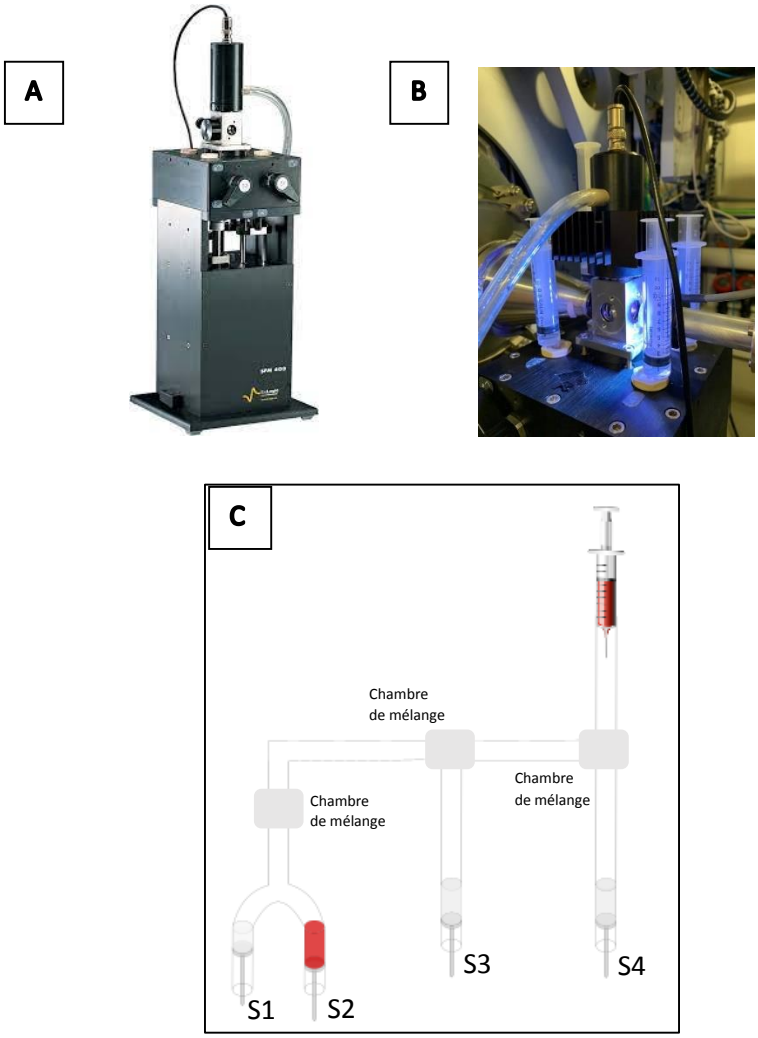


Figure IV.3. (A) Photo de l'appareil StopFlow, (B) monté sur la ligne de synchrotron. (C) Représentation schématique du mélangeur StopFlow.

Les premières expériences ont été réalisées avec le même système que dans le chapitre précédent, c'est-à-dire des nanoparticules et du chitosan quaternisé. Cependant, les résultats ont souvent été disparates avec des aberrations dans ce qui devait être une suite logique de résultats (Figures IV.4 et IV.5). En effet, dans l'exemple ci-dessous, les agrégats réalisés avec un temps de stabilisation de 150 ms présentent des tailles et des propriétés optiques bien trop basses comparés aux autres agrégats. Ces résultats peuvent s'expliquer par la méthode de

mélangeage qui fait intervenir un régime turbulent ou des pollutions résiduelles de polymères sur la paroi des canaux du système.

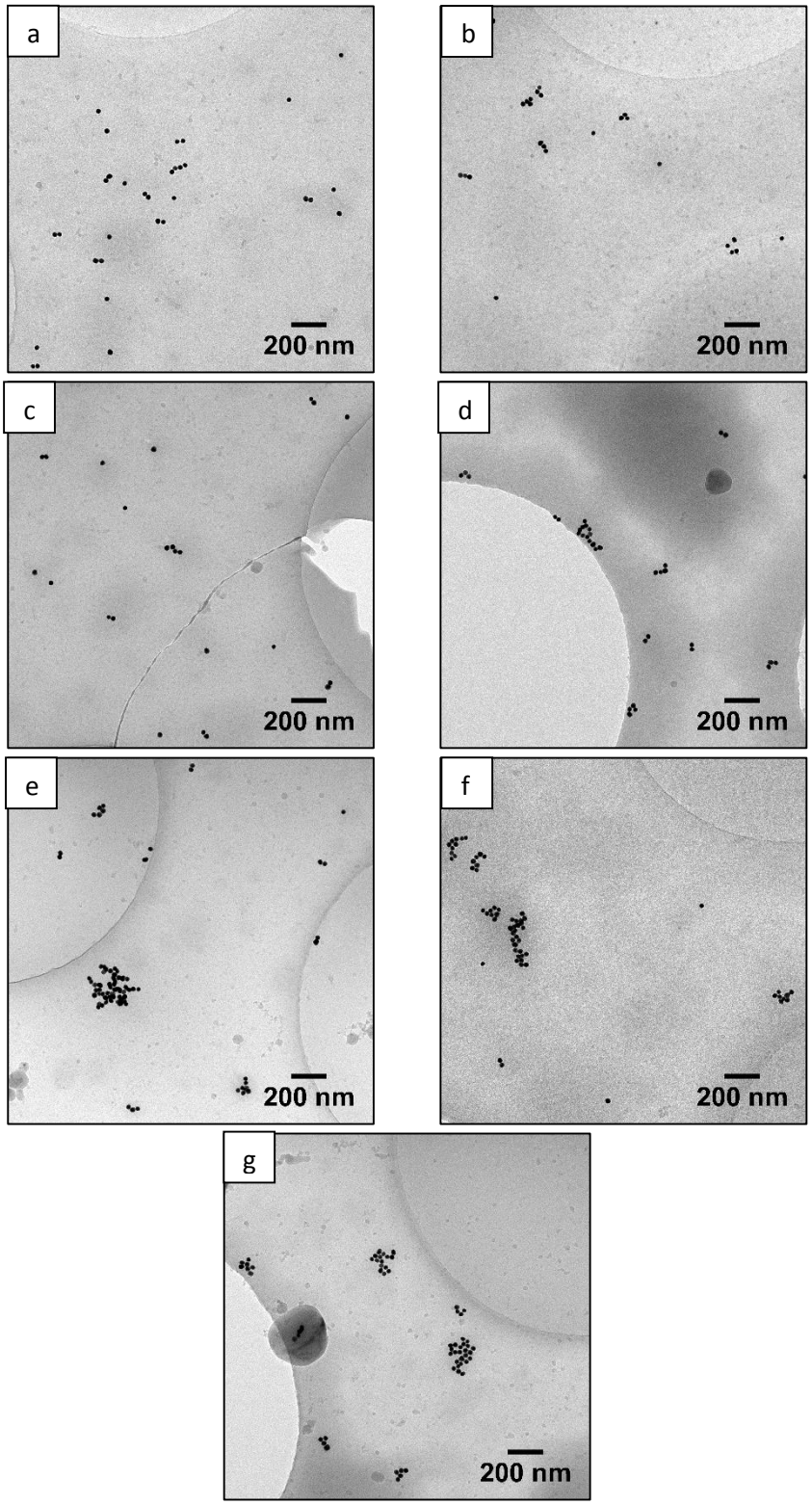


Figure IV.4. Clichés cryoMET d'agrégats stabilisés à (a) 10 ms, (b) 50 ms, (c) 150 ms, (d) 300 ms, (e) 600 ms, (f) 3 s (g) 5 s.

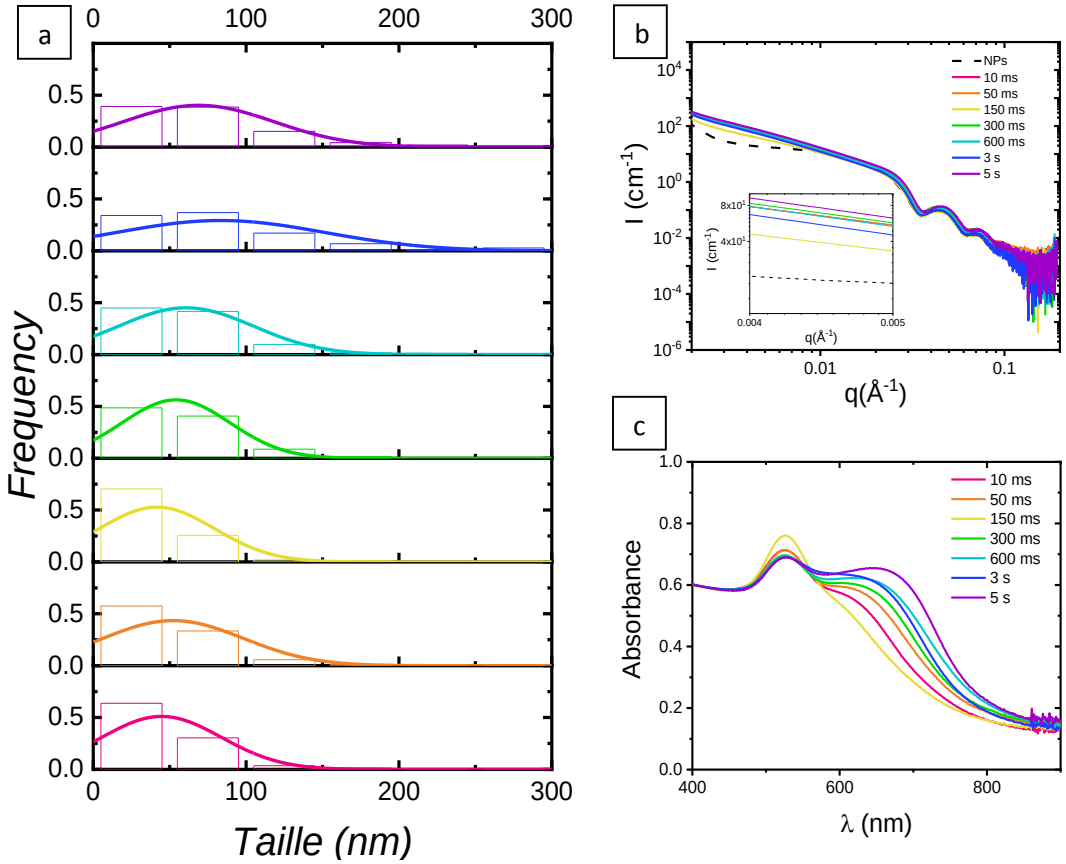


Figure IV.5. (a) Histogrammes de taille des agrégats pour des temps de stabilisations de 10 ms, 50 ms, 150 ms, 300 ms, 600 ms, 3 s 5 s. (b) Courbes SAXS des agrégats et (c) spectres UV-Vis correspondants.

Dans l'optique de travailler avec un système présentant des résultats répétables, nous avons fait le choix d'utiliser un sel d'aluminium comme agent agrégeant. Ce système, bien que différent du polyélectrolyte, permet tout de même de valider le modèle que l'on souhaite démontrer. Ces expériences ont fait l'objet d'un article, présenté dans la partie suivante, et permettent de montrer la possibilité d'obtenir une large gamme d'agrégats caractérisés par des propriétés optiques et structurales différentes.

II) Flash Colloidal Assembly in Micro Flow System

Flash Colloidal Assembly in Micro Flow System

F. Voisin,[1] G. Lelong,[2] J.M. Guigner,[2] T. Bizien,[3] J.M. Mallet,[4] and F. Carn[1*]

[1] Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, Université de Paris, CNRS, Paris, France.
[2] Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, UMR 7590, Sorbonne Université, CNRS, Paris, France.
[3] Synchrotron Soleil, Beamline SWING, Gif SurYvette, Cedex F-91192, France
[4] Laboratoire des Biomolécules, UMR 7203, École Normale Supérieure, PSL Research University, Sorbonne Universités, CNRS, Paris, France.

[*] E-mail : florent.carn@u-paris.fr

Keywords. Flash-Chemistry, Self-Assembly, Colloid, Complexation, Nanoparticle, Polyelectrolyte.

Abstract

In this article, we show how the association of different micro mixers separated by micro flow reactors could enable to master a fast colloidal assembly process taking place out of equilibrium. The proposed method is an extension to the colloidal domain of the so-called flash chemistry approach previously developed to control organic chemistry reactions.

1. Introduction

It has become common to conduct colloidal chemistry in a continuous micro flow reactor.[1–4] This is often motivated by the assertion that microfluidic processes are safer, more sustainable and better suited to automation than batch processes.[5] Flow chemistry also has the advantage of allowing reactions that cannot be performed in batch, thus opening new possibilities of synthesis. This is notably the case of a particular field of flow chemistry called "flash" chemistry.[6,7]

This field has emerged over the last decade, at the instigation of J.I. Yoshida, for the synthesis of organic molecules on a preparative scale by fast reactions which cannot be achieved by batch chemistry. The characteristic times of these reactions involving highly reactive, unstable, species are of the order of a second or less. The principle of the method is simple. The set-up consists of micromixers and micro flow reactors. The reactants are first mixed in a fast and turbulent manner in the micromixers. Then, the reaction proceeds as mixed reactants travel through the flow microreactor. The reaction time, noted t_R, can be precisely controlled, at the millisecond scale, by adjusting the length of the flow reactor and the speed of co-injection.[8]

In the field of colloidal science, fast micromixers and micro flow reactors have been used in combination with synchrotron techniques to probe the nucleation and growth of nanoparticles[9–13] or their assembly.[14,15] This type of flow process has also been used to better control the synthesis of nanoparticles with the so-called flash nanoprecipitation approach.[16] It consists in the simultaneous incorporation of multiple species, comprising the reactives and the stabilizing agent, in a turbulent micromixer to achieve high super-saturation and nucleation rate for nano-particle formation in the millisecond range. These studies on colloidal systems were developed during the same period as the work initiated by Yoshida's team in the field of organic chemistry but, independently, without reference to it. Therefore, to our knowledge, the principle of associating different micro mixers separated by micro flow reactors to master fast colloidal assembly processes taking place out of equilibrium has never been investigated so far.

The purpose of the present work is to demonstrate the potential of such 'flash *colloidal* chemistry' by considering the assembly of citrate coated gold nanoparticles (AuNP) induced by the rapid addition of multivalent electrolyte (i.e. $AlCl_3$) at a concentration well above the critical coagulation concentration[17] (CCC). The rapid mixing of these two partners in a first micromixer initiates an aggregation process controlled by the diffusion leading to the formation of micrometric fractal aggregates of nanoparticles after a few seconds. Injecting a polymer solution using a second micromixer, located at a certain distance from the first, allowed us to

arrest the aggregation process after a given reaction time t_R. By this process, we were able to obtain, at once, dispersions of a few milliliters composed of fractal aggregates with a good colloidal stability.

Our main result is to show that it is possible to master the average aggregation number ($\overline{N}_{agg}$) of the nanoparticle aggregates between ~ 2 and ~ 60 NP/aggregate by varying t_R between ~ 10 ms and ~ 1 s. The relationship between $\overline{N}_{agg}$ and t_R is linear as expected for the so called diffusion limited cluster aggregation process (DLCA). In addition, we show that the structure of the aggregates and their optical properties are not affected by the stabilization process.

2. Materials and Methods

a. Materials

Gold (III) chloride trihydrate ($HAuCl_4.3H_2O$, > 99.99 %), trisodium citrate dihydrate ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$, ≥ 99 %), chitosan ($C_8H_{13}NO_5$, degree of N-deacetylation ~ 75 %, M_w ~ 310-375 kg/mol according to the supplier) were purchased from Sigma-Aldrich. Glycidyltrimethylammonium chloride, noted GTMAC ($C_6H_{14}ClNO$, 80 wt% in water) was purchased from Tokyo Chemical Industry. Aluminium chloride was purchased from Sigma-Aldrich ($AlCl_3$, > 99 %). All solutions were prepared with milliQ water (R = 18.2 MΩ). Details concerning the synthesis of quaternized chitosan are presented in supporting information (SI).

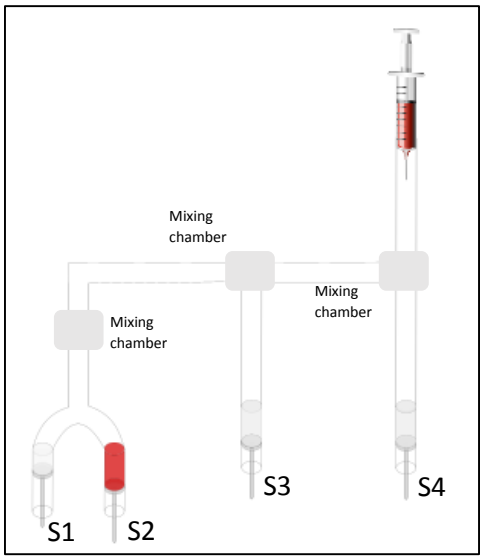
b. Synthesis of citrate coated gold particles

Citrate stabilized gold nanoparticles were first synthesized according to the seeded growth protocol proposed by Bastús *et al.*[18]. Briefly, 97 mg of citrates (0.33 mmol) were put in 150 mL of water (2.2 mM solution) and refluxed for 15min, before adding 1 mL of a 10 g/L solution of $HAuCl_4.3H_2O$. The solution was kept on reflux for 10 min, then the heating was slowly cooled down to 90 °C. The seeds had their size increased by repeating several growing cycles as followed: 55 mL of the solution were withdrawn, followed by the addition of 53 mL of water and 1 mL of a 60 mM citrates solution. As soon as the temperature reached 90 °C again, 1 mL of $HAuCl_4$ were added and the solution was stirred for 30 min. Then, 1 mL of $HAuCl_4$ were added and the solution was stirred again for 30 min. These growing cycles were repeated up to the desired size of AuNPs. Typically, 3 cycles were required to obtain particles with an diameter D_H ~ 39 nm (D = 23.5 nm in TEM). Between the seeds and the fourth cycle, theoretical gold

nanoparticles concentration varies from 3.0×10^{12} NPs/mL to 1.2×10^{12} NPs/mL. The characterizations of the nanoparticles used in this study are presented in figure S1 of SI.

c. Quench flow experiment

The quench flow experiment was made with a SFM-4000 apparatus from BioLogic (Grenoble, France). The solutions are contained in vertical syringes (V = 10 mL) filled from the top to allow the evacuation of the bubbles formed during the filling. A spherical mixer ensures good mixing, and is open directly at the entry of a sample cell. The flow is from the bottom to the top. The syringes, tubes, and mixer are at ambient temperature. A syringe is placed after the sample cell, to collect the mixed sample at the end of the injection.



d. Small Angle X-Ray Scattering (SAXS)

The SAXS experiments were performed on the SWING beamline at SOLEIL synchrotron (Saint-Aubin, France) with a photon energy of 12 keV and a sample-to-detector (Eiger 4M) distance of 6.3 m leading to the following q-ranges: $0.0016 \leq q\ (\text{Å}^{-1}) \leq 0.23$. We recall that the norm of the scattering wave vector is $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$, where θ is the scattering angle and λ = 1.033 Å is the wave-length. Measurements on quenched samples were done by inserting the samples into cylindrical quartz capillaries of 1.5 mm diameter that were sealed and left vertical in the field of gravity. Typically, 10 successive frames of 0.5 s each were recorded and compared to check the absence of beam damage. The scattering patterns were always isotropic. Each frame was first angularly averaged over all frames and the pure solvent spectrum was subtracted. For in situ stop-flow experiments, the SFM-4000 apparatus was connected connected at the output to a flow through quartz capillary (Hilgenberg GmbH, Germany) of 50

µm wall thickness and 2 mm inner diameter. The detector and photodiode were calibrated at 25 °C using water ($1.63x10^{-2}$ cm^{-1}). Water signal has been subtracted from all scattering patterns.

e. Cryogenic Transmission Electronic microscopy (cryo-TEM)

Images were taken on an Ultrascan 2 k x 2 k CCD camera (Gatan, USA), using a LaB 6 JEOL JEM 2100 (JEOL, Japan) cryo-microscope operating at 200 kV with a JEOL low dose system (Minimum Dose System, MDS) to protect the thin ice film from any irradiation before imaging and to reduce the irradiation during the image capture. The images were recorded at 93 K.

f. *Ultraviolet visible near-infrared absorption spectroscopy (UV-vis-NIR).*

Measurements were performed on a Perkin Elmer Lambda 1050 spectrophotometer. 5 mm thickness Hellma cell (quartz) were filled in by the diluted AuNPs, QC and PEL. The diffuse transmission was measured by collecting the light exiting the sample using an integrating sphere (Perkin Elmer Accessory). Spectra were corrected from the quartz cell filled in with water.

3. Results and discussion

a. Multivalent electrolyte induced particle assembly in a turbulent flow

The gold NPs assembly was obtained by mixing equal volumes (V = 400 µL) of two aqueous solutions containing citrated coated gold particles (Φ_{NP} = 4.27×10^{11} NP/mL) and an aluminium salt (Φ_{AlCl_3} = 20 mM) respectively. The aluminum salt concentration is higher than the critical coagulation concentration to obtain a rapid particle aggregation that should correspond to a fast diffusion-limited cluster aggregation (DLCA) process[19].

The fast mixing was made by co-injection of the two solutions at ~ 8 mL/s in a turbulent mixer, of type Berger-Ball[20], using a SFM-4000 apparatus from BioLogic. The particle assembly was characterized with nanoscale and millisecond resolutions by synchrotron *in situ* SAXS on the SWING beamline at Soleil synchrotron.[21] This method enabled us to study the nanostructure formation over several length scales (i.e. 3 - 300 nm) from 200 ms after mixing (Figure 1a).

The intensity scattered by an assembly of spheres of volume V is sensitive to their average size through the sphere form factor P(q) and their organization through the average structure factor S(q) as follows:

$$I(q) = \Phi.V.(\Delta\rho)^2.P(q).S(q) \quad (1)$$

where Φ is the volume fraction of the particles, q is the norm of the scattering vector and $\Delta\rho = \rho_{Au} - \rho_{eau}$ is the contrast of X-ray scattering length density (ρ) between gold and water.

At the shortest observed reaction time (i.e. 200 ms), the scattering curve is close to the form factor of non-interacting (i.e. $S(q) = 1$) polydisperse gold spheres with a mean radius $\overline{R}$ = 12.7 nm and a log. normal size distribution (polydispersity: σ = 0.1). As the aggregation proceeds, $I(q)$ increases with time for q < 0.01 Å^{-1} whereas all the curves remain superimpose for q ≥ 0.02 Å^{-1} (i.e. $q\overline{R}$ >> 1). The latter behavior shows that the particle' concentration and characteristics remain the same during the studied period. The increase of $I(q)$ with time in the low q regime is due to the aggregation process (i.e. $S(q) \neq 1$). In order to estimate the average structure factor $S(q)$ using equation (1), the scattering patterns were divided by the simulated form factor of non-interacting polydisperse gold spheres at the studied concentration. As shown in Fig. 1b, this procedure yields $S(q,t)$ with the assumption that the virial effects between aggregates are negligible at the considered concentration that is quite low. Overall, the curves present a similar profile with a Guinier plateau at low q for short time measurements and a power law decay toward unity at higher q values any time after mixing.

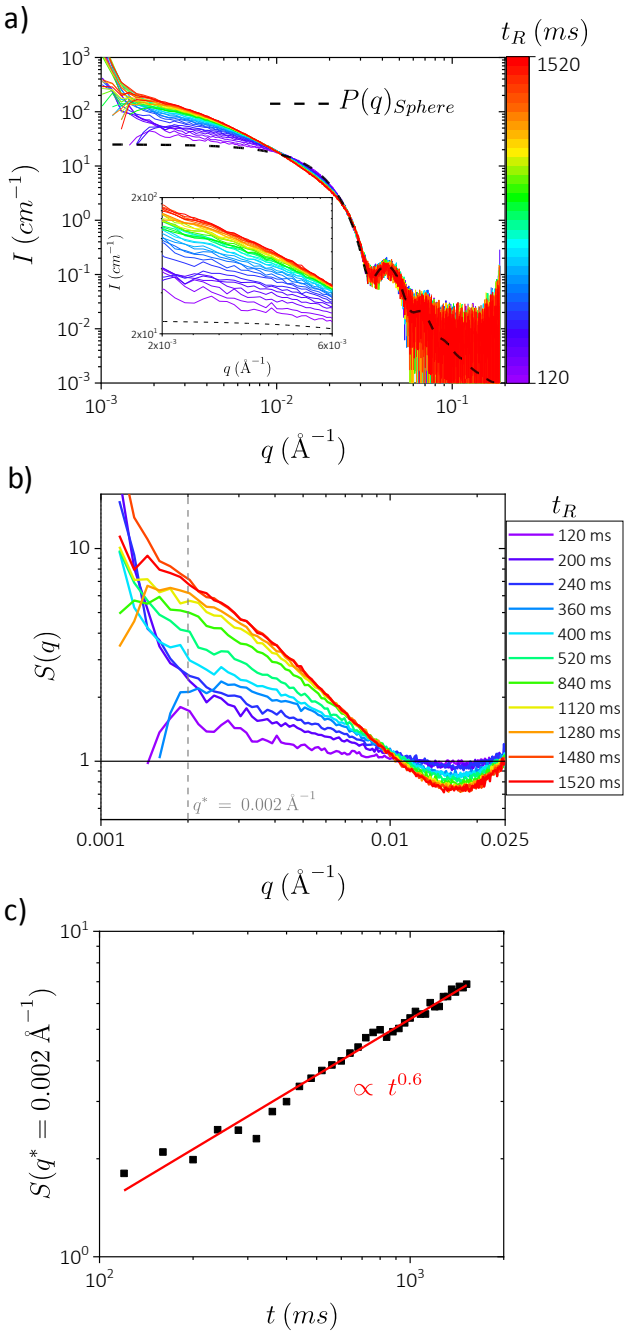


Figure 1. a) Time evolution of the X-ray scattering patterns (I(q)) obtained *in situ* during gold NPs assembly between 120 and 1520 ms after fast mixing with aluminium salt (Φ_{AlCl_3} = 20 mM). The black dashed line corresponds to the form factor of sphere (P(q)) with a log normal size distribution (R = 12.7 nm; PDI = 0.1). b) Time evolution of the structure factor (S(q)) derived from some of the curves shown in figure1a by dividing I(q) with P(q). c) Time evolution of the structure factor shown in figure1b at q = 0.002 $Å^{-1}$.

The aggregation dynamic is characterized by the increase of $S(q \to 0)$ and of the power law exponent which reflect the increase of the averaged aggregation number ($\overline{N}_{agg}$) and of the aggregate mass fractal dimension (d_f) respectively. Since the Guinier regime is not observed for all times, we have characterized the dynamic of aggregation by plotting the evolution of S(q = 0.002 Å^{-1}, t) in Figure 1c. As expected for diffusion-limited cluster aggregation, $S(\mathrm{q} = 0.002\ \text{Å}^{-1}, \mathrm{t})$ scales as a power law over time but with an exponent ~ 0.6 whereas $\overline{N}_{agg}$ would normally scale as $\propto t$ for such aggregation process. In the same way, the mass fractal dimension of the aggregates tends towards 1.2 whereas a value of 1.8 is expected for DLCA. These slight differences may reflect the contribution of hydrodynamic stress related to the turbulent flow in the micromixer[22]. We emphasize that the process of particle assembly has been repeated several times under the same conditions with little variations in the results (Figure S3).

b. Stabilisation of colloidal oligomers at different stages of growth

After the preliminary study concerning the assembly process, we tried to arrest the aggregation after different reaction times (t_R) by injecting a polyelectrolyte solution using a second micromixer located at a certain distance from the first. More specifically, this 'quenching' step consisted in co-injecting 400 µL of a quaternized chitosan solution (C = 0.5 g/L) and 800 µL of the reaction medium containing the gold particles and the aluminum salt at ~ 8 mL/s. The time at which the quenching is made will be noted t_Q in the following. The quenched samples ($V_{Tot.} \approx 1.2$ mL) were then collected in a syringe and analyzed afterwards (i.e. *ex situ* measurements) by SAXS, UV-Vis spectroscopy and cryo-TEM.

At first sight, the temporal evolution of the SAXS patterns obtained by arresting the aggregation process (Figure 2a) is comparable to the non-perturbed *in situ* dynamic (Figure 1a). Overall, this evolution corresponds to the growth of fractal structures with constant particle concentration (i.e. no sedimentation or phase separation). One specificity is that the fractal dimensions are globally higher with a smaller range of variation from 1 to 1.73 when t_Q varies from 10 ms to 1s. At long time, the curve obtained at $t_Q \geq$1s is superimposable to the curves obtained by batch preparation (i.e. injection and mixing using micropipettes and vortex mixer respectively) with or without quenching. It means that, at least for long times, the structures formed do not depend on the mixing mode and on the quenching agent. The increase of d_f may therefore indicate that the quenched structures observed several minutes after formation have time to relax to an equilibrium state. Hence, contrarily to *in situ* characterization shown in figure

1, the value obtained at long t_Q (d_f = 1.73) corresponds to that expected for a DLCA-type process.

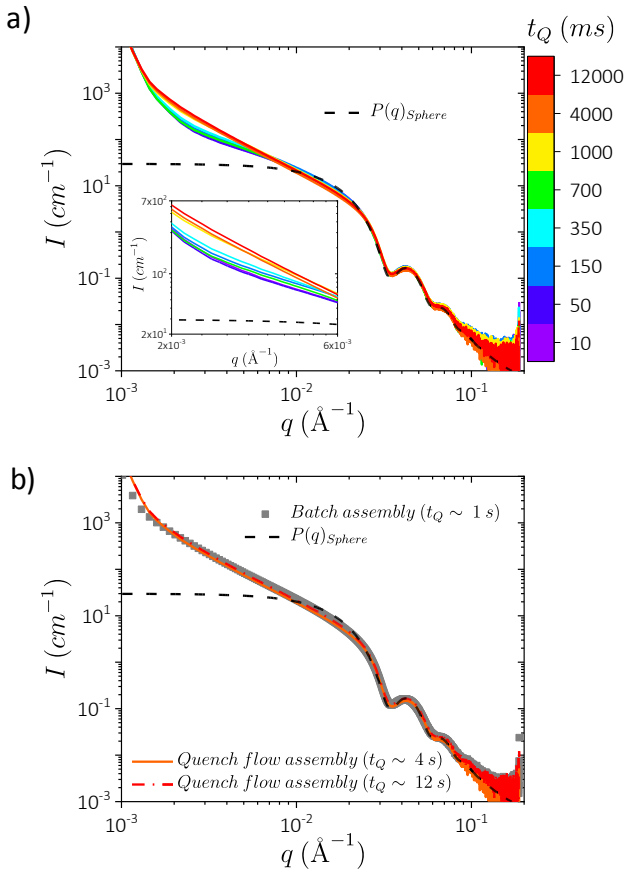


Figure 2. a) X-ray scattering patterns (I(q)) of gold NPs assemblies obtained by quenching the fractal growth at different times (t_Q) indicated on the plot. The NP aggregation has been initiated by fast mixing with aluminium salt (Φ_{AlCl_3} = 20 mM). All samples were characterized 5 min after mixing. b) X-ray scattering patterns of gold NPs assemblies obtained by two different procedures: quench flow and batch assembly. The quench flow corresponds to the protocol associated to figure 1a. The batch assembly corresponds to a protocol where aggregation is induced and stopped by manual mixing and injection with a micropipette for about 1 s after the initiation of aggregation. In the two figures, the black dashed line corresponds to the form factor of sphere (P(q)) with a log-normal distribution (R = 12.7 nm; PDI = 0.1).

We completed this structural study by using cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM). As shown in figure 3 and figures S4-11 of S.I., the aggregates present rather polydisperse fractal structures whose average size visibly increases with t_Q whereas the number of individual particles evolves in the opposite direction.

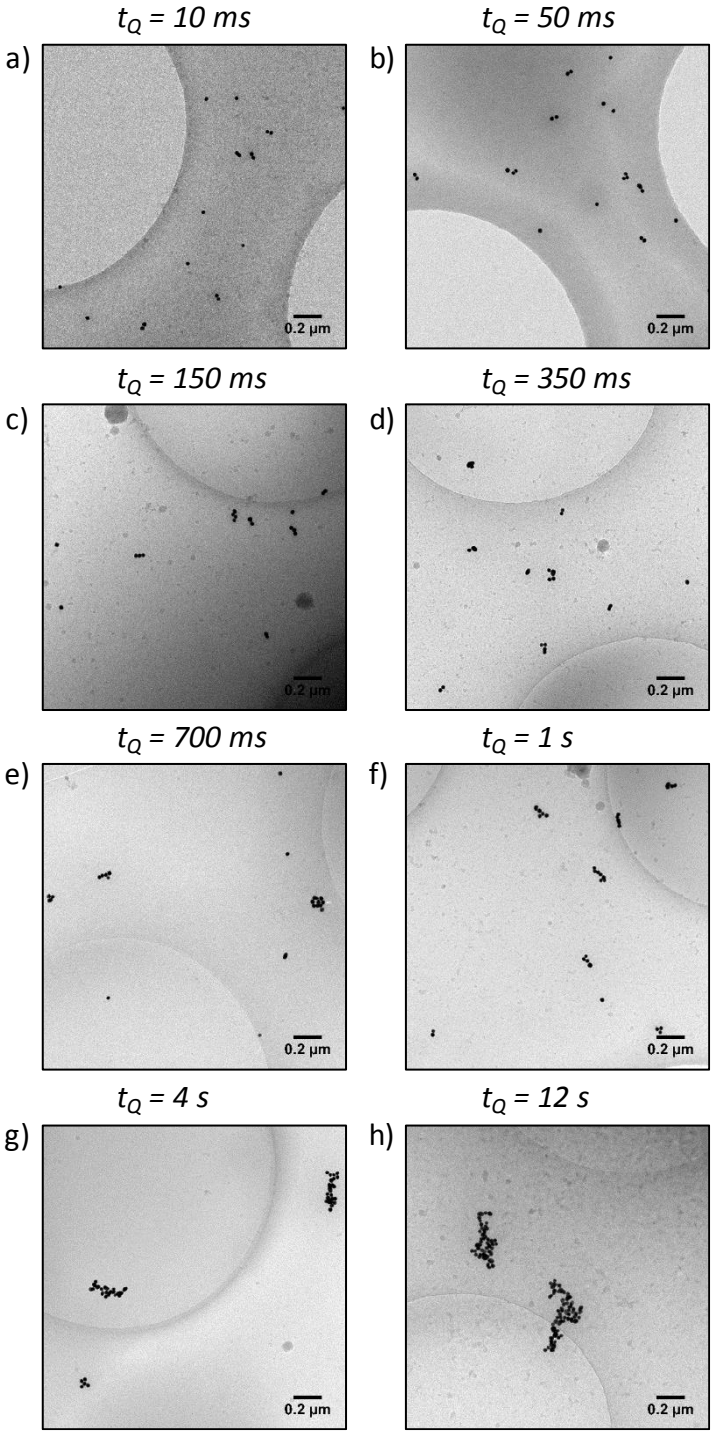


Figure 3. Typical cryo-TEM images of aggregates stabilized after different reaction times (t_Q) as indicated on the images. Additional images for each condition are provided in the supplementary information (Figures S4-S11). The samples were prepared 24 h before observation.

This is confirmed by a statistical analysis of the images (Figure 4a) showing a continuous variation of the average aggregate size ($\bar{D}$) from 40 to 300 nm when t_Q varies from 10 ms to 12 s.

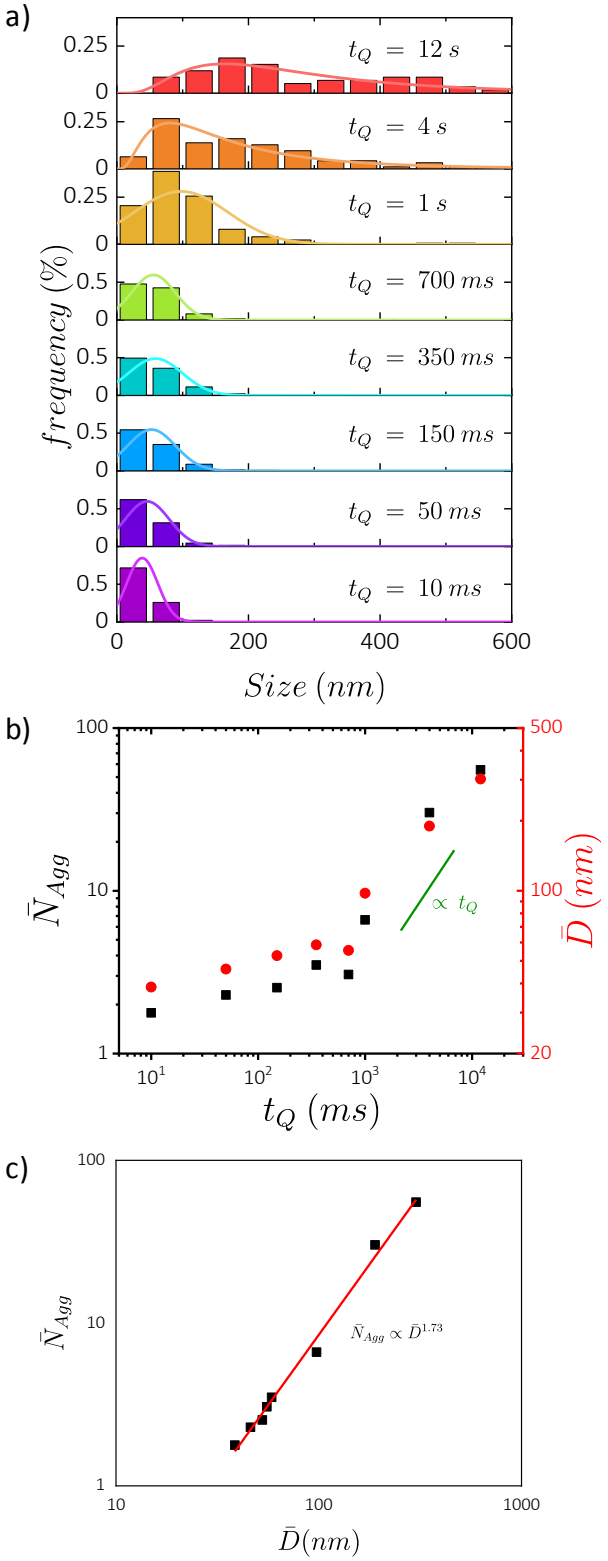


Figure 4. Statistical analysis of the sizes and aggregation numbers of the assemblies observed by cryo-TEM (Figure 3, S4-S11). a) Size histogram of aggregates stabilized after different quenching times (t_Q) indicated on the images. b) Average sizes ($\bar{D}$) and aggregation numbers ($\bar{N}_{Agg}$) as a function of t_Q. c) Average aggregation numbers versus average sizes.

This evolution is initially slow and then faster with a kinetic ($\overline{N}_{agg} \propto t_Q \sim t_R$) in line with those expected for DLCA (Figure 4b). From a structural point of view (Figure 4b), we also obtain a result consistent with a DLCA process since the aggregation number evolves in a power law with the number averaged size $\overline{D}$ such as: $\overline{N}_{agg} \propto \overline{D}^{1.73}$.

High magnification observations revealed the 'coalescence' of adjacent particles inside aggregates whatever t_Q (Figure 5b).

In summary, we show that the turbulent injection of polymer allows to arrest a fast DLCA type aggregation process leading to gold particle assemblies whose average aggregation number is controlled between ~ 2 and ~ 60 NP/aggregate by the quenching time. The evolution of the characteristics of the quenched aggregates ($i.e.$ $\overline{N}_{agg}$ and $\overline{D}$) with the quenching time is in agreement with the results expected for a DLCA type dynamic. This suggests that the stabilisation process by quenching does not alter the structure of the aggregates at a given time, although slight differences appear when compared to in situ measurements during an unquenched reaction.

c. Optical properties of the colloidal oligomers

We monitored the evolution of the optical properties of colloidal oligomer dispersions as a function of t_Q by means of UV/Vis/NIR spectroscopy (Figure 5). The measurements were made on the same series of samples as shown in figures 2, 3 and S4-S11. The dynamic is characterized by a decrease of the intensity corresponding to the localized surface plasmon resonance (LSPR) of isolated particles at 524 nm and the apparition of a new plasmon band which gradually increases in intensity. This second band is obtained is observed over a wavelength range from 600 nm to 950 nm when t_Q varies from 10 ms to 12 s. This evolution is consistent with cryo-TEM observations showing a progressive formation of short linear aggregate which connect over time into fractal structures (Figure 3, S4-S11). We underline that this structuration leads to an efficient coupling of the dipolar modes in comparison with experiments[23] and numeric simulations[24] performed for comparable fractal aggregates of similar particles. A remarkable point is that the wavelength associated with the second extinction maximum rarely exceeds 700 nm for particles of this size assembled in this way, whereas in our case the second maximum is around 800 nm for $t_Q \geq 1\ s$ This specificity is certainly related to the fact that the aggregation mediated by Al^{3+} allows the inter-particle distance to be reduced until the coalescence of adjacent particles (Figure 5b).

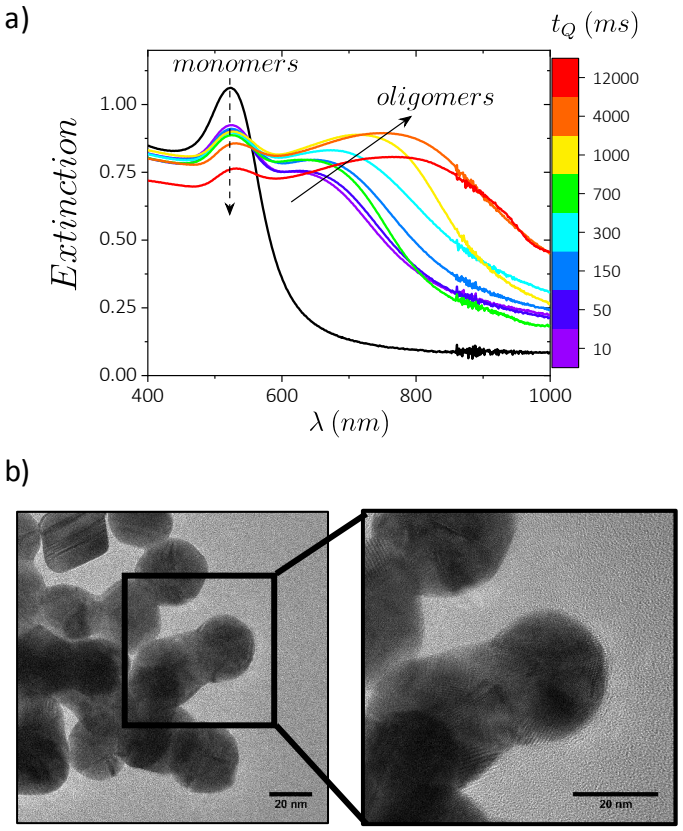


Figure 5. a) Extinction spectra of aqueous dispersions corresponding to the gold particles assemblies characterized in figure 2-4. b) High magnification cryo-TEM images of aggregates stabilized 12 s after the aggregation initiation.

This unanticipated feature occurs whatever t_Q and could be interesting from an applicative point of view. Indeed, the absorption cross-section of an aggregate is maximized when the interparticle distance is minimal and when the aggregation number is in between ~ 8 to ~ 30 particles/aggregate, at λ = 800 nm, depending on the value of the aggregate' fractal dimension.[25] Beyond these aggregation numbers the effective absorption cross section no longer increases due to the so-called infinite chain limit eect.[26–28] Thus, an approach that fuses a small number of particles together is supposed to maximise the absorption per unit mass of material at a wavelength corresponding to the first window of transparency of biological tissues. This is of particular interest for biomedical applications based on thermoplasmonics[29] where it should be beneficial to minimise the doses to be injected. More generally, this would reduce the cost of producing plasmonic aggregates composed of a precious metal. This aspect is notably important for the applications of plasmonics in analytical chemistry such as surface enhanced Raman scattering (SeRS). Indeed, this type of portable measurement is expected to increase to assess localy contaminant levels in aqueous ecosystems at a higher temporal frequency and possibly on a continuous basis.

4. Conclusion

In this article, we tried to demonstrate that the combination of micro-mixers separated by micro-flow reactors allows to master fast colloidal assembly taking place out of equilibrium. This so-called *fast colloidal assembly* approach extends the concept of flash chemistry developed in the last decade for the synthesis of organic molecules by fast reactions which cannot be achieved in batch.

As a case study we considered the assembly of citrate coated gold nanoparticles (NP) induced by the rapid addition of a multivalent electrolyte (i.e. $AlCl_3$) at a concentration well above the critical coagulation concentration. The rapid mixing of the two partners initiates an aggregation process controlled by the diffusion. Injecting a polymer solution using a second micromixer, located at a certain distance from the first, allowed us to arrest the aggregation process after a given reaction time t_R. By this process, we were able to obtain, at once, dispersions of a few milliliters composed of fractal aggregates with a good colloidal stability.

Our main result is to show that it is possible to master the average aggregation number ($\overline{N}_{agg}$) of the nanoparticle aggregates between ~ 2 and ~ 60 NP/aggregate by varying t_R between ~ 10 ms and ~ 1 s. The relationship between $\overline{N}_{agg}$ and t_R is linear as expected for the so called diffusion limited cluster aggregation (DLCA) process. In addition, we show that the structure of the aggregates and their optical properties are not affected by the stabilization process and the mixing procedure.

Acknowledgements.

ANR (Agence Nationale de la Recherche) and CGI (Commissariat à l'Investissement d'Avenir) are gratefully acknowledged for their financial support of this work through Labex SEAM (Science and Engineering for Advanced Materials and devices). F.C. and F.V. thank the ANR Coligomere-18-CE0006 for funding. We are indebted to N. Sanson (Soft Matter Sciences and Engineering, ESPCI, PSL University, Sorbonne Université, CNRS) for his assistance during preliminary TOC measurements. We acknowledge the technopolym platform (Université de Toulouse III-Paul Sabatier) for SEC and TOC measurements. We also acknowledge synchrotron SOLEIL (SWING beam line, Saint-Aubin, France) for the SAXS beam time allocation.

References.

(1) Yi, G.-R.; Thorsen, T.; Manoharan, V. N.; Hwang, M.-J.; Jeon, S.-J.; Pine, D. J.; Quake, S. R.; Yang, S.-M. Generation of Uniform Colloidal Assemblies in Soft Microfluidic Devices. *Advanced Materials* **2003**, *15* (15), 1300–1304. https://doi.org/10.1002/adma.200304890.

(2) Park, J. I.; Nie, Z.; Kumachev, A.; Abdelrahman, A. I.; Binks, B. P.; Stone, H. A.; Kumacheva, E. A Microfluidic Approach to Chemically Driven Assembly of Colloidal Particles at Gas-Liquid Interfaces. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (29), 5300–5304. https://doi.org/10.1002/anie.200805204.

(3) Yu, Z.; Wang, C.-F.; Ling, L.; Chen, L.; Chen, S. Triphase Microfluidic-Directed Self-Assembly: Anisotropic Colloidal Photonic Crystal Supraparticles and Multicolor Patterns Made Easy. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (10), 2375–2378. https://doi.org/10.1002/anie.201107126.

(4) Bian, F.; Sun, L.; Cai, L.; Wang, Y.; Wang, Y.; Zhao, Y. Colloidal Crystals from Microfluidics. *Small* **2020**, *16* (9), 1903931. https://doi.org/10.1002/smll.201903931.

(5) Plutschack, M. B.; Pieber, B.; Gilmore, K.; Seeberger, P. H. The Hitchhiker's Guide to Flow Chemistry. *Chemical Reviews* **2017**, *117* (18), 11796–11893. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00183.

(6) Yoshida, J. *Flash Chemistry: Fast Organic Synthesis in Microsystems*; Wiley: Chister, 2008.

(7) Yoshida, J.; Takahashi, Y.; Nagaki, A. Flash Chemistry: Flow Chemistry That Cannot Be Done in Batch. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (85), 9896–9904. https://doi.org/10.1039/C3CC44709J.

(8) Yoshida, J.; Kim, H.; Nagaki, A. "Impossible" Chemistries Based on Flow and Micro. *Journal of Flow Chemistry* **2017**, *7* (3–4), 60–64. https://doi.org/10.1556/1846.2017.00017.

(9) Pontoni, D.; Narayanan, T.; Rennie, A. R. Time-Resolved SAXS Study of Nucleation and Growth of Silica Colloids. *Langmuir* **2002**, *18* (1), 56–59. https://doi.org/10.1021/la015503c.

(10) Bolze, J.; Peng, B.; Dingenouts, N.; Panine, P.; Narayanan, T.; Ballauff, M. Formation and Growth of Amorphous Colloidal $CaCO_3$ Precursor Particles as Detected by Time-Resolved SAXS. *Langmuir* **2002**, *18* (22), 8364–8369. https://doi.org/10.1021/la025918d.

(11) Né, F.; Testard, F.; Zemb, Th.; Grillo, I. How Does ZrO_2 /Surfactant Mesophase Nucleate? Formation Mechanism. *Langmuir* **2003**, *19* (20), 8503–8510. https://doi.org/10.1021/la034824g.

(12) Abécassis, B.; Testard, F.; Spalla, O.; Barboux, P. Probing in Situ the Nucleation and Growth of Gold Nanoparticles by Small-Angle X-Ray Scattering. *Nano Lett.* **2007**, *7* (6), 1723–1727. https://doi.org/10.1021/nl0707149.

(13) Baumgartner, J.; Ramamoorthy, R. K.; Freitas, A. P.; Neouze, M.-A.; Bennet, M.; Faivre, D.; Carriere, D. Self-Confined Nucleation of Iron Oxide Nanoparticles in a Nanostructured Amorphous Precursor. *Nano Letters* **2020**, *20* (7), 5001–5007. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01125.

(14) Abécassis, B.; Testard, F.; Spalla, O. Gold Nanoparticle Superlattice Crystallization Probed *In Situ*. *Physical Review Letters* **2008**, *100* (11). https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.115504.

(15) Carl, N.; Prévost, S.; Fitzgerald, J. P. S.; Karg, M. Salt-Induced Cluster Formation of Gold Nanoparticles Followed by Stopped-Flow SAXS, DLS and Extinction Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (25), 16348–16357. https://doi.org/10.1039/C7CP01807J.

(16) Saad, W. S.; Prud'homme, R. K. Principles of Nanoparticle Formation by Flash Nanoprecipitation. *Nano Today* **2016**, *11* (2), 212–227. https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.04.006.

(17) Trefalt, G.; Szilagyi, I.; Téllez, G.; Borkovec, M. Colloidal Stability in Asymmetric Electrolytes: Modifications of the Schulze–Hardy Rule. *Langmuir* **2017**, *33* (7), 1695–1704. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04464.

(18) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puntes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11098–11105. https://doi.org/10.1021/la201938u.

(19) Turkevich, J. Colloidal Gold. Part II: Colour, Coagulation, Adhesion, Alloying and Catalytic Properties. *Gold Bull* **1985**, *18* (4), 125–131. https://doi.org/10.1007/BF03214694.
(20) Berger, R. L.; Balko, B.; Chapman, H. F. High Resolution Mixer for the Study of the Kinetics of Rapid Reactions in Solution. *Review of Scientific Instruments* **1968**, *39* (4), 493–498. https://doi.org/10.1063/1.1683415.
(21) David, G.; Pérez, J. Combined Sampler Robot and High-Performance Liquid Chromatography: A Fully Automated System for Biological Small-Angle X-Ray Scattering Experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING Beamline. *Journal of Applied Crystallography* **2009**, *42* (5), 892–900. https://doi.org/10.1107/S0021889809029288.
(22) Kobayashi, M.; Adachi, Y.; Ooi, S. Breakup of Fractal Flocs in a Turbulent Flow. *Langmuir* **1999**, *15* (13), 4351–4356. https://doi.org/10.1021/la980763o.
(23) Balfourier, A.; Mulens-Arias, V.; Gazeau, F.; Carn, F. Rational Design of Fractal Gold Nanosphere Assemblies with Optimized Photothermal Conversion Using a Quantitative Structure Property Relationship (QSPR) Approach. *The Journal of Physical Chemistry C* **2020**, *124* (16), 8938–8948. https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c00384.
(24) Khlebtsov, B.; Zharov, V.; Melnikov, A.; Tuchin, V.; Khlebtsov, N. Optical Amplification of Photothermal Therapy with Gold Nanoparticles and Nanoclusters. *Nanotechnology* **2006**, *17* (20), 5167–5179. https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/20/022.
(25) Khlebtsov, B.; Zharov, V.; Melnikov, A.; Tuchin, V.; Khlebtsov, N. Optical Amplification of Photothermal Therapy with Gold Nanoparticles and Nanoclusters. *Nanotechnology* **2006**, *17* (20), 5167–5179. https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/20/022.
(26) Citrin, D. S. Plasmon Polaritons in Finite-Length Metal−Nanoparticle Chains: The Role of Chain Length Unravelled. *Nano Lett.* **2005**, *5* (5), 5.
(27) Barrow, S. J.; Funston, A. M.; Gómez, D. E.; Davis, T. J.; Mulvaney, P. Surface Plasmon Resonances in Strongly Coupled Gold Nanosphere Chains from Monomer to Hexamer. *Nano Letters* **2011**, *11* (10), 4180–4187. https://doi.org/10.1021/nl202080a.
(28) Willingham, B.; Link, S. Energy Transport in Metal Nanoparticle Chains via Sub-Radiant Plasmon Modes. *Opt. Express* **2011**, *19* (7), 6450. https://doi.org/10.1364/OE.19.006450.
(29) Baffou, G.; Cichos, F.; Quidant, R. Applications and Challenges of Thermoplasmonics. *Nature Materials* **2020**, *19* (9), 946–958. https://doi.org/10.1038/s41563-020-0740-6.

Supporting Information

Flash Colloidal Assembly in Micro Flow System

F. Voisin,[1] G. Lelong,[2] J.M. Guigner,[2] T. Bizien,[3] J.M. Mallet,[4] and F. Carn[1*]

[1] Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, Université de Paris, CNRS, Paris, France.
[2] Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, UMR 7590, Sorbonne Université, CNRS, Paris, France.
[3] Synchrotron Soleil, Beamline SWING, Gif SurYvette, Cedex F-91192, France
[4] Laboratoire des Biomolécules, UMR 7203, École Normale Supérieure, PSL Research University, Sorbonne Universités, CNRS, Paris, France.

[*] E-mail : florent.carn@u-paris.fr

Keywords. Flash-Chemistry, Self-Assembly, Colloid, Complexation, Nanoparticle, Polyelectrolyte.

1. Synthesis and characterization gold nanoparticles

Citrate-stabilized gold nanoparticles were first synthesized in aqueous medium by seeded growth process. The nanoparticles, noted AuNPs have a final concentration of 8.6×10^{11} $NP.mL^{-1}$. DLS measurements revealed a single population of NPs with $R_{H\ (AuNPs)}$ = 19.5 nm (Figure S1a). As expected, such nanoparticles dispersed at pH = 6.5 were negatively charged with an averaged electrophoretic mobility μ = - $3{,}343.10^{-8}$ $m^2V^{-1}s^{-1}$ (Figure S1b), that can be related to a ζ -potential of - 42,6 mV according to the Debye−Hückel model. The as-obtained red dispersion display a surface plasmon resonance (SPR) absorption band at 525 nm (Figure S1f). A more accurate determination of the size distribution was obtained by TEM and small angle X-Ray scattering (SAXS). The SAXS pattern obtained for a dilute dispersion of AuNPs (Figure 1d) was well fitted by the form factor P(q) of spheres with R = 12.5 nm. The slight intensity upturn observed at low q indicates the presence of small NP clusters. One can estimate an average aggregation number of two NPs/clusters by dividing the total scattered intensity by the form factor of individual NPs. Accordingly, TEM observations (Figures 1e and 1f) revealed isotropic nanoparticles R = 11.8 nm.

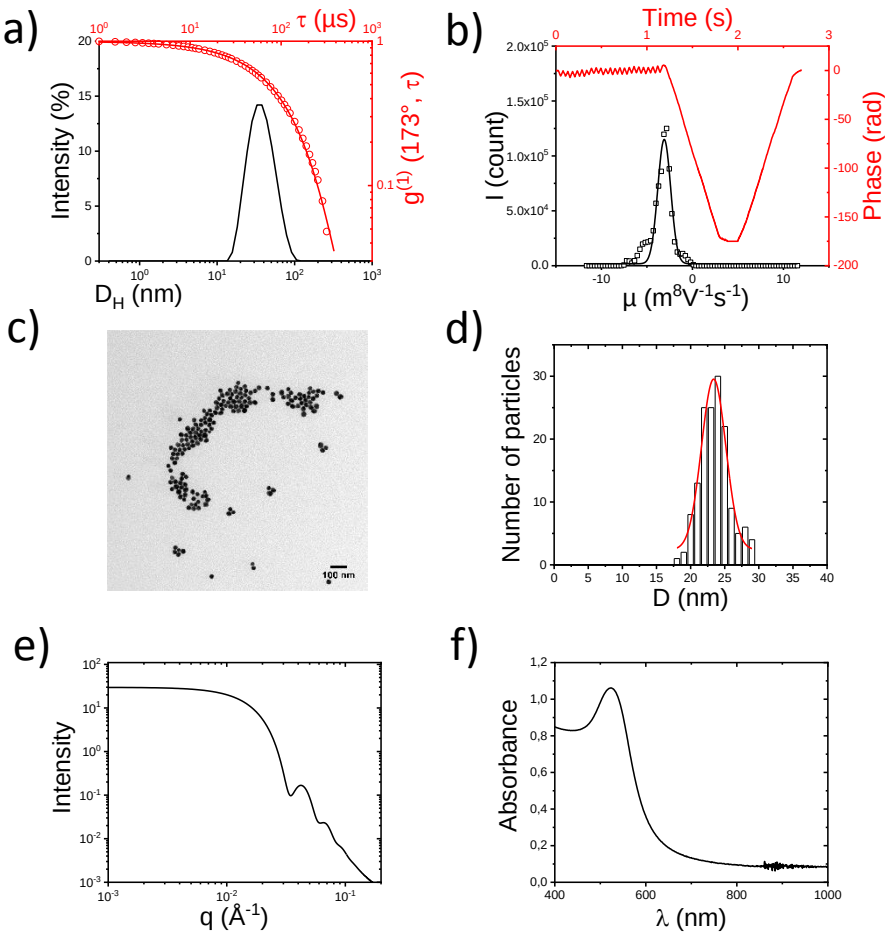


Figure S2. Optical and structural characterizations of citrate coated AuNPs. (a) Scattered electric field autocorrelation function $g^{(1)}$ (173°,t) and corresponding normalized distributions of the scattered intensity as a function of size by applying the Contin method to our data. (b) Time evolution of the phase for electric field oscillating at 20 Hz and 0.2 Hz. Corresponding distribution of electrophoretic mobility (µ). (c) TEM image (scale bar 100 nm). (d) corresponding histogram of size distribution. (e) SAXS fit curve of the data using the form factor calculated for a sphere. (f) UV−Vis. spectra

2. Characterizations of chitosan and quaternized chitosan (QC)

Details regarding the protocol used for chitosan quaternization are given in the main article.

a. Synthesis of quaternized chitosan

Quaternized chitosan (QC) was synthetized in aqueous medium by ring opening between the chitosan's primary amine and the epoxy cycle of glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC). The protocol was adapted from literature.

In a 250 mL two necked round bottom flask, 6 g of chitosan powder (see Materials section) was dispersed in 60 mL of milliQ water at 85 °C at reflux with a heating mantle during 2 hours leading to a suspension of partially solubilized chitosan (pH ≈ 6.5). 6.20

mL of glycidyltrimethylammonium chloride, noted GTMAC, was then added three times every two hours. The viscous yellow mixture was kept under magnetic stirring at 800 rpm during ~ 10 h. The polymer was 'precipitated' adding an excess of acetone and washed with acetone several times. After drying in oven at 60°C during two days one typically recovers 16 g of the polymer in the form of a yellow vitreous solid. It was then purified by dispersion in milliQ water at pH 6.5 and dialysed (cutoff ~ 14 kda) against milliQ water during four days to eliminate unreacted GTMAC. The water was changed every three hours. One finally recovers quaternized chitosan (QC) after freeze drying (~ 24 h).

b. Characterizations of QC aqueous solutions

Chloride ions titration was performed with a conductimeter SevenMulti from METTLER TOLEDO equipped with a probe InLab® 731. Quaternized chitosan was dissolved in milliQ water and 200 µL of a $AgNO_3$ solution was added drop by drop.

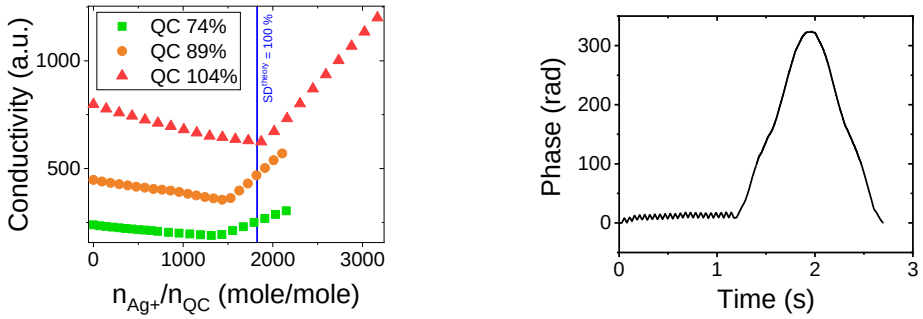


Figure S2. Characterizations of QC solubilized in milliQ water (pH 6.5). (a) Chloride ions titration curves obtained by conductimetry for GTMAC/chitosan molar ratio ranging between 2:1 and 4.5:1. The substitution degrees (SD) given in the inset correspond to the calculated values derived from the titration. The blue line represents the equivalence ratio corresponding to a substitution degree of 100%. (c) Temporal evolution of the phase during electrophoretic mobility measurements for electric field oscillating at 20 Hz (Time < 1.2 s) and then 0.2 Hz (Time > 1.2 s). The curve corresponds to an average electrophoretic mobility: µ = + 4.7 µmcm/Vs.

3. Kinetic formation of AuNPs aggregates in StopFlow

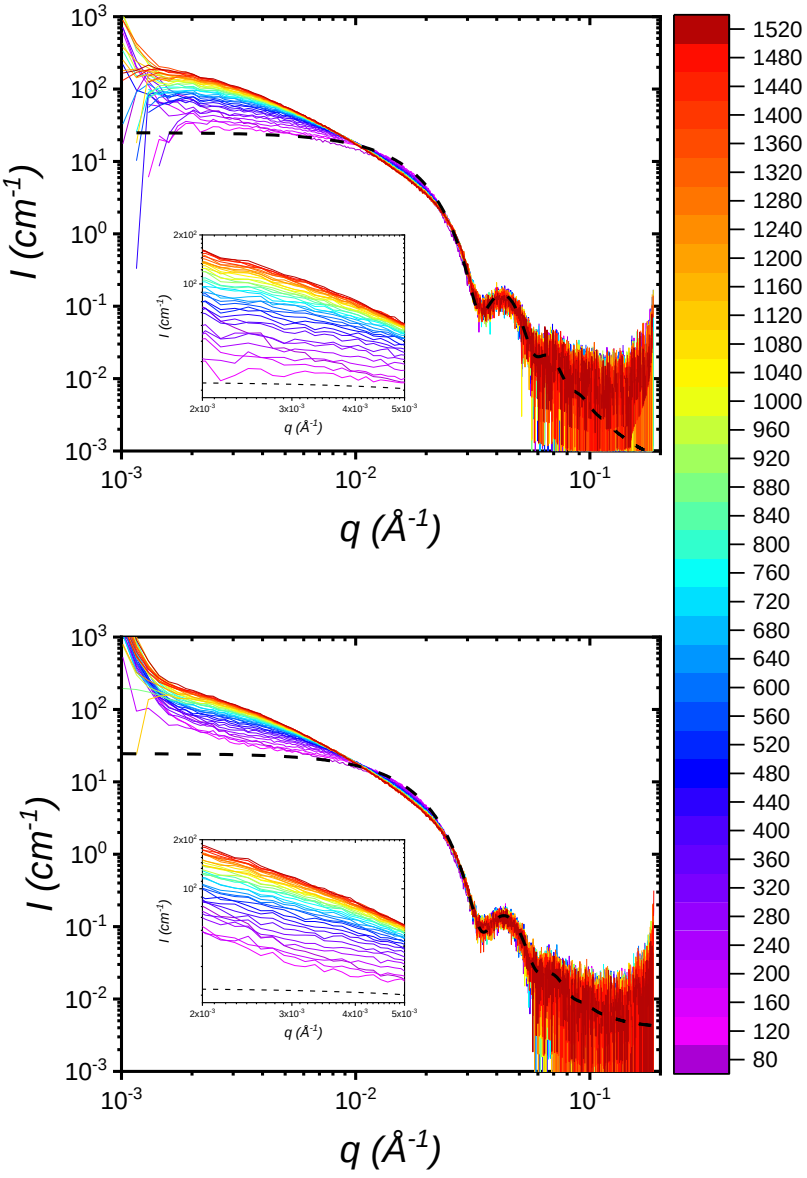


Figure S3. Complementary curve of time evolution of the X-ray scattering patterns (I(q)) obtained *in situ* during gold NPs assembly between 120 and 1520 ms after fast mixing with aluminium salt (Φ_{AlCl_3} = 20 mM). The black dashed line corresponds to the form factor of sphere (P(q)) with a log normal size distribution (R = 12.7 nm; PDI = 0.1).

4. AuNPs aggregates with different quench time

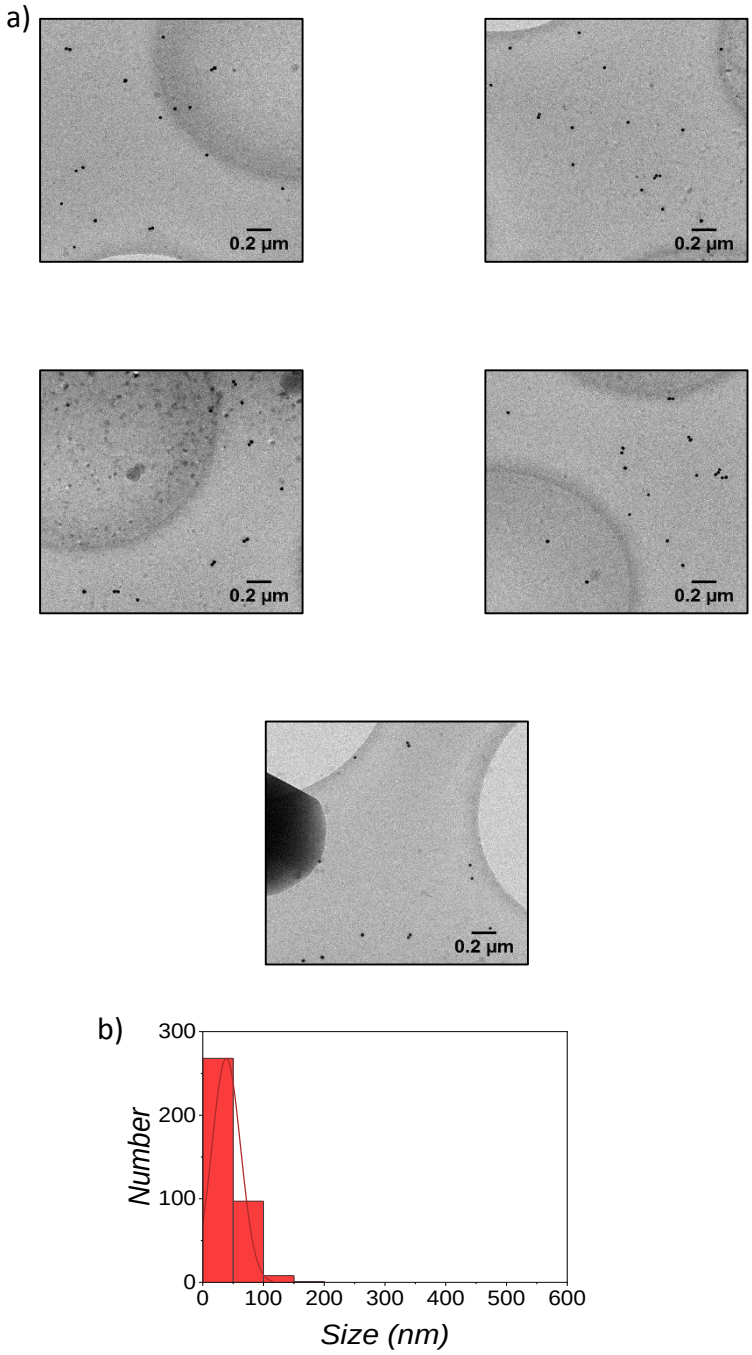


Figure S4. a) cryo-TEM images of AuNPs/$AlCl_3$ aggregates quench at t = 10 ms. b) Size histogram of aggregates

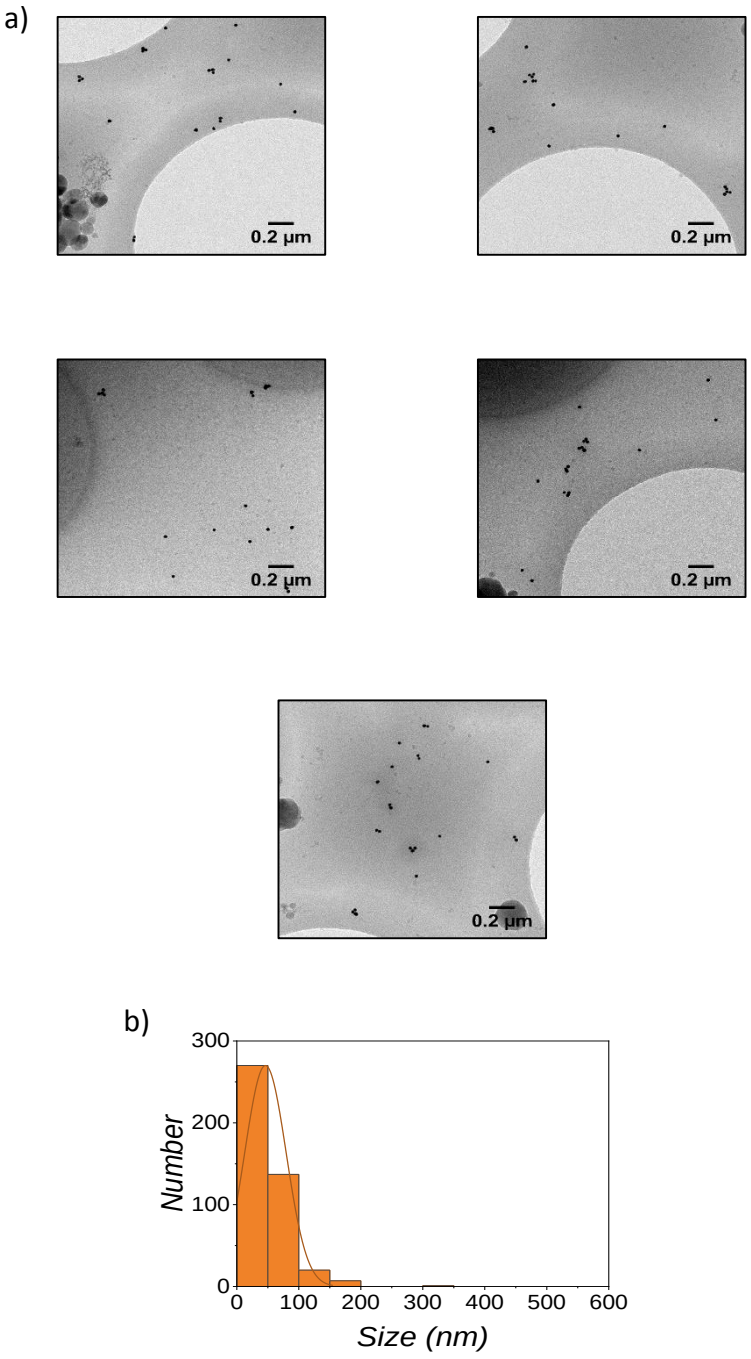


Figure S5. a) cryo-TEM images of AuNPs/$AlCl_3$ aggregates quench at t = 50 ms. b) Size histogram of aggregates

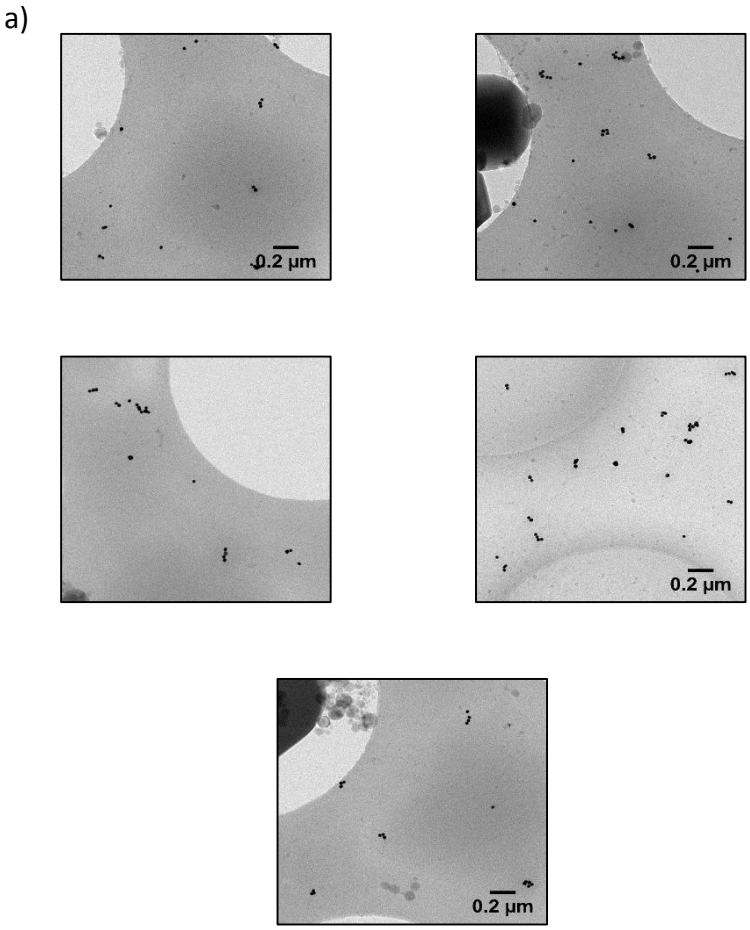
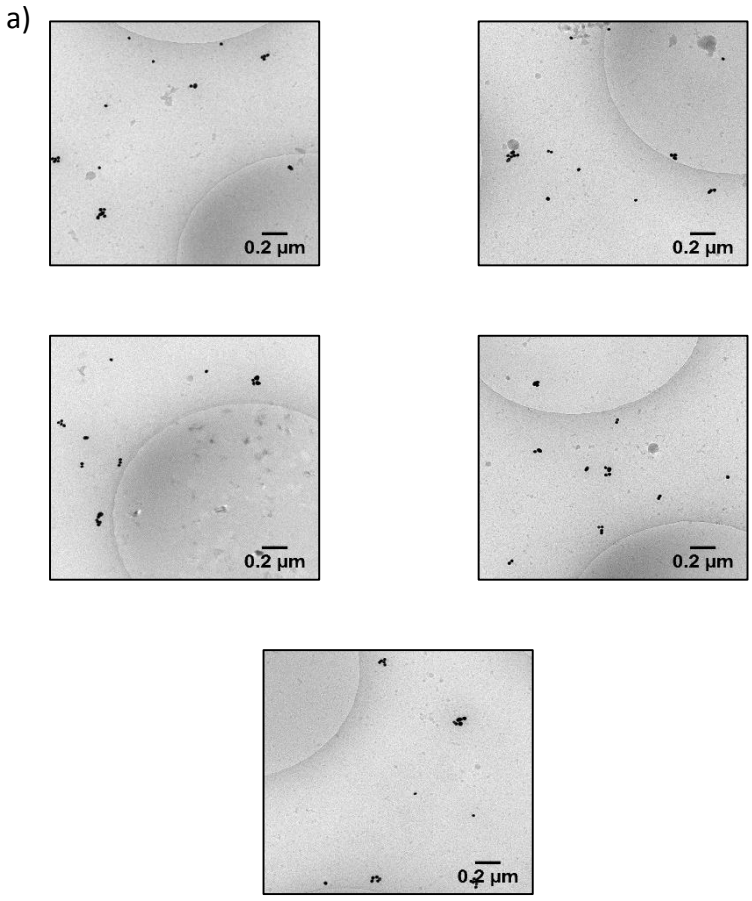


Figure S6. a) cryo-TEM images of AuNPs/$AlCl_3$ aggregates quench at t = 150 ms. b) Size histogram of aggregates



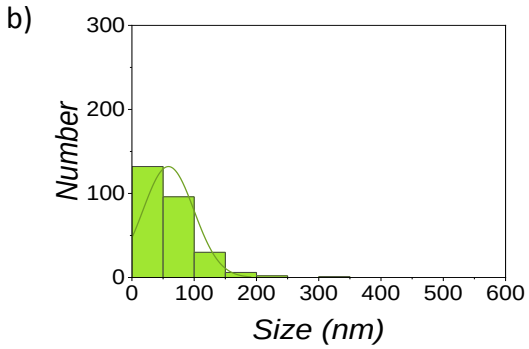


Figure S7. a) cryo-TEM images of AuNPs/$AlCl_3$ aggregates quench at t = 300 ms. b) Size histogram of aggregates

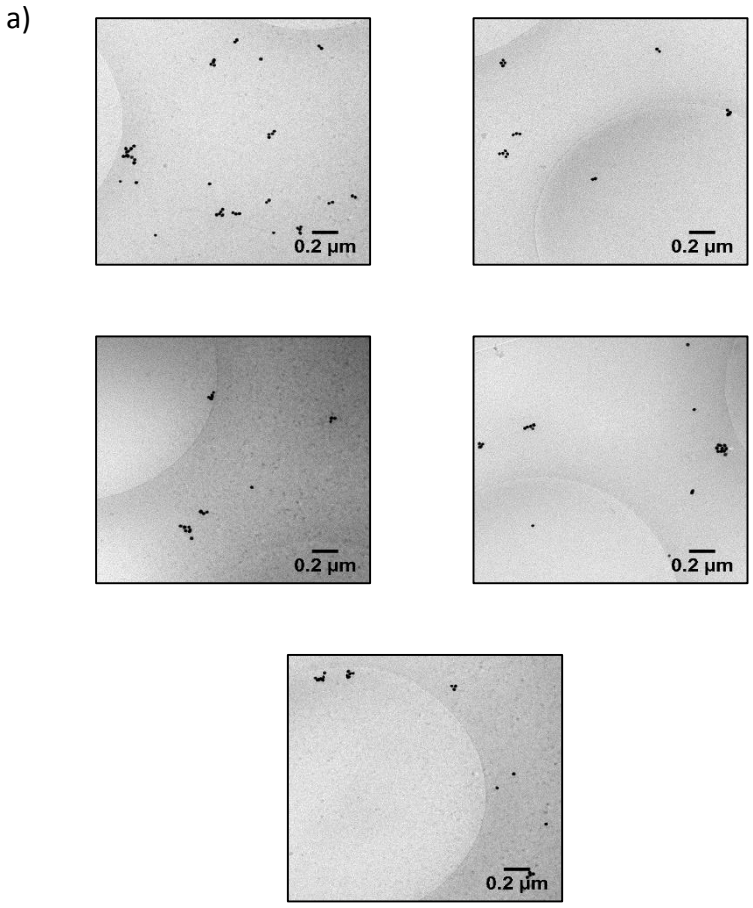


Figure S8. a) cryo-TEM images of AuNPs/$AlCl_3$ aggregates quench at t = 700 ms. b) Size histogram of aggregates

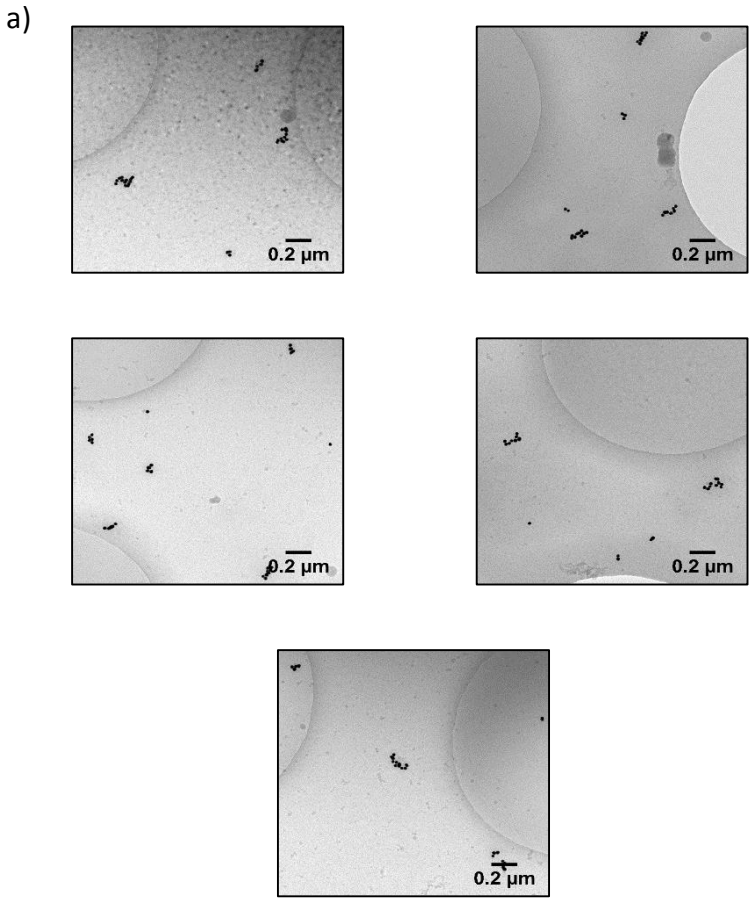


Figure S9. a) cryo-TEM images of AuNPs/$AlCl_3$ aggregates quench at t = 1000 ms. b) Size histogram of aggregates

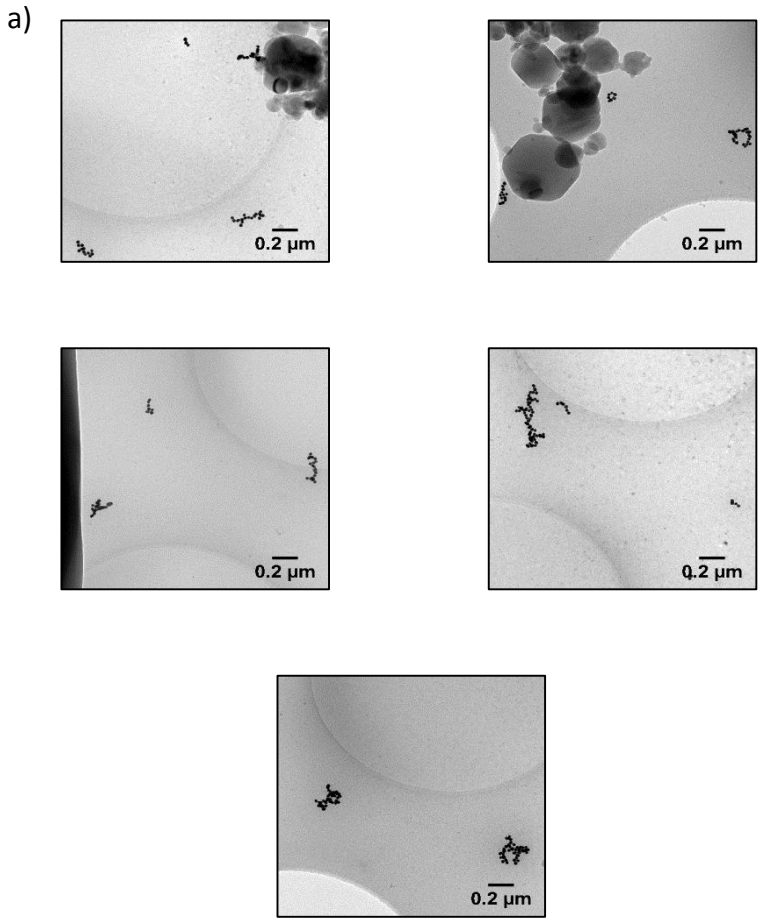


Figure S10. a) cryo-TEM images of AuNPs/$AlCl_3$ aggregates quench at t = 4000 ms. b) Size histogram of aggregates

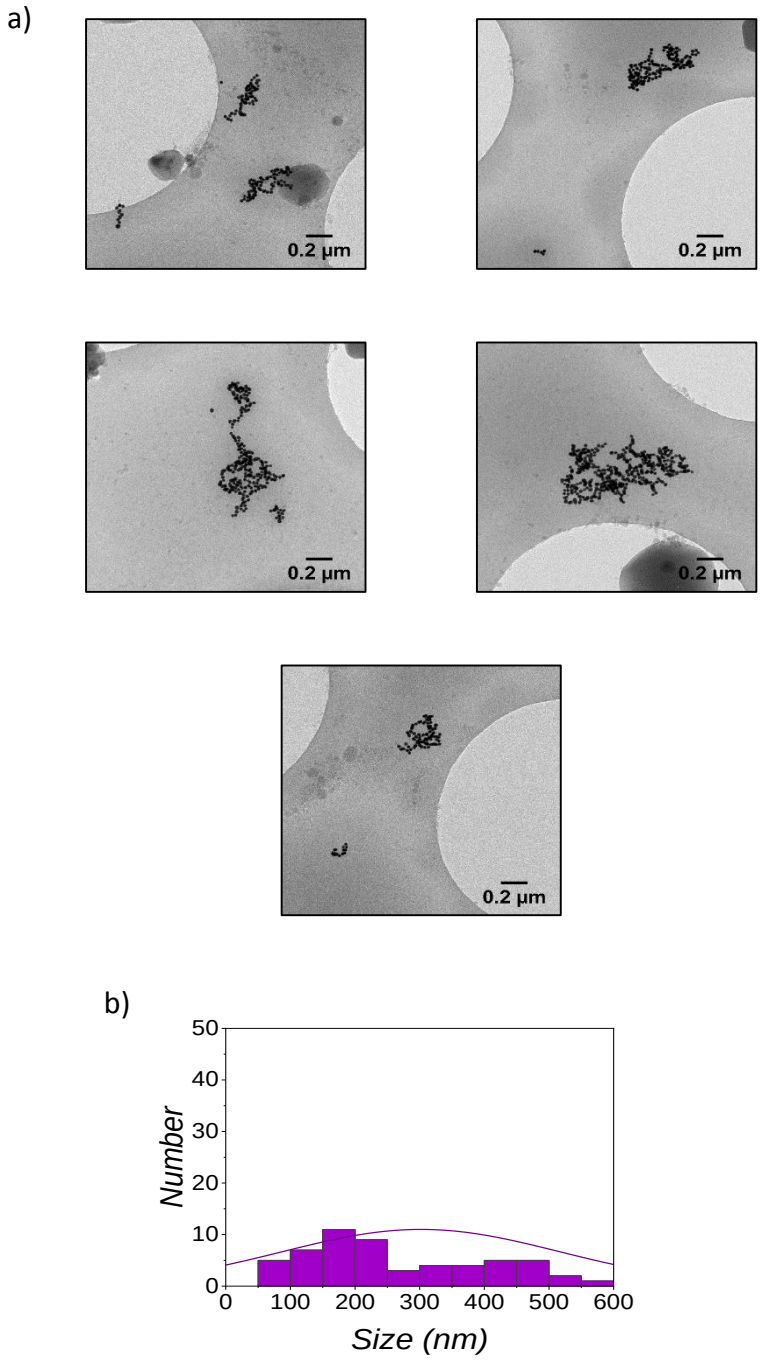


Figure S11. a) cryo-TEM images of AuNPs/$AlCl_3$ aggregates quench at t = 12000 ms. b) Size histogram of aggregates

III) Conclusion

Si dans la partie précédente, nous avons montré la possibilité d'obtenir des agrégats stables dans une large gamme de milieu plus ou moins complexes, nous avons montré ici qu'il est possible de contrôler la taille de ces agrégats en variant le temps d'injection de l'agent quenchant. Cette technique demande, cependant, un système microfluidique très précis pour atteindre des temps d'injections de l'ordre de la milliseconde, temps inaccessible pour des mélanges réalisés à la main. Ces structures sont caractérisées par des propriétés bien différentes selon le nombre d'agrégation. Cependant plus le temps de quench est court, plus la solution présente une polydispersité relativement importante avec la présence conséquente, aux temps courts, de singulets, doublets et triplets.

Si le temps de quench montre un impact sur la structure finale des agrégats obtenus, un autre paramètre pouvant modifier cette structure provient de la nature du type de polyélectrolyte mis en jeu. En effet, un polyélectrolyte linéaire permet d'assembler plusieurs nanoparticules sans contrôle précis de la structure. Un polyélectrolyte de type « peigne » pourrait, quant à lui, permettre de contrôler des paramètres comme le nombre d'agrégation ou la distance inter-particules en jouant sur la distance entre greffons et leurs longueurs. Cependant, la synthèse de tels copolymères a très peu été explorée à ce jour. Nous verrons dans le chapitre VI, les différentes voies de synthèses explorées afin d'obtenir ce type de copolymère polyélectrolyte.

CHAPITRE V

Propriétés et applications des assemblages obtenus

I) Application en photothermie

a) Introduction

Après avoir montré, dans les chapitres précédents, qu'il était possible d'obtenir de façon sobre et durable des suspensions d'agrégats stables dans le temps et présentant un maximum d'absorbance autour de 750 nm, nous avons étudié leur potentiel pour différentes applications. Les deux applications qui ont été étudiées pendant ces travaux sont la photothermie et la spectroscopie Raman exaltée de surface. Ces deux applications sont étroitement liées au domaine biomédical, la photothermie ayant pour but le traitement de cellules malades et l'analyse SERS pour la détection de biomolécules.

Les nanoparticules d'or sont présentes dans de nombreux domaines[160,161], mais nous nous intéresserons plus particulièrement au domaine biomédical dans ce chapitre. En effet, les nanoparticules d'or et leurs assemblages sont utilisées comme source nanométrique de chaleur pour des applications en imagerie photoacoustique[162–164] ou en thérapie par photothermie[164–166]. L'échauffement local photo-induit est également utilisé pour la délivrance de principes actifs[167]. Ces applications nécessitent de travailler dans des gammes de longueurs d'onde dans le proche infrarouge[168] afin de ne pas endommager de manière irréversible les tissus biologiques par exposition au laser. C'est dans cette optique que la formation d'agrégats prend tout son sens. Si la plupart des travaux traitent plutôt de nanoparticules présentant des formes « exotiques »[169–172], l'assemblage de formes simples sphériques est intéressant en raison de sa rapidité et de la possibilité de produire des agrégats à grande échelle. Le devenir des nanoparticules en milieu cellulaire a déjà été étudié avec la mise en évidence d'une biodégradabilité décroissante en fonction de la taille des nanoparticules[173]. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le but d'observer si le comportement des nanoparticules en milieu intracellulaire reste le même ou si la pré-agrégation conduit à une amélioration du système.

b) Contexte

L'utilisation de nanoparticules à visées thérapeutiques par photothermie a déjà fait l'objet de tests cliniques, notamment aux Etats-Unis avec le traitement aurolase®[174]. Le traitement consiste en l'injection de nanoparticules cœur-écorce Au@SiO_2, qui sont ensuite illuminées par un laser à 808 nm afin de traiter les tissus cancéreux de la prostate.

Ces travaux font suite à des études menées au laboratoire sur l'internalisation cellulaire de nanoparticules d'or et leur dégradation[84,173]. Ainsi il a été montré que l'internalisation de particules d'or dans les lysosomes induit une agrégation conduisant à une modification des propriétés optiques et photothermiques. Dans le cas de particules sphériques, l'agrégation permet d'amplifier l'échauffement photo-induit. En revanche, l'effet inverse a été observé pour des particules de forme plus complexe[169]. Cependant, une dose importante de

nanoparticules est nécessaire pour obtenir une agrégation suffisamment conséquente. Par ailleurs, il a été démontré qu'après internalisation cellulaire, les agrégats de nanoparticules obtenus sont caractérisés par une dimension fractale très élevée ($D_f \approx 2,9$) et donc des propriétés qui ne sont pas optimales. Si l'internalisation de particules individuelles a été bien étudiée, le cas de particules pré-agrégées a été moins considéré. L'objectif a été de décrire le devenir cellulaire d'agrégats de différentes tailles après internalisation et le mettre en relation avec l'évolution des propriétés photothermique/photoacoustique. L'idée de pré-agréger les nanoparticules a été imaginée pour fixer dès le départ une structure optimale permettant de maximiser l'échauffement par unité de matière afin de minimiser les doses injectées.

Les travaux qui seront présentés visent donc à observer si l'internalisation d'agrégats stables permet d'obtenir les mêmes propriétés pour une quantité d'or internalisée moins élevée, mais aussi à observer l'impact de l'internalisation sur la structure des agrégats.

Il est important de préciser que suite à la pandémie, les études ne sont pas arrivées à leur terme. La suite qui était envisagée sera explicitée dans la conclusion et perspective.

Ce travail a été effectué en collaboration avec Florence Gazeau et Nathalie Luciani, notamment pour la formation concernant les méthodes expérimentales.

c) Système cellulaire et agrégats étudiés

La photothermie étant principalement considéré pour le traitement du cancer, nous avons choisi de travailler avec des cellules du cancer colorectal murin (CT26) (Passage < P17) dont la culture était bien maîtrisée dans l'équipe.

La culture cellulaire a été réalisée dans un milieu de culture DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium) contenant 10 % SVF (serum de veau fœtal) et 1 % de Streptomycine/pénicilline. Les cellules sont incubées sous atmosphère à 5 % de CO_2 à 37 °C.

Les nanoparticules internalisées sont des nanoparticules d'or citratées de 23 nm de diamètre MET. L'internalisation a été menée avec des particules individuelles et des particules pré agrégées avec du chitosan quaternisé. Il est important de préciser que ces travaux ont été réalisés avant l'étude de la stabilité des agrégats dans le milieu de culture cellulaire. En effet, le polymère servant à stabiliser les agrégats est le chitosan quaternisé, mais l'utilisation d'acide hyaluronique aurait été une meilleure option. Le chitosan a été choisi car c'est un composé utilisé dans le domaine biomédical à la fois comme biocide[175] mais aussi comme agent de couplage pour la transfection[176]. Ainsi les agrégats typiques impliquent en moyenne 100 nanoparticules par agrégats. Les quantités d'or internalisées (avec ou sans pré-agrégation) sont les suivantes : 3 – 8 – 16 - 32 et 48 µg/mL. Pour les agrégats, la quantité de polymère est de 2,6 - 6,6 - 13,1 - 26,3 et 39,4 µg/mL.

L'internalisation des nanoparticules a été réalisée en mélangeant la solution avec du milieu de culture. Après 24 h sous atmosphère à 5 % de CO_2, le milieu a été enlevé puis les cellules ont été rincées au PBS (phosphate buffer saline) et remises dans du milieu DMEM/SVF/SP.

d) Méthodes

➢ Activité métabolique / viabilité cellulaire :

L'activité métabolique cellulaire a été mesurée grâce au test Alamar bleu. Ce test consiste à mesurer l'activité mitochondriale de la cellule qui, par réduction irréversible, permet de passer de la molécule de résazurine qui est faiblement fluorescente à la molécule de résorufine fortement fluorescente (Figure V.1).

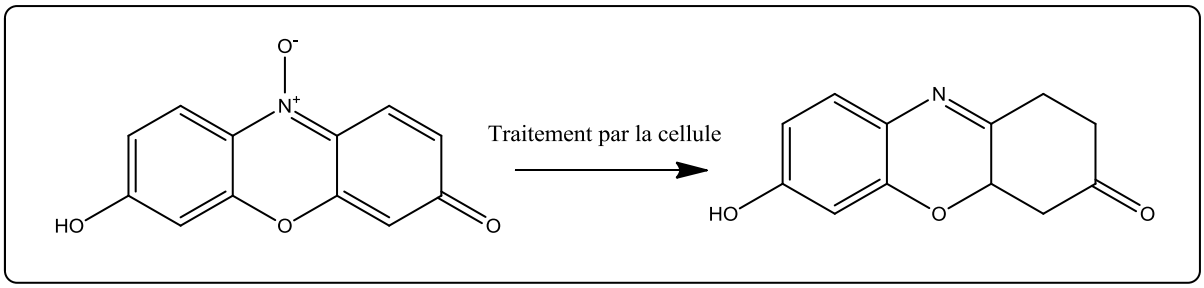


Figure V.1. Traitement de la molécule de résazurine par la cellule.

Après incubation, le surnageant a été retiré et les cellules ont été lavées au PBS. Puis du bleu d'Alamar dilué à 1/10 dans du milieu de culture sans rouge de phénol a été ajouté. Chaque condition a été réalisée en triplicat, dont une condition contrôle mesurant le signal généré par des cellules non exposées aux nanoparticules, puis analysées en fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 570 nm et une longueur d'émission de 585 nm. La viabilité cellulaire a été déterminée par le calcul suivant :

$$Viabilité(\%) = \frac{\overline{fluorescence_{Cell/AuNPs}}}{\overline{fluorescence_{Cell}}} * 100$$

Avec $\overline{fluorescence}$ la moyenne des valeurs de fluorescence

➢ Imagerie cellulaire :

L'internalisation des nanoparticules dans les cellules a été observée en microscopie électronique en transmission sur coupe microtome (Figure V.2).

Après incubation, le surnageant a été retiré puis les cellules ont été lavées plusieurs fois au PBS. Les cellules ont ensuite été fixées dans un tampon de cacodylate de sodium à 0,1 mol/L contenant 2,5 % de glutaraldéhyde. Après une heure, les cellules ont été rincées trois fois avec une solution de cacodylate de sodium à 0,1 mol/L puis stockées dans le frigo à 4 °C. Les échantillons ont ensuite été envoyés à Christine Longin au laboratoire MIAM2 (microscopie et imagerie des micro-organismes, animaux et aliments) de l'INRA à Jouy-en-Josas pour la suite des traitements. Ceux-ci consistaient au marquage au tetroxyde d'osmium (OsO_4) à 1 %, une déshydratation, une inclusion dans une résine Epon, une coupe par ultra-

microtome et un dernier contraste à l'acétate de plomb. Les clichés ont été réalisés sur un microscope Hitachi HT7700 opérant à 80 keV.

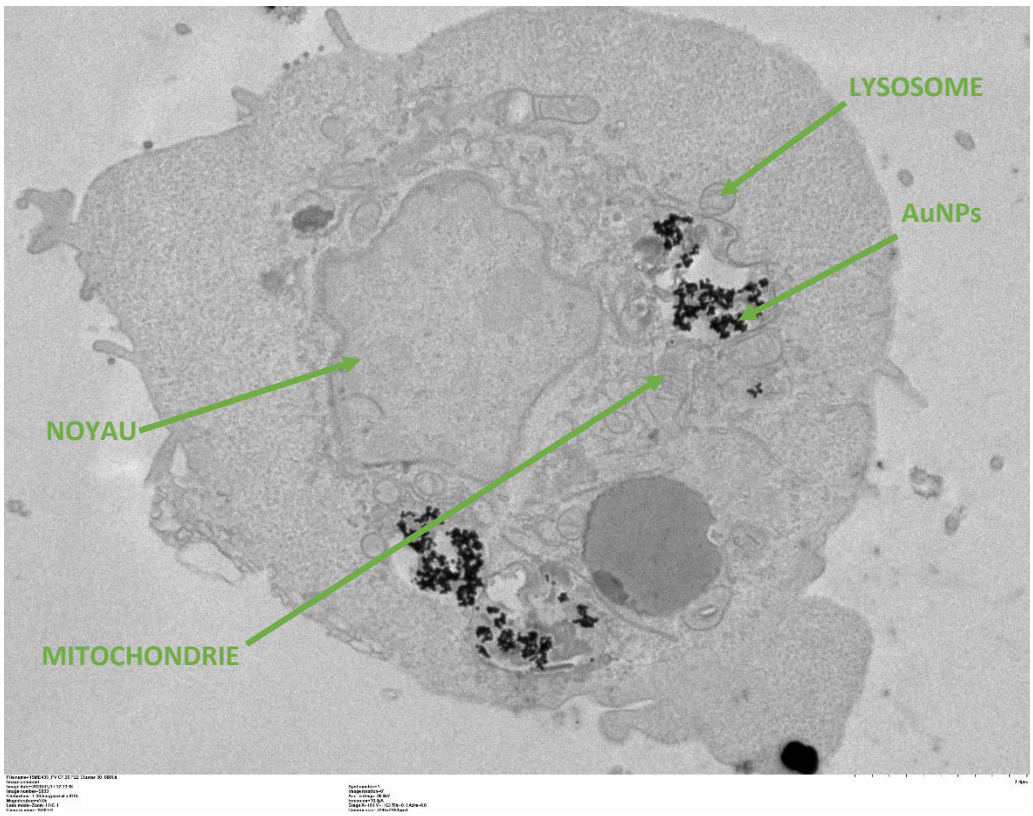


Figure V.2. Cliché de microscopie électronique d'une cellule avec la présence de nanoparticules d'or internalisées.

- Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) :

Cette technique d'analyse permet de déterminer la quantité d'or par cellule. La source de l'ICP-AES est un plasma, souvent de l'argon, généré par couplage inductif. L'argon permet d'éviter une recombinaison avec les espèces chimiques en plus de posséder une énergie d'ionisation élevée. L'échantillon est envoyé dans un nébuliseur avant d'être ionisé par le plasma.

Après incubation, les cellules ont été lavées plusieurs fois au PBS, puis détachées avec une solution de trypsine. Une très faible quantité a été introduite sur une cellule de Malassez. Cette cellule permet, à partir d'un quadrillage, de compter le nombre de cellules pour remonter à la concentration en cellules (Figure V.3).

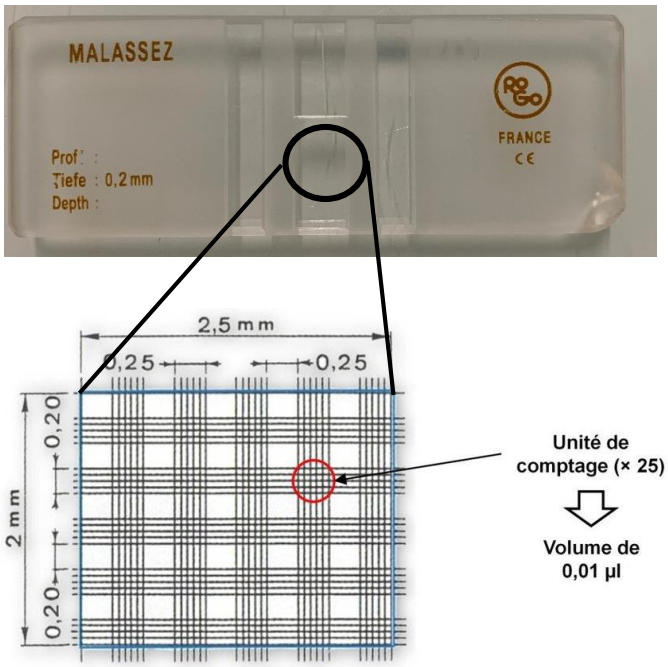


Figure V.3. Photo d'une cellule de Malassez permettant de remonter à la concentration en cellule.

À la solution de cellule (500 µL) a été ensuite ajouté un mélange HCl/HNO_3, dans lequel l'échantillon a été minéralisé par chauffage dans un bain d'huile jusqu'à l'obtention d'un dépôt solide. 0,5 mL d'acide chlorhydrique ont été ensuite ajoutés pour permettre la solubilisation de l'or, puis 12 mL d'eau milliQ

La quantité de cellules a été calculée de la manière suivante à partir des résultats de Malassez :

$$N_{cell} = [cellule_{malassez}] * 500$$

Les analyses ICP-MS donnant une concentration d'or en µg/L donc :

$$m_{or} = [Or_{ICP}] * 0.0125$$

La concentration en or par cellule (g/cellule) se déduit donc par :

$$[Or_{cell}] = \frac{m_{or}}{N_{cell}}$$

- <u>Photothermie :</u>

Les expériences de photothermie ont été réalisées en observant l'échauffement des parois d'un eppendorf contenant l'échantillon à l'aide d'une caméra infrarouge FLIR R7000. Les cellules/or ont été mises en suspension dans 100 µL de PBS dans un eppendorf de 500 µL, puis

ont été irradiées par un laser placé à 4 cm opérant à 2 W/cm^2, la limite pour les applications biomédicales étant de 5 W/cm^2 (Figure V.4). Des mesures ont aussi été réalisées sur des cellules sans nanoparticules, servant de contrôle.

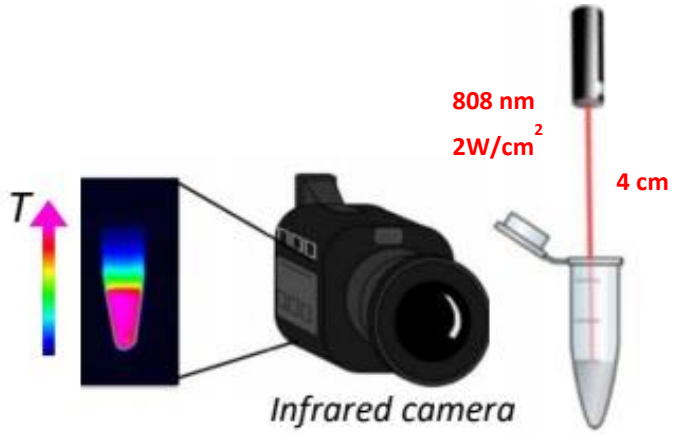


Figure V.4. Représentation schématique du montage expérimental pour les mesures en photothermie.

e) Résultats

L'incubation de nanoparticules dans les cellules ne présente pas de caractère cytotoxique très important. En effet, l'activité mitochondriale reste supérieure à 80 % même pour les plus hautes concentrations en nanoparticules. Cependant, la concentration en polymère a une forte influence sur la viabilité cellulaire. En effet à partir d'une concentration de 13,1 µg/mL, la viabilité cellulaire n'est que d'environ 80 % avant de chuter à 70 % pour une concentration en chitosan quaternisé de 39,4 µg/mL (Figure V.5).

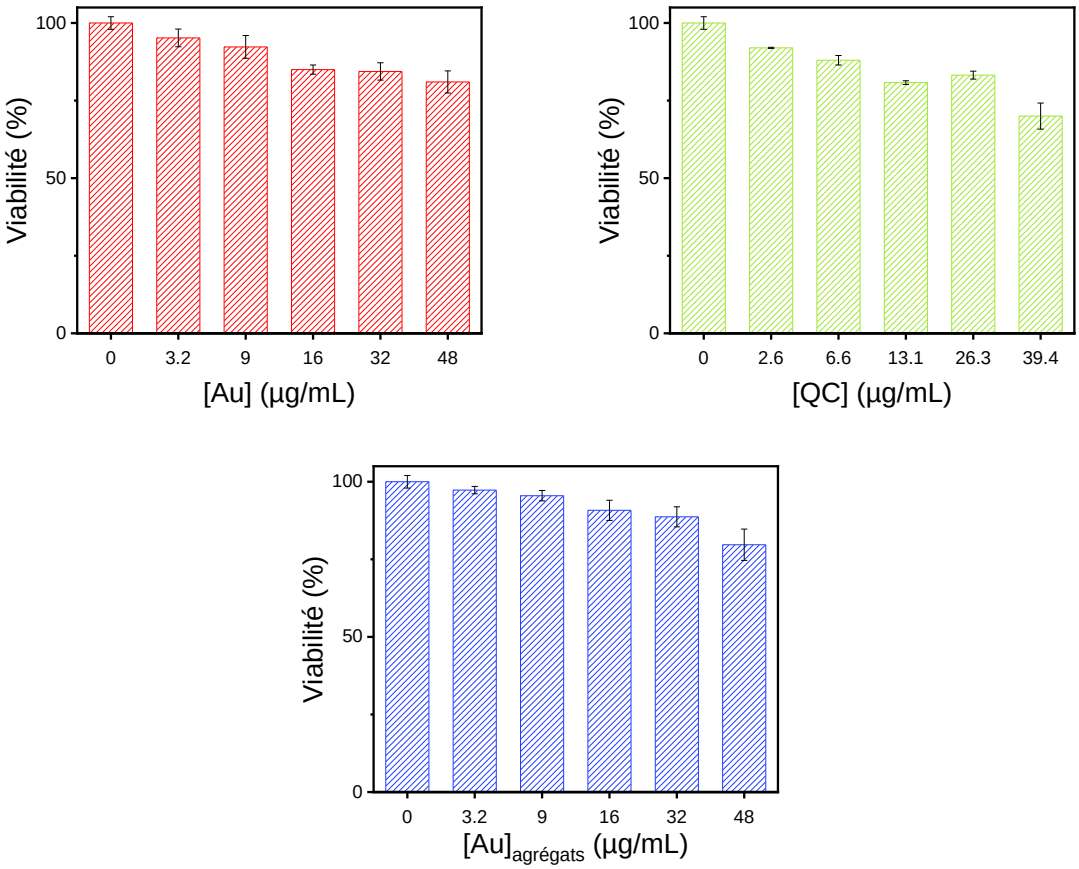


Figure V.5. Viabilité cellulaire mesuré à partir du test d'Alamar blue en fonction de la quantité de AuNPs et QC dans le milieu de culture avant internalisation.

Ce résultat n'est pas forcément surprenant. En effet, les polycations ont tendance à présenter un caractère cytotoxique vis-à-vis des cellules par modification de la structure membranaire par interaction avec le PEL[177]. Les travaux de Zubareva et al.[178] montrent un caractère nocif de polycations tels que le chitosan quaternisé vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires, cette toxicité augmente très rapidement en fonction de la concentration. Par ailleurs, on peut noter aussi dans ces travaux une meilleure pénétration intracellulaire du chitosan succinate avec une toxicité nulle. Ceci confirme l'intérêt de travailler avec des agrégats stabilisés avec un polyanion plutôt qu'un polycation afin de préserver l'activité des cellules et de minimiser la cytotoxicité.

Les mesures d'ICP-MS montrent que la quantité de nanoparticules d'or présentes dans les cellules est plus importante lorsqu'elles sont pré-agrégées et stabilisées avec le polymère (Figure V.6).

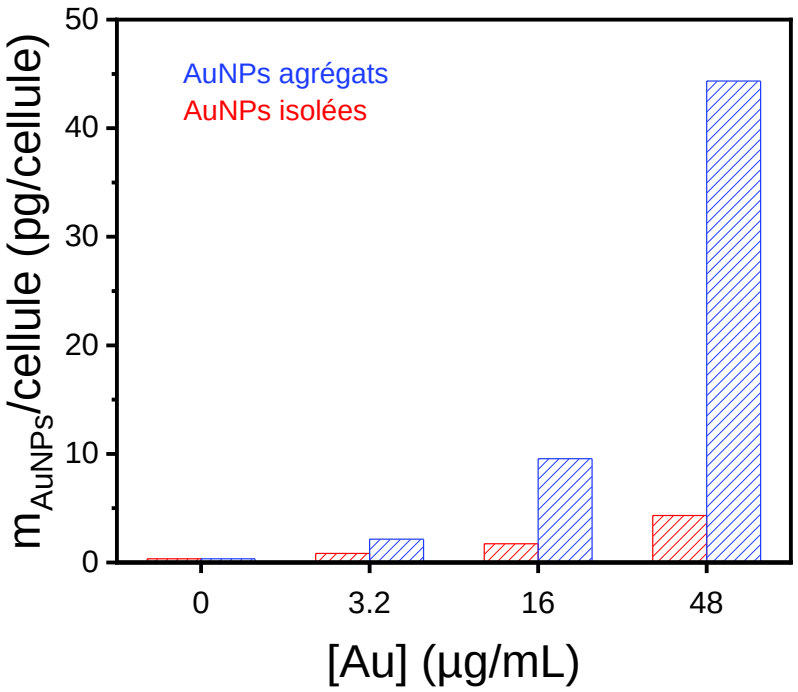


Figure V.6. Mesures ICP-MS sur des nanoparticules d'or isolées ou pré-agrégées internalisées dans des cellules CT26.

En effet pour une concentration d'or initiale (dans le milieu de culture) de 48 µg/mL, les mesures en ICP donnent une concentration en or par cellule de [Au] ≈ 44 pg/cell pour des nanoparticules pré agrégées contre seulement [Au] ≈ 4 pg/cell pour les nanoparticules isolées. Ce résultat ne traduit pas forcément une meilleure capacité d'internalisation d'un agrégat en comparaison d'une particule.

Par ailleurs, dans le chapitre III (article 1, figure 3d), il a été montré qu'après 12h dans le milieu de culture, les agrégats recouverts de QC ont intégralement sédimenté. L'incubation des nanoparticules/agrégats ayant lieu sur 24 h, il est donc probable qu'une plus grande quantité d'agrégats soient internalisée à cause de leur forte concentration au voisinage immédiat des cellules.

Les cellules ont ensuite été imagées en microscopie électronique afin de déterminer dans un premier temps, l'impact de l'incubation des nanoparticules pré agrégées ou non sur l'aspect des cellules et de leurs lysosomes, puis dans un second temps, l'impact de l'internalisation sur la structure des agrégats (Figure V.7).

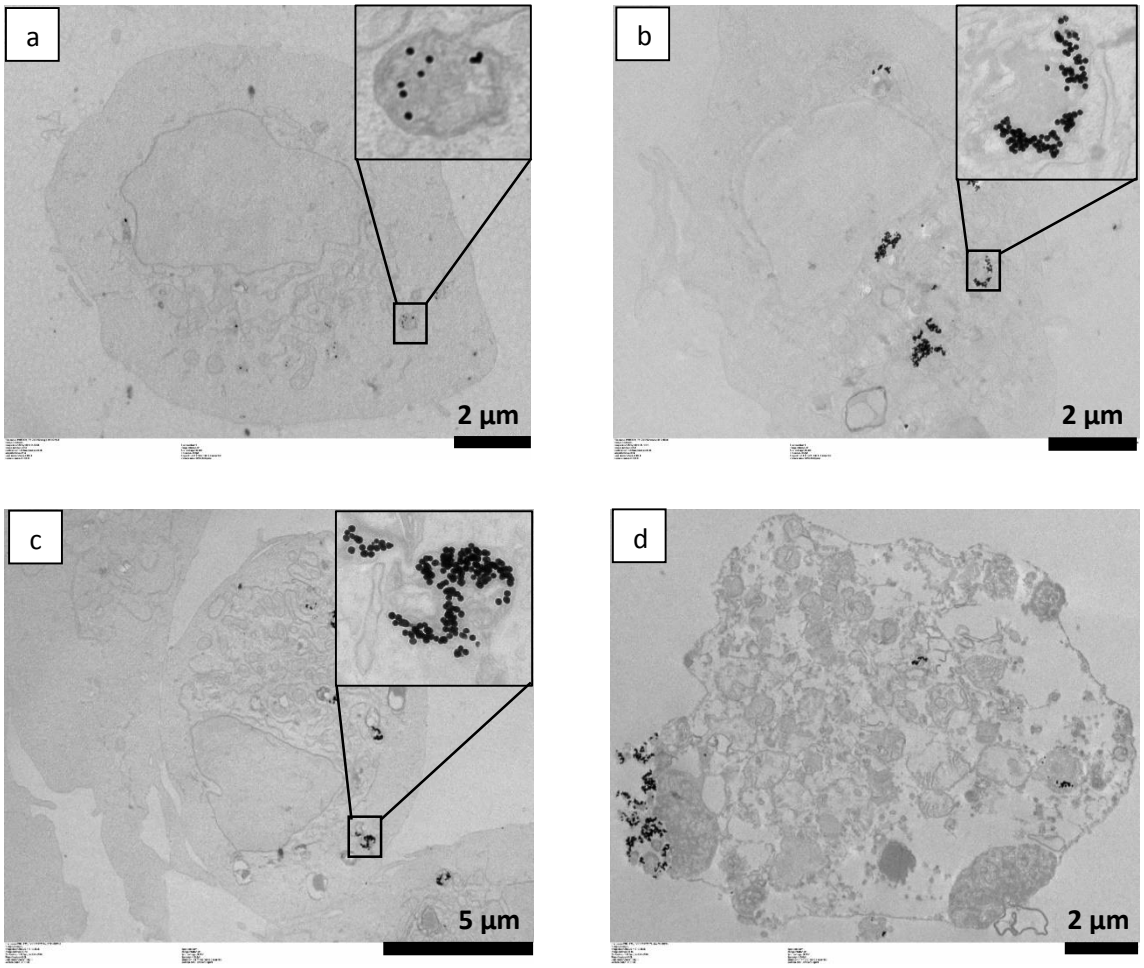


Figure V.7. Clichés MET de cellules après incubation dans des milieux contenant différentes concentrations en or : [Au] = 16 µg/mL (a) isolées (b) pré agrégées et [Au] = 48 µg/mL (c) isolées (d) pré agrégées.

Dans le cas des nanoparticules seules, les clichés de microscopie électronique permettent de confirmer une faible internalisation et une conservation de l'intégrité. À forte concentration, les particules sont localisées dans des vésicules intra cellulaire que l'on qualifiera de lysosome par analogie avec les études passées. Dans le cas de nanoparticules pré agrégées, l'internalisation est visiblement plus importante. Cette fois, on observe une déformation importante des membranes, voire la mort cellulaire pour des concentrations plus élevées. L'imagerie confirme la tendance observée lors du test d'Alamar blue concernant l'impact du polycation sur la cellule.

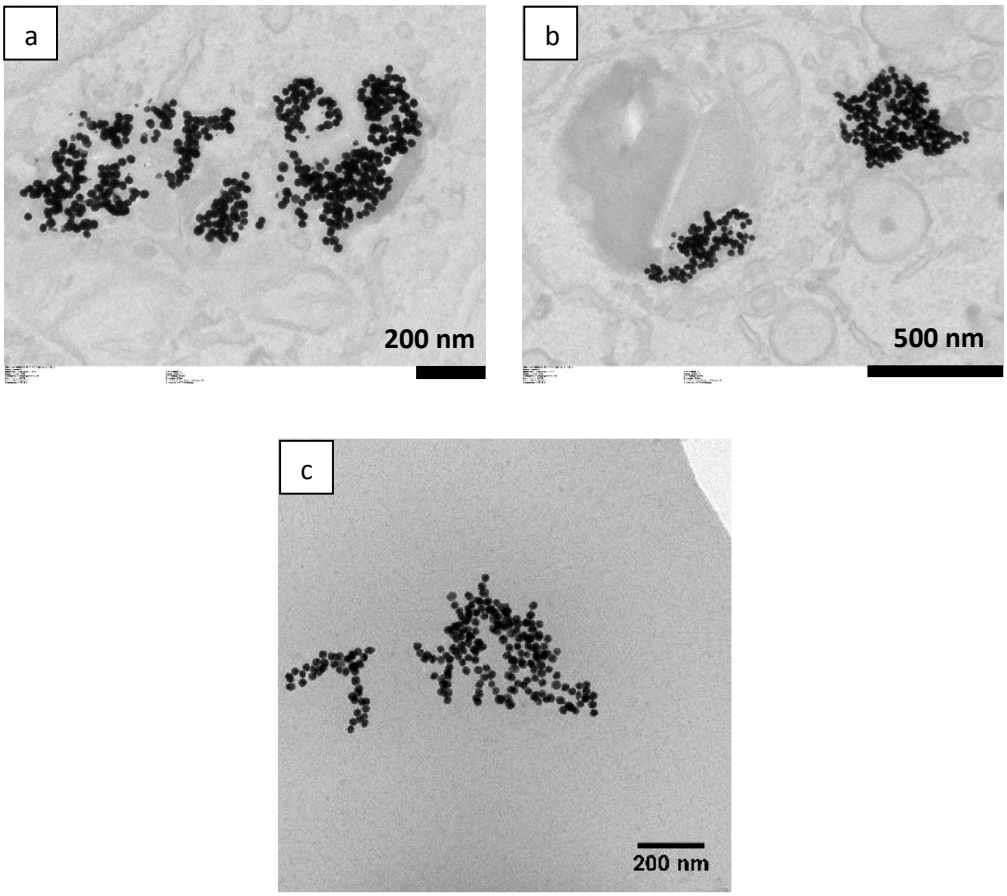


Figure V.8. Clichés MET d'agrégats de nanoparticules d'or (a et b) après internalisation cellulaire [Au] = 16µg/mL et (c) en solution aqueuse.

Si l'internalisation de nanoparticules d'or conduit à l'agrégation de ces dernières jusqu'à obtenir des objets denses, la tendance observée pour des nanoparticules pré agrégées est à peu près similaire. En effet, les agrégats conservent globalement leur taille initiale aux alentours de 300 nm, mais l'internalisation dans les lysosomes conduit à une densification des structures obtenues initialement en solution (Figure V.8).

Les expériences de photothermie ont été réalisées sur des cellules après internalisation de nanoparticules d'or isolées ou pré agrégées, à deux concentrations [Au] = 16 µg/mL et 48 µg/mL (Figure V.9).

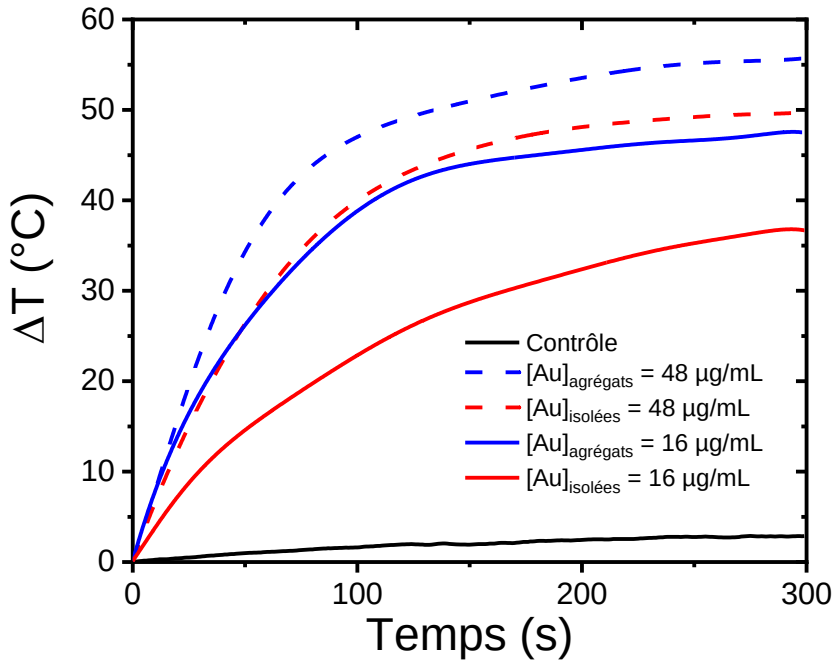


Figure V.9. Courbes de photothermie sur des cellules seules (courbe noire), après internalisation de AuNPs à [Au] = 16 µg/mL (courbe rouge) et 48 µg/mL (pointillé rouge), après internalisation d'agrégats à [Au] = 16 µg/mL (courbe bleue) et [Au] = 48 µg/mL (pointillé bleu).

L'internalisation des agrégats de nanoparticules conduit à des augmentations de température plus importantes que dans le cas des nanoparticules seules. Cette tendance peut, en grande partie, s'expliquer par la quantité plus importante d'or internalisé dans les cellules lorsque ces dernières sont pré agrégées.

Ces premières études ont montré une amélioration globale des propriétés thermiques lorsque les nanoparticules internalisées sont pré agrégées. Cependant, le caractère toxique apporté par le polycation vis-à-vis des cellules ne permet pas de valider ce système pour des applications biomédicales.

Il serait tout de même intéressant de réaliser ces mêmes expériences pour des agrégats stabilisés par un polyanion (acide hyaluronique) qui montre des propriétés de stabilité accrues dans le milieu de culture (chapitre III). Par ailleurs, l'utilisation de polyanions peut permettre de contourner le problème de toxicité.

Une suite intéressante, qui n'a pu être réalisée suite au COVID, serait de marquer les cellules avant les expériences de photothermie pour ensuite visualiser en microscopie confocale, la mort cellulaire et différencier les morts par apoptose et par nécrose[84].

Enfin, les expériences de photothermie pourraient être réitérées avec le nouveau montage expérimental permettant un meilleur contrôle de paramètres comme le rayonnement. Ce montage permet de réaliser des mesures dans une boîte noire permettant de s'affranchir des pollutions externes. Par ailleurs, un nouveau support échantillon a été réalisé afin de maintenant une distance constante et fixe entre l'échantillon et la sortie de la fibre laser. Ce

système pourrait encore être amélioré par un système permettant de réguler la température afin de travailler, par exemple, à 37 °C dans le cas de cellules.

II) Spectroscopie Raman Exaltée de Surface (SERS)

a) Introduction

Un autre point étudié dans ce chapitre est le potentiel des agrégats pour l'analyse par spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS). En effet, comme évoqué dans le chapitre I, le couplage de nanoparticules conduit à la présence de points chauds où le champ électrique est très fort. Cet effet permet d'exalter des signaux optiques de fluorescence ou Raman. Dans ce dernier cas, l'exaltation peut atteindre un facteur 10^{14} en condition optimale[179]. En conséquence, l'amélioration de la sensibilité permet la détection de concentration variant du µM au fM[180–183]. Il est même possible, dans certaines conditions, de détecter une molécule unique[184]. Actuellement, plusieurs techniques d'analyse sont couramment répertoriées pour la quantification. On peut, par exemple, citer la spectrométrie de masse. Cette méthode est une méthode destructive donnant des informations qualitatives et quantitatives sur la composition atomique et moléculaire. Elle présente une limite de détection de l'ordre du µg/L. Cette méthode présente certains inconvénients tels que la nécessité de travailler avec des échantillons ne présentant pas d'espèces ioniques pouvant interférer avec la mesure ou des préparations d'échantillons qui peuvent parfois durer plusieurs journées et ne permettant donc pas l'analyse rapide d'un grand nombre d'échantillons. Dans l'optique de réaliser rapidement des analyses qualitatives et quantitatives sans nécessairement passer par une plateforme d'analyse, la spectroscopie Raman exaltée de surface apparait comme une technique de choix. Plusieurs années après sa découverte, cette technique reste toujours un challenge dû aux nombreux paramètres pouvant influencer le signal (nature du substrat, interaction substrat/analyte, etc…). Une limitation principale provient de la nature, de la synthèse mais aussi de la stabilité du substrat servant à la mesure. Dans cette perspective, les assemblages de nanoparticules d'or réalisés pendant cette thèse présentent l'avantage d'être facilement et rapidement réalisable, à moindre coût, en plus d'être caractérisés par une bonne stabilité dans divers milieux. En effet, la durée de préparation des échantillons et des mesures n'est que de quelques minutes comparée aux techniques d'analyses pouvant prendre plusieurs heures ou jours comme la spectrométrie de masse ou la chromatographie en phase liquide.

On retrouve l'analyse SERS dans de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire[185] l'environnement[186] ou le biomédical[187–191]. Cependant, ce ne sont encore que des travaux théoriques réalisés en laboratoire.

b) Contexte

Les travaux portant sur les applications en spectroscopie Raman exaltée de surface ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de pharmacologie de l'Hôpital Européen Georges Pompidou. Dans le cadre de la thèse d'Antoine DOWEK, étudiant en thèse à l'université Paris-Saclay, ils ont essayé de développer l'approche SERS portative dans le but de doser des molécules à visées thérapeutiques principalement en oncologie dans des milieux simples et/ou complexes afin d'obtenir des résultats rapides pour garantir une meilleure qualité des préparations ou un ajustement des thérapeutiques en temps réel. Leur première approche consistait à agréger des nanoparticules d'argent polydisperses en taille et en forme dans un tampon citrate pour l'analyse de la molécule de 5FU[192]. Une deuxième approche a consisté en l'analyse de la molécule d'épinéphrine en agrégeant des nanoparticules d'or polydisperses par acidification de la solution en ajoutant de l'acide chlorhydrique. Dans ce contexte, ils ont pris contact avec nous suite à une visite du laboratoire initiée par Amanda Brun en 2019. Leur motivation était à la fois de mieux contrôler la taille des nanoparticules mais aussi de former des agrégats stables dans le but d'accroître la reproductibilité et la stabilité des mesures dans le temps.

Dans cette collaboration, j'ai pris la responsabilité des synthèses et de la préparation des agrégats dans différents milieux en présence d'épinéphrine tandis que Antoine DOWEK était responsable de l'acquisition des données SERS et de leur traitement statistique.

La réalisation des assemblages et leur étude dans ce domaine d'application ont donné lieu à la rédaction d'un article présenté dans la partie suivante.

c) Self-assembly of gold nanoparticles by quaternized chitosan in solution to improve surface enhanced Raman spectroscopy sensing of epinephrine

Il est important de préciser que l'article qui suit est encore en cours de rédaction. Il est donc susceptible d'être modifié et peut donc présenter quelques défauts. Il permet cependant d'exposer le travail qui a été réalisé concernant l'utilisation des agrégats pour la spectroscopie Raman exaltée de surface.

Self-assembly of gold nanoparticles by quaternized chitosan in solution to improve surface enhanced Raman spectroscopy sensing of epinephrine

Journal : Talanta (full paper)

Antoine Dowek[1⊥], Florent Voisin[2⊥], Laetitia Minh Mai Le[1,3], Jean Maurice Mallet[4], Celine Tan[3], Florent Carn[2]*, Eric Caudron[1,3]*

[1]Université Paris-Saclay, Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France

[2]Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, Université de Paris, CNRS, Paris, France

[3]Service de Pharmacie, Hôpital Européen Georges Pompidou, APHP, Centre Université-Paris, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France

[4]Laboratoire des Biomolécules, UMR 7203, Ecole Normale Supérieure, PSL Research University, Sorbonne Universités, CNRS, Paris, France

[⊥]Equal contribution

*Corresponding auhtor

Highlights:

- Improvement of surface enhanced Raman spectroscopy analysis by aggregation / self-assembly optimization.
- Controlling aggregation process by using a specific polymer for a more simple and reliable analysis.
- Design of experiments by Box-Behnken design to fixe optimized conditions to increase signal sensibility.
- Signal stability in matrices used in practice to prepare intravenous drug.

I. Introduction

The development of sensitive and mobile analytical methods is a current challenge to identify and quantify analytes regularly over time *in situ* in addition to classical methods immobilized in laboratory such as Mass or Optical Emission Spectroscopy. Such methods are particularly needed in the fields of food safety, chemical remediation in the environment and medicine. In the latter case, a continuous monitoring of the concentration of physiologic, pathogenic or therapeutic agents in biological media could make it possible to adapt patient care and drug management in real time in the hospital. Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) appeares to have the potential to combine sensitivity, selectivity and portability for a limited cost. Indeed, in optimized conditions the amplification of Raman signal in close vicinity of metallic nanostructures[1] could reach 10^{14} allowing the detection and identification of a single molecule[2]. This requires SERS-active nanostructures with regions where the electric field is amplified (*i.e.* gap or tip effect) and where the analyte can access.

Fifty years after its discovery, applications of SERS for quantitative discrimination and quantification[3] is still challenging due to the large number of parameters influencing the enhancement of Raman signal[4] : nature, size and shape of SERS substrate, interaction between nanostructure and analyte, environmental interaction, wavelength of the exciting light. Thus, despite its great potential, the use of SERS is currently limited to exploratory studies in research laboratories.

One limitation concerns the nature of the SERS-active material and its synthesis. In the perspective of repeated *in situ* measurements, the controlled aggregation[5–9] of plasmonic particles in solution has an advantage over solid plasmonic substrates, which are more expensive and appear to be more suitable for laboratory measurements than for repeated measurements in the field. However, the synthesis of such plasmonic aggregates must be able to be done quickly and reproducibly by a non-chemist user. Ideally, the cost of the synthesis should be minimized to perform many measurements, including in developing countries where the laboratory techniques mentioned at the beginning are not available.

There are many methods for the controlled assembly of particles in solution. However, if we exclude the methods requiring a functionalization of the particles or the application of an external force field because of their cost and the difficulty of implementation, the approaches based on electrostatic assemblies seem the most credible. However, in this case, the most promising aggregates are also those with the lowest colloidal stability. Indeed, these aggregates are those that minimize the inter-particle distance and they are generally obtained in the vicinity of the isoelectric point (IEP) where the total charge of one partner is compensated by the total charge of the other partner.

In this study, we have assembled citrate coated gold nanoparticles (AuNPs) in nanometric aggregates by electrostatic complexation with oppositely charged long polyelectrolyte chains (PEL) of biological origin. This choice was motivated by the possibility of forming open fractal structures that facilitate access of the analytes to the hot spots and that present a maximum of absorption around 800 nm. Concerning the choice of AuNPs, we underline that AuNPs suspension as a large-scale European multi-instrument interlaboratory study[10,11] recently demonstrated that using AuNPs coupled with exciting light at 785 nm were optimized conditions for reproducible quantitative analysis. Another study previously described quantitative analysis using AuNPs, handled Raman spectrometer reaching limit of quantification about microgram per milliliter.

The originality of our method of assembly is to first form globally neutral aggregates around IEP before stabilizing them, without structural modification, by the addition of polyelectrolyte chains. The purpose of the article is to study the potential of this type of aggregate as SERS-active material. As

a case study, we have considered the detection of epinephrine (EPI) in pure water and in more complex media used to prepare infusion preparations at the hospital (*i.e.* sodium chloride 0.9 % (NaCl 0.9 %) and glucose 5 % (G5)). Experiments were explored and optimized by Box-Behnken design of experiments (BB DoE) to find experimental conditions that maximize enhancement of Raman signal intensity and stability over time.

Our main result is that globally neutral aggregates could be stabilized at a nanometric size by the subsequent addition of polyelectrolyte chains and allows for significant Raman signal enhancement in environments of varying complexity. In optimized condition, it was possible to prepare the SERS active material and measure a stable signal at a concentration as down as C_{EPI} = 0.1 µg/mL in less than 5 min. Based on a few measurements, a strong correlation between intensity and logarithm of the concentration has been identified which subsequently suggests a possible quantification with linear model. Furthermore, a signal persists in more complexes media practically used to prepare intravenous drug. This represents a particularly interesting application that would allow direct analysis of drugs in their reconstitution or dilution media and may also open the way to analysis in biological media.

II. Experimental

a. Chemicals

Gold (III) chloride trihydrate ($HAuCl_4.3H_2O$, > 99.99 %), trisodium citrate dihydrate ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$, ≥ 99 %), acetone (C_3H_6O, 99.5 %), (QC) was synthesized from chitosan ($C_8H_{13}NO_5$, degree of N-deacetylation ≈ 75 %, Mw ≈ 380 kg/mol according to size exclusion chromatography) purchased from Sigma-Aldrich. All solutions were prepared with milliQ water (R = 18.2 MΩ). Epinephrine (EPI) was purchased from Aguettant and was prepared in different media: water, isotonic sodium chloride at 0.9 % (NaCl 0.9 %) and glucose 5 % (G5) obtained from Fresenius-Kabi.

b. Gold nanoparticles synthesis and characterization

Citrate stabilized gold nanoparticles were first synthesized by sequential growth protocol. Briefly, citrate was put into 150 mL of water to obtain a 2.2 mM solution and refluxed at 130 °C, before adding 1 mL of a 10 $g.L^{-1}$ solution of $HAuCl_4,3H_2O$. The heating was cooled down to 90 °C. The seeds have their size increased by repeating several growing cycles as followed: 55 mL of the solution were withdrawn, followed by the addition of 53 mL of water and 1 mL of a 60 mM citrate solution. 1 mL of $HAuCl_4$ were added and the solution was stirred for 30 min. These growing cycles were repeated up to the desired size of AuNPs. Typically, 6 cycles were required to obtain particles with a diameter D ≈ 56 nm. Between the seeds and the sixth cycle, calculated gold nanoparticles concentration varies from 5.8×10^{10} $NPs.mL^{-1}$ to 9.0×10^{11} $NPs.mL^{-1}$. NPs were characterized in DLS, electrophoretic mobility, UV-Vis and cryoTEM. The characterization of the NPs used in this study are presented in figure S1 of the supporting information (SI).

c. Quaternized chitosan synthesis

Quaternized chitosan (QC) was synthetized in aqueous medium by ring opening between the chitosan's primary amine and the epoxy cycle of glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC).

The protocol was adapted from literature[12,13]. In a 250 mL two necked round bottom flask, 6 g of chitosan powder (see Materials section) was dispersed in 60 mL of milliQ water at 85 °C at reflux with a heating mantle for 2 hours leading to a suspension of partially solubilized chitosan (pH ≈ 6.5). Then, 6.20 mL of glycidyltrimethylammonium chloride, noted GTMAC, were added three times every two hours. The viscous yellow mixture was kept under magnetic stirring at 800 rpm during approximately 10 h. The polymer was precipitated adding an excess of acetone and washed with acetone several times. After drying in oven at 60°C for two days, one typically recovers 16 g of the polymer in the form of a yellow vitreous solid. It was then purified by dispersion in milliQ water at pH 6.5 and dialysed (cutoff ~ 14 kDa) against milliQ water for four days to eliminate unreacted GTMAC. The water was changed every three hours. One finally recovers quaternized chitosan (QC) after freeze drying for approximately 24 h.

d. Dynamic light scattering (DLS)

Experiments were carried out with a NanoZS apparatus (Malvern Instrument) operating at λ = 632.8 nm and P ≤ 4 mW. The fluctuations of the scattered intensity with time, noted I(q,t), was measured at fixed angle Θ = 173 ° or, equivalently, at a given scattering wave vector whose norm is $q = (4\pi n/\lambda)\sin(\theta/2)$ with n the solvant refractive index. These fluctuations reflect the brownian motion of the scattering objects. I(q,t) is first transformed into the normalized time auto-correlation function of the scattered intensity: $g^{(2)}$ (q,t). For a diffusive process, $g^{(2)}(q,t) \sim e^{-2qDt}$ with D the mutual diffusion coefficient. The hydrodynamic radius, R_H, of the brownian objects is determined with the Stokes–Einstein relation. The size distribution was derived from the inverse Laplace transform of the correlation function approximated with the CONTIN algorithm[14].

e. Laser Doppler Velocimetry

Electrophoretic mobility (μ) was measured with a NanoZS apparatus (Malvern Instrument). This set-up operates with an electrical field of 25 $V.cm^{-1}$ oscillating successively at 20 Hz and 0.7 Hz to reduce the electroosmosis effect due to the surface charge of the capillary cell. The particles' velocity was measured by LASER Doppler velocimetry.

f. Ultraviolet visible near-infrared spectroscopy (UV-Vis-NIR)

Measurements were performed on a Perkin Elmer Lambda 1050 spectrophotometer. 5 mm thickness Hellma cells (quartz) were filled in by the diluted AuNPs, QC and EPI. The diffuse transmission was measured by collecting the light exiting the sample using an integrating sphere (Perkin Elmer Accessory). Spectra were corrected from the quartz cell filled in with water.

g. Cryogenic transmission electron microscopy (cryoTEM)

Images were taken on an Ultrascan 1000, 2k x 2 k CCD camera (Gatan, USA), using a LaB_6 JEOL JEM 2100 (JEOL, Japan) cryo-microscope operating at 200 kV with a JEOL low dose system (Minimum Dose System, MDS) to protect the thin ice film from any irradiation before imaging and to reduce the irradiation during the image capture. The images were recorded at 93 K.

h. SERS analysis

Analyses were performed using handled Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA, Metrohm) equipped with a 785 nm diode and a vial module at a focal length of 0.85 mm. Orbital raster scan (ORS) system allowing to measure the signal at different points in the suspensions was used. SERS signals were acquired from 400 cm^{-1} to 2,300 cm^{-1} with a spectral resolution between 12 cm^{-1} to 14 cm^{-1}.

The SERS measurements were conducted directly after the quenching step.

Raman signals are complex data to analyze, specifically in SERS analysis which introduce variability of enhancement. To avoid physical interactions, pretreatments should be used. Only a few pretreatments were applied to keep as possible the original signal: first a Savitzky-Golay algorithm was used for smoothing with first order polynomic and a window size equal to 7 and then asymmetric least square was used to remove spectral baseline with second derivative constraint equal to 6.

To evaluate signal stability, which reflect mostly the stability of interaction between AuNPs, polymer and analyte, the intensity at 1,280 cm^{-1} was monitored over time. For design of experiments, spectra were acquired at 0, 1, 2, 15, 30, 60 and 120 min. For the other acquisitions, signal was acquired with best conditions previously determined every minute during the first 10 min and then at 30, 60 and 120 min to follow the signal evolution in early stages. For each experiment, evolution of relative intensity at 1,280 cm^{-1} was observed. To determine experimental optimum conditions, a Box Behnken[15] design (BBD) was constructed to select the most significant factors that influenced the SERS signal intensity measured at 1,280 cm^{-1} which corresponds to the most intense Raman shift of EPI. Factors analyzed were: AuNPs size, EPI concentration and volume of EPI added. Because it is known that SERS signal can be not constant over time using NPs in suspension, it was decided to constructed surface response by collecting the intensities at 1,280 cm^{-1} *i)* at time = 0 min *ii)* at the maximum intensity of the range time or *iii)* by calculating mean intensities for the range time.

In BBD, the treatment combinations are at the midpoints of edges of the process space and at the center including three repetitions to estimate reproducibility for a total of fifteen experiments. Combinations of factor for each experiment are available in supplementary data. The main advantage of BBD is the reduction of the number of experiments for optimization. BBD does not contain the combinations in which all variables are on the highest or the lowest levels[16]. All statistical analysis were generated using R version 4.0.3 (2020-10-10).

AuNPs size (nm)	[EPI](µg/mL)	EPI volume (µL)	Levels
26	1	500	-1
40	5,5	1000	0
54	10	1500	+1
14	4,5	500	step

Parameters studied to validate BBD were conducted by analysis of variance: the regression model is significant if *p-value* < 0.05 coefficient and the lack of fit which measures the mismatch of the surface response constructed and should be non-significant (*p-value* > 0.05). Effects of factors were also calculated and should be significant (*p-value* < 0.05) to have an impact on the response studied.

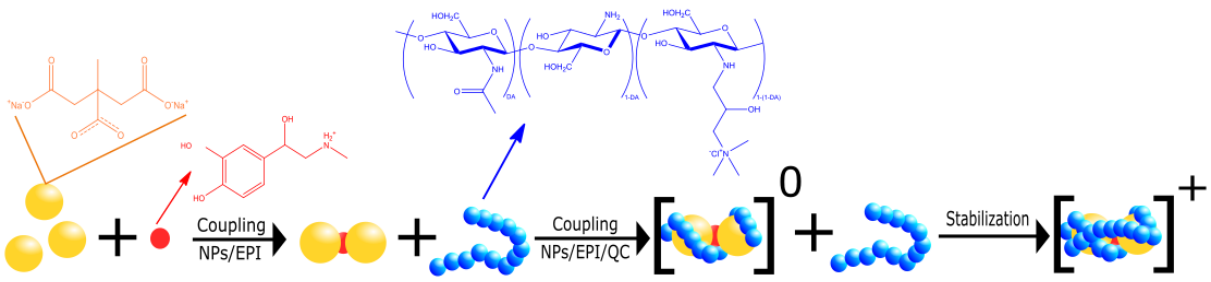
The coefficient of correlation R^2 was also estimated, it allows to determine the correlation between the experimental results and those modeled by the response surface.

Once optimum was set up, optimized conditions were used to increase sensibility and to experiment SERS signal in two media largely used to prepare intravenous therapy: NaCl 0.9 % and G5. Low concentrations of EPI were tested until 0.1 µg.mL^{-1}.

III. Results and discussion

a. Electrostatic complexation between AuNPs, EPI and quaternized chitosan.

Our methodology is based on self-assembly of AuNPs, EPI and QC by electrostatic complexation between the different partners considering that citrate coated AuNPs are anionic whereas QC and EPI (pKa = 8.6[17]) are mainly cationic for a pH lower than 8.6. The first step of the protocol consists of mixing 1.5 mL of EPI (10 µg/mL) aqueous solution and 3 mL of the citrate coated AuNPs (5.8×10^{10} NPs.mL^{-1}) suspension. The second step consists of injecting 5 µL of QC (0.5 g/L) solution to obtain AuNPs-EPI-QC^0 globally neutral complexes. In a last step, called quenching, these complexes are stabilized by a second injection of QC (1 mL at 0.5 g/L) to obtain [AuNPs-EPI-QC]$^+$ as illustrated in scheme 1. Finally, one obtains stable suspension of positively charged complex. Although this is a 3-step process, it is simple to carry out by a non-chemist outside a synthesis laboratory as it only involves mixing. We estimate the total preparation time to be 2 min by making the injections from existing solutions and mixing for 20 s at each step.



Scheme 1. Schematic illustration of the methodology used for the SERS detection of epinephrine (red) by electrostatic complexation with quaternized chitosan (blue) and citrate coated gold nanoparticles (yellow).

For simplicity, the coupling step was first performed in milliQ water with or without EPI. In this set of experiments the final concentration (*i.e.* after quenching) of the different partners was set: [AuNPs] ≈ $3.16\text{x}10^{10}$ or $4.34\text{x}10^{10}$ NP.mL^{-1}, [EPI] = 0 or 2.72 µg.mL^{-1} and [QC] = 0.09 or 0.125 g.L^{-1} (Figure 1). For the coupling step, the ratio of QC to AuNPs was adjusted to obtain neutral complexes. In the following, we show the results obtained in different media with the same batches of AuNP (R_{TEM} = 27 nm) and QC.

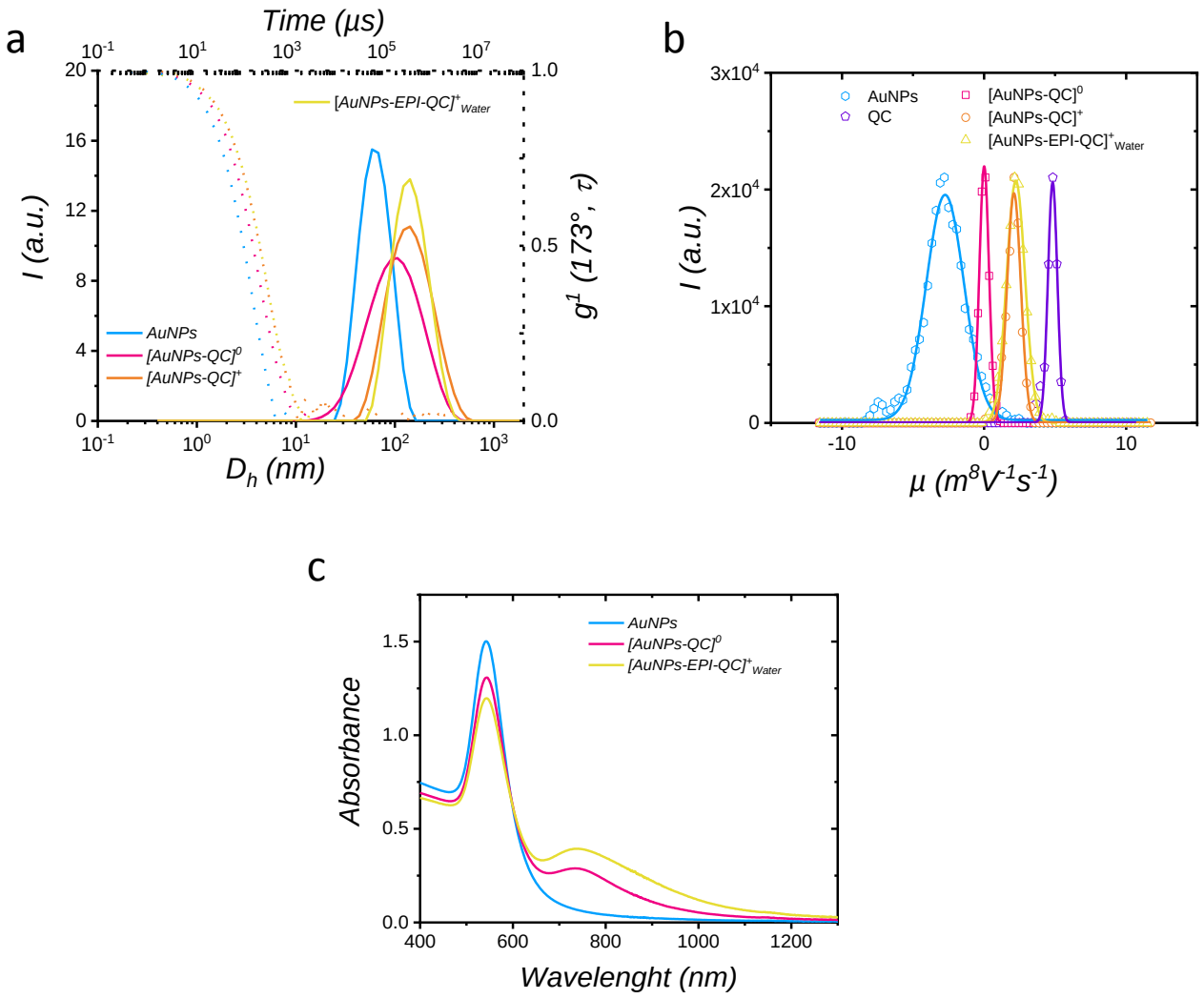


Figure 1. Characterizations of the system at the different steps in milliQ water for AuNPs, QC, [AuNPs-QC]⁰, [AuNPs-QC]⁺ and [AuNPs-EPI-QC]⁺Water. (a) Normalized autocorrelation function $g^{(1)}$ (173°, t) and corresponding distributions of the hydrodynamic diameters. (b) Distribution of electrophoretic mobility obtained by laser Doppler velocimetry. (c) UV-Vis-NIR spectra.

As shown in figure 1, in absence of EPI, the coupling of AuNPs with chitosan chains around isoelectric point (IEP) $[AuNPs\text{-}QC]^0$ makes it possible to form globally neutral assemblies of about 100 nm in a few seconds. From an optical point of view, the aggregation is characterized by a decrease of the intensity corresponding to the localized surface plasmon resonance (LSPR) of isolated particles at 524 nm and the apparition of a new plasmon band centered around 750 nm. This second band results from the plamsonic coupling of adjacent particles. In the next step (*i.e.* quenching), the addition of QC enables to obtain a suspension of cationic aggregates whose average hydrodynamic size is slightly increased ($D_h \sim 150$ nm). These increases in size and absorbance certainly reflect the progress of the aggregation process in the time between the coupling and quenching steps (*i.e.* $\Delta t \sim 30$ s). Interestingly, the addition of EPI at the first stage does not change the final characteristics of the aggregates.

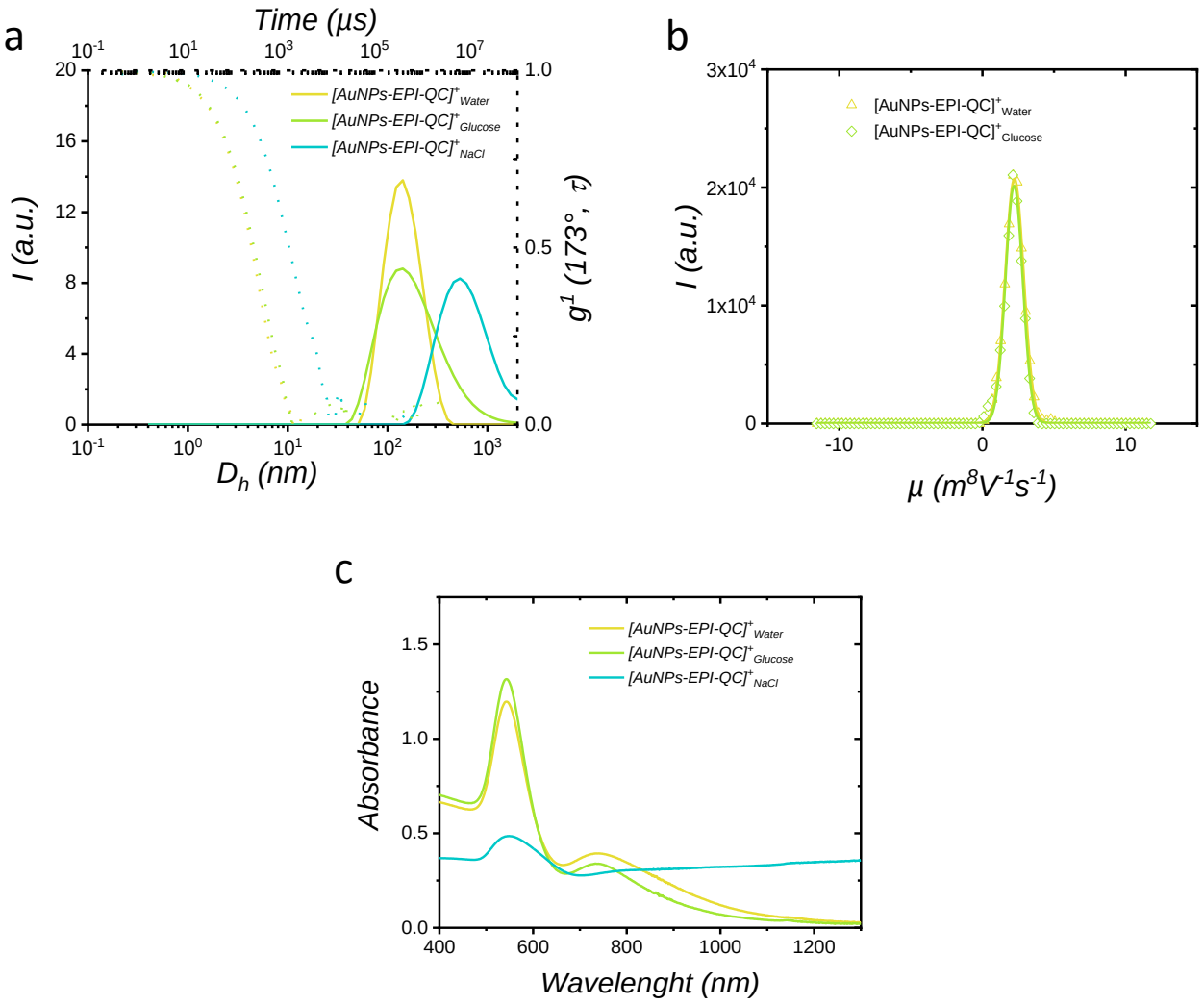


Figure 2. Characterizations of the system at the different steps in milliQ water for [AuNPs-EPI-QC]$^+_{Water}$, [AuNPs-EPI-QC]$^+_{Glucose}$ and [AuNPs-EPI-QC]$^+_{NaCl}$. (a) Normalized autocorrelation function $g^{(1)}$ (173°,t) and corresponding distributions of the hydrodynamic diameters. (b) Distribution of electrophoretic mobility obtained by laser Doppler velocimetry. (c) UV-Vis-NIR spectra.

On this positive experimental basis, we decided to move towards more complex media while keeping the same protocol. These media were glucose ([Glucose] = 37.6 mM) or NaCl solution ([NaCl] = 75.7 mM) corresponding to plasma isotonic solution. As shown in figure 2, the results obtained in the presence of glucose are very close to those previously obtained in pure milliQ water. The main difference is a small absorbance shift which may reflect the change in dielectric constant. In contrast the results obtained in presence of NaCl are significantly different with a strong increase in aggregate size (D_h ~ 530 nm) and infrared absorbance. This increase in aggregate size reflects the effect of the salt on the kinetics of electrostatic coupling.

Interestingly, we underline that in all cases the stabilization process is effective in the sense that the size of the aggregates does not change over time after the quenching step. However, the aggregates tend to sediment due to the density of the gold with kinetics depending on the size of the aggregates. This result was expected because even single particles of this size (*i.e.* R_{TEM} = 27 nm) visibly sediment after a few days.

To shed light on the structure of the aggregates in a non-distorting way, we performed cryogenic transmission electronic microscopy (cryoTEM). As expected from DLS measurements, aggregates formed in water with or without EPI involve an average number of two particles. The particles appear to be in very close contact (Figure 3a) which is consistent with the presence of an absorption band around 750 nm. The presence of EPI and glucose doesn't modify the average aggregation number and the distance between particles within the aggregates (Figure 3b). The aggregation number increases strongly with the addition of NaCl to reach an average value of 40 particles per aggregate and an average size close to 600 nm compatible with the hydrodynamic size. The spatial distribution of the mass within the aggregate is generally characterized by the mass fractal dimension d_f[22]. For a particles with a mass m_0 and a size r_0, the total mass of the assembly m scales with its radius r, measured form any site within the fractal structure, as $m(r) \propto m_0 \left({}^{r}/_{r_0}\right)^{d_f}$.These aggregates show an opened fractal structure similar to those obtained by diffusion limited cluster aggregation.

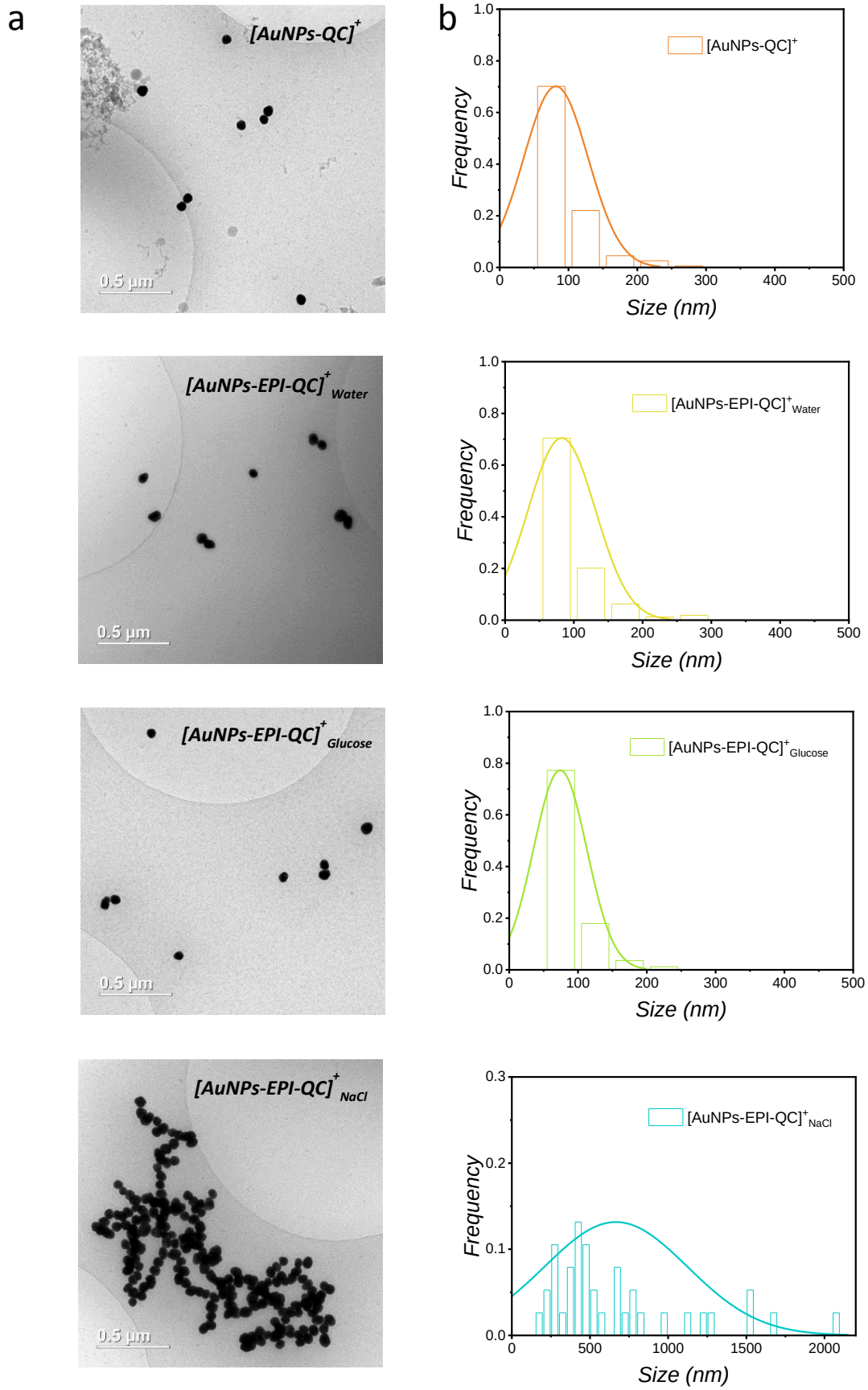


Figure 3. (a) Typical cryoTEM images of aggregates and (b) size distribution derived from cryoTEM observations.

Overall, we have shown that globally neutral aggregates comprising particles in close contact could be stabilized at a nanometric size by the subsequent addition of polyelectrolyte chains. Stable suspensions with a maximum of absorbance around 750 nm can be obtained rapidly without the size, structure and optical properties being strongly affected by the presence of EPI and/or glucose in the media. In the presence of salt, the size of the aggregates is significantly larger due to charge screening during the coupling step. In the following we will estimate the potential of these aggregates as SERS-active materials.

b. Experimental optimization of SERS measurements

To determine experimental optimum conditions a Box Behnken design (BBD) method was constructed to select the most significant factors that influenced the SERS signal intensity. For all experiments of BBD an intense signal was observed in SERS compared to an absence of Raman signal for EPI at 1 mg/mL. Spectra for all BBD experimental conditions are represented in Figure 4.:

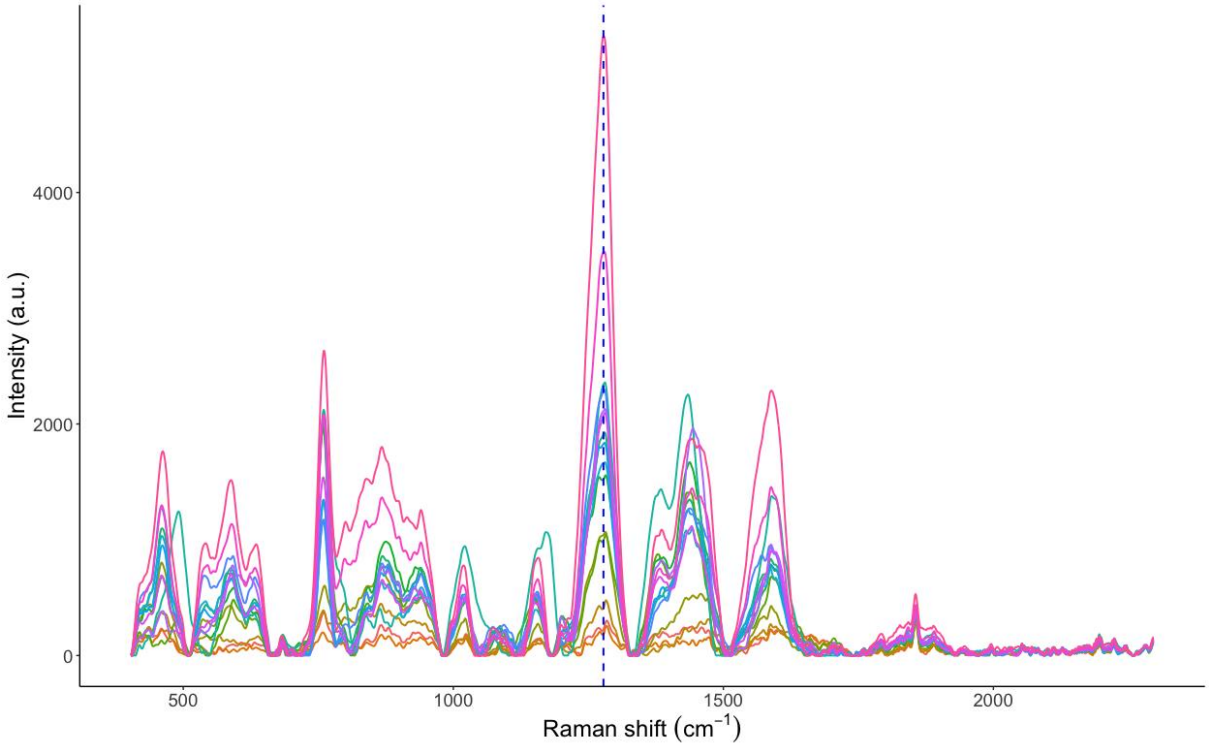


Figure 4. Enhanced Raman spectra for the fifteen experiments of Box Behnken Design at t = 0 sec (smoothing: Savitzky-Golay, baseline correction: asymmetric least square, dotted line: Raman Shift at 1280 cm^{-1}).

These spectra are in accordance with Raman spectra previously described for EPI drug. BBD was therefore constructed based on the Raman shift at 1,280 cm^{-1} which corresponds to the most intense band attributed to EPI. Response of BBD can be visualized rapidly and concisely by response surface.

	p-value of model	R^2	Lack of fit	Effect of AuNPs size (p-value)	Effect of EPI concentration (p-value)	Effect of EPI volume (p-value)
t_0	0.0081	0.9475	0.2777	0.0006	0.0057	0.0113
$I_{Max.}$	0.0123	0.9443	0.2607	0.0007	0.0106	*0.1084*
$I_{Ave.}$	0.0053	0.9602	0.2229	0.0004	0.0038	0.0243

Table 1 parameters of Box Behnken design in function of response selection (t_0, maximum of intensity for each experiment, mean intensities): coefficient of correlation (R^2), lack of fit and p-value of the effect for the three studied factors.

Looking at BBD parameters validated the conclusion of BBD for each condition studied. The correlation coefficient R^2 was superior to 0.94 and confirm the correlation of experimental results. Lack of fit was always non-significant (p-value > 0.05) indicating that the model fit well the actual response. Effects of factors were significant (p-value < 0.05) excepted for volume of EPI with response selected on the maximum of intensity for each experiment. There was no significant factor interaction calculated.

Surface response for the best statistical model, based on mean intensities (Figure 5.), was used to determine optimum conditions or best levels that improve sensitivity *i.e.,* that maximize the intensity at 1280 cm^{-1}. Thus, optimum conditions were for the highest nanoparticle size (54 nm), the highest EPI concentration (10 µg/mL) and the highest volume of epinephrine (1500 mL) added.

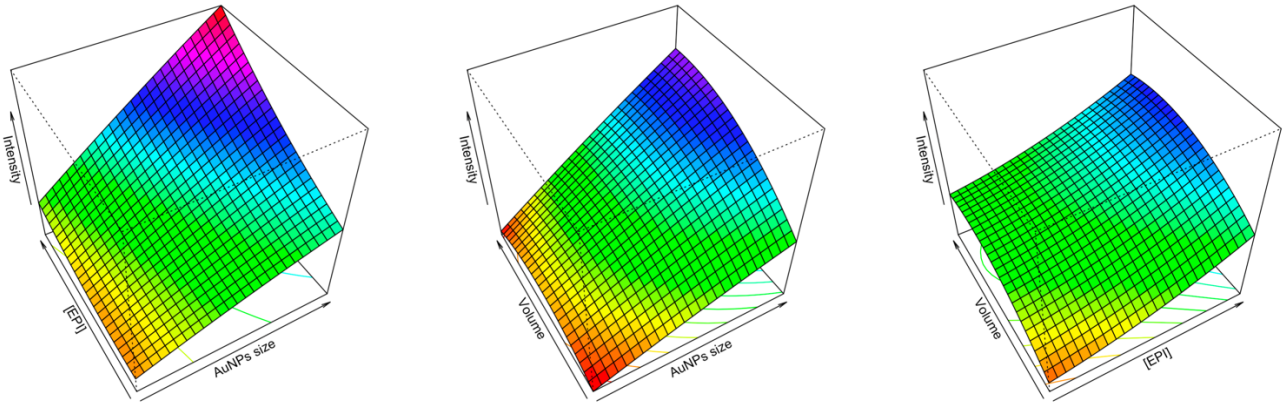


Figure 5. Response surface from Box Behnken design. Factors: epinephrine concentration ([EPI]) in µg/mL, epinephrine volume (Volume), nanoparticle size (Nanoparticles) for response corresponding to the 1280 cm^{-1} mean intensity at T XXXmin.

The robustness of BBD in these experiments has been highlight offering comparable results for the 3 factors at almost all times studied, with significant effects, with a less important effect of EPI volume added. The importance of AuNPs size have also been highlight.

Following evolution of the signal as a function of time has demonstrated a better control of the aggregation process generated by polymers than generated by salts or by acidic solutions, for which a fast evolution of the signal is generally found as well as an irreversible aggregation occurring in the first minutes.

For most of the experiments, a slight decrease of the signal over time is observed, this decrease being stronger for the larger size particles. That can be explained by a higher sedimentation of larger size nanoparticles. Choosing AuNPs of smaller size could lead to a more stable signal over time and finding a compromise between stability and sensibility could be noteworthy. This work focused on the gain in sensibility and favorize higher AuNPs *i.e.* 54 nm.

Trying to explain which factor could have the most effect on signal evolution, specifically on signal loss, alternative BBD were performed changing the response study with signal loss from X.

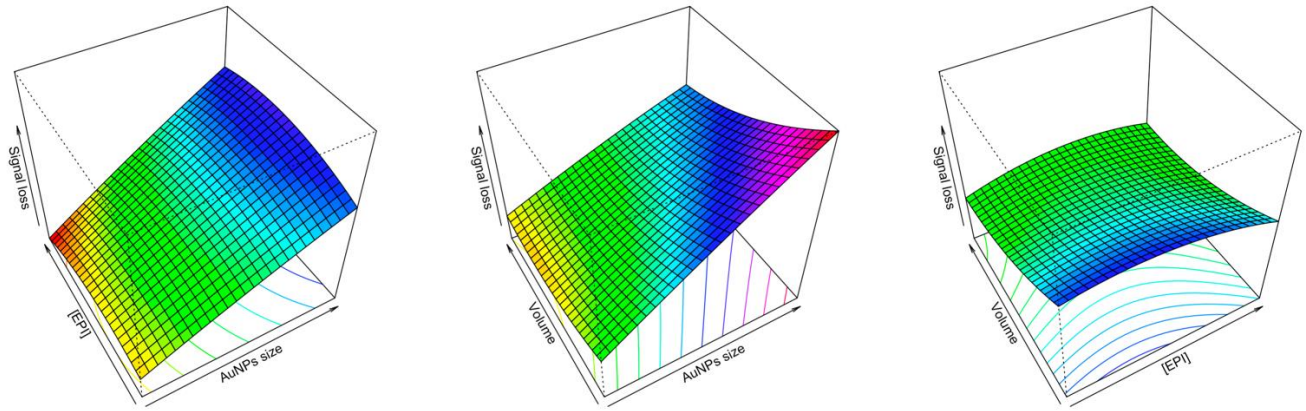


Figure 6. Surface response of Box-Behnken design with signal loss from 0 min to 120 min as response (Nanoparticles: size of nanoparticles, [EPI]: concentrations of epinephrine, Volume: volume of epinephrine added).

A DoE was built for each time, but only the time 120 min gave an interpretable surface response (p-value = 0.0409, R^2 = 0.9047, lack of fit = 0.7178) with significative performances, two factors had a significative effect: AuNPs size, with a p-value of 0.002 and volume of EPI added with a p-value equal to 0.038. Consequently, in early stages the evolution of signal is low, then signal loss is mostly impacted by higher size AuNPs or lower volume of EPI added. These conclusions were in accordance with generation of aggregation intensify by these two factors.

c. Sensibility and complex media

Once optimum conditions were selected, experiments consisted in determine the gain in terms of sensibility. Beginning at 10 µg/mL, a signal was still observed at 0.1 µg/mL Figure 7. .A. Therefore, it's demonstrated that aggregating EPI with a polymer was possible and leading to an important enhancement of Raman signal of EPI. Regarding these results, a univariate regression curve was constructed (Figure 7. .B) and showing a linear correlation between intensity at 1280 cm^{-1} and the logarithm of concentration with a R^2 equal to 0,993 that suggests a strong correlation. Though this curve was constructed with only four measurements, it is very encouraging as preliminary results to consider further quantification applications at low concentrations of EPI.

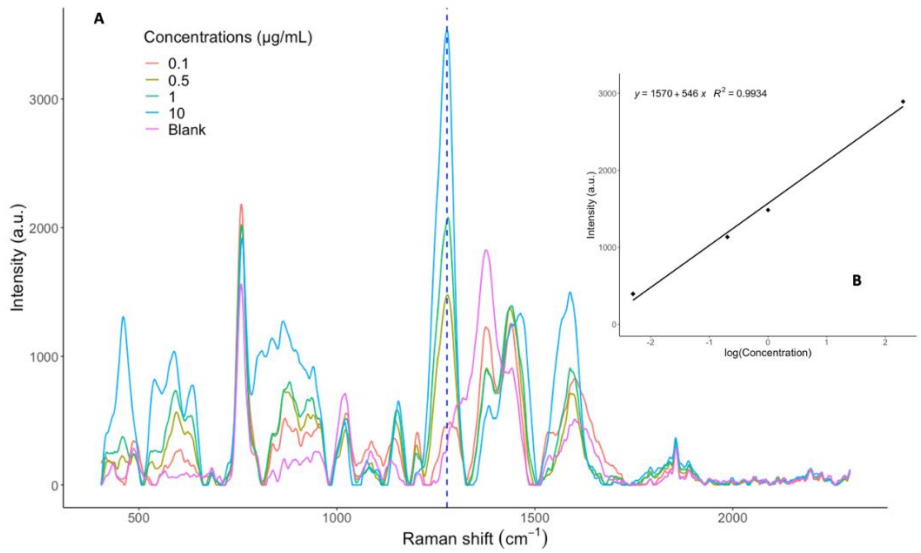


Figure 7. Exalted Raman spectra with optimum conditions: nanoparticle size = 54 nm, volume of epinephrine = 1500 µL (smoothing: Savitzky-Golay, baseline correction: asymmetric least square). B: Linear regression between intensities at 1280 cm^{-1} and the neperian logarithm of concentration.

Then EPI optimal conditions for intensity (AuNPs size = 54 nm, [EPI] = 10 µg/mL, volume of EPI = 1500 mL) were tested in two media usually used to dilute or reconstitute intravenous drugs: NaCl 0.9 % and G5. Spectra were compared to blanks of polymer in those media and in ultrapure water (Figure 8.). Looking at these spectra demonstrated a signal for the intensity previously described at 1280 cm^{-1}. However, in both cases the Raman signal of EPI is disturbed. For G5, the global intensity decreases and a slight intensity at 1280 cm^{-1} remains exploitable. While for NaCl 0.9 % the signal is much more intense with an intensification of Raman shift of all compounds present in the suspension: citrate, QC polymer, and EPI, with a still intense signal at 1280 cm^{-1}. This global enhancement of Raman signal compared to signal obtain in water is in accordance with cryoTEM, UV-Vis-NIR and DLS characterizations. Addition of NaCl 0,9 % induce aggregate of higher size, therefore a multiplication of hot spots at the origin of higher enhancement.

Raman shift were attributed based on previous studies on SERS analysis of citrate[18,19] and epinephrine[20,21]. Focusing on most important Raman shift observed in water and NaCl blanks permitted to attribute Raman shift of polymer or citrate: 760 cm^{-1}, 1000 cm^{-1}, 1240 cm^{-1}, 1380 cm^{-1}, 1600 cm^{-1}. The presence of Raman shift at 1000 cm^{-1} on all spectra suggests an attribution to a molecule present in all experiences, combined with the diminution of the intensity of this shift adding EPI and chemical shift attribution (C-COO stretching) confirms it could be citrate. Attribution of 1600 cm^{-1} Raman shift at C-C aromatic stretching is in accordance with the observation of this shift in all SERS spectra and can then be attributed to EPI, glucose and polymer. Finally, only 1280 cm^{-1} was mostly attributed to EPI while a new Raman shift at 1240 cm^{-1} appears that could be attributed to the same stretching mode of C-O for secondary alcohol in polymer and glucose (1240 cm^{-1}) or tertiary alcohol in EPI (1280 cm^{-1}). Observing relative spectral intensities highlighted different exaltation properties as a function of the media, with an intense enhancement of citrate intensities in NaCl 0.9 % and an increase intensity of glucose Raman shift in G5.

Raman shift (cm^{-1})	RI water	RI G5	RI NaCl	Chemical attribution	Molecule attribution
760	0.54	0.94	0.29	Ring beathing mode	Polymer, glucose, epinephrine
1000	0.10	0.38	0.79	C-COO stretching	Citrate
1240	0.39	0.93	0.78	CO stretching	Glucose, polymer, epinephrine, citrate (alcohol II)
1280	1.00	0.86	0.67	CO stretching	Epinephrine (alcohol III)
1380	0.16	0.79	1.00	COO stretching	Citrate, polymer
1440	0.35	1.00	0.53	CH stretching	Epinephrine, polymer, glucose
1600	0.38	0.88	0.56	CC aromatic stretching	Epinephrine, polymer, glucose

Table 2 chemical and molecule attributions of Raman shift for polymer, citrate, glucose and epinephrine with their relative intensities (RI).

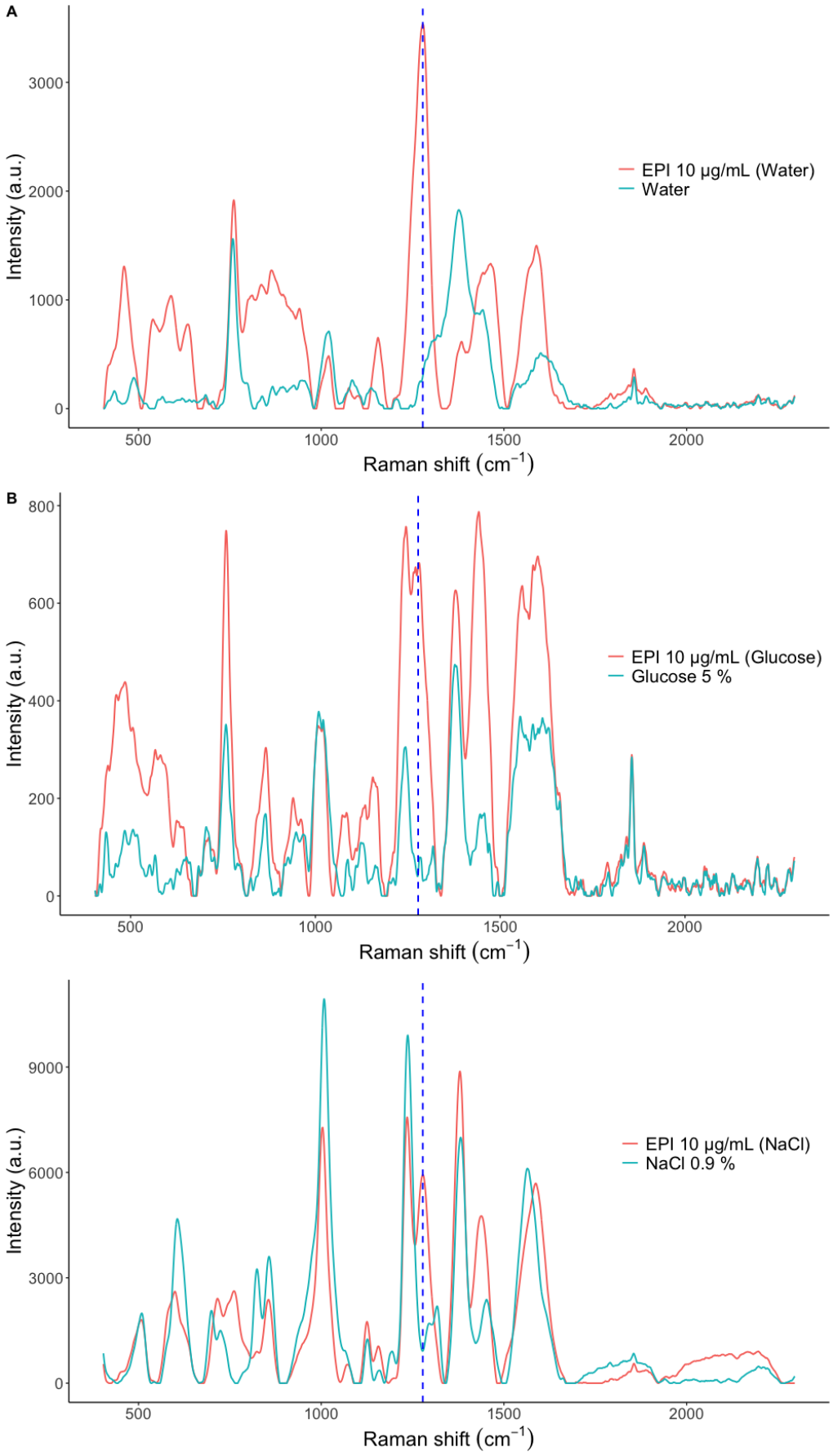

A
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm^{-1})
EPI 10 µg/mL (Water)
Water
B
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm^{-1})
EPI 10 µg/mL (Glucose)
Glucose 5 %
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm^{-1})
EPI 10 µg/mL (NaCl)
NaCl 0.9 %

Figure 8. SERS spectra of epinephrine at 10 µg.mL^{-1} in three media: A water, B in glucose, C in sodium chloride 0.9%.(smoothing: Savitzky-Golay, baseline correction: asymmetric least square).

Similarly, SERS signal were also stable in NaCl 0.9 % and G5.

To conclude in this work, increasing enhancement of SERS signal can be explained, by adding QC to AuNPs that induces dimers aggregation and by adding NaCl 0.9 % generating clusters that induces multiplication of hot spots as it is confirmed by UV-VIS-NIR spectroscopy, DLS and cryoTEM.

IV. Conclusion

This study succeeds to demonstrate the interest of promoting aggregation by self-assembly of gold nanoparticles and analyte by a polymer in terms of sensitivity, stability, and robustness of SERS signal. Using this technique and applying a rational approach by Box-Behnken design of experiments permits to fixed optimal parameters for AuNPs size and reaffirms the importance of nanoparticles size in signal enhancement. In optimized conditions, it was possible to observe a signal at a very low concentration of 0,1 µg/mL. Based on a few measurements a strong correlation between intensity and logarithm of the concentration has been identified which subsequently suggests a possible quantification with linear model. Furthermore, a signal persists in more complexe media practically used to prepare intravenous drugs. This represents a particularly interesting application that would allow direct analysis of drugs in their reconstitution or dilution media and may also open the way to analysis in biological media.

Author contributions (optional)

Conflicts of interest: There are no conflicts to declare

Acknowledgements (optional)

References

1 M. Fleischmann, P. J. Hendra and A. J. McQUILLAN, *CHEMICAL PHYSICS LETTERS*, **26**, 4.
2 K. Kneipp, H. Kneipp, R. Manoharan, I. Itzkan, R. R. Dasari and M. S. Feld, 7.
3 R. Goodacre, D. Graham and K. Faulds, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, **102**, 359–368.
4 S. E. J. Bell and N. M. S. Sirimuthu, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 1012.
5 O. Alharbi, Y. Xu and R. Goodacre, *Analyst*, 2015, **140**, 5965–5970.
6 C. De Bleye, E. Dumont, E. Rozet, P.-Y. Sacré, P.-F. Chavez, L. Netchacovitch, G. Piel, Ph. Hubert and E. Ziemons, *Talanta*, 2013, **116**, 899–905.
7 X. Jiang, Y. Chen, J. Du, M. Yang, Y. Shen, X. Li, X. Han, L. Yang and B. Zhao, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, **204**, 241–247.
8 R. Rodger and S. White, *J. Raman Spectrosc.*, 1998, 6.
9 Z. Zhou, G. G. Huang, T. Kato and Y. Ozaki, *J. Raman Spectrosc.*, 2011, **42**, 1713–1721.
10 S. Fornasaro, F. Alsamad, M. Baia, L. A. E. Batista de Carvalho, C. Beleites, H. J. Byrne, A. Chiadò, M. Chis, M. Chisanga, A. Daniel, J. Dybas, G. Eppe, G. Falgayrac, K. Faulds, H. Gebavi, F. Giorgis, R. Goodacre, D. Graham, P. La Manna, S. Laing, L. Litti, F. M. Lyng, K. Malek, C. Malherbe, M. P. M. Marques, M. Meneghetti, E. Mitri, V. Mohaček-Grošev, C. Morasso, H. Muhamadali, P. Musto, C. Novara, M. Pannico, G. Penel, O. Piot, T. Rindzevicius, E. A. Rusu, M. S. Schmidt, V. Sergo, G. D. Sockalingum, V. Untereiner, R. Vanna, E. Wiercigroch and A. Bonifacio, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 4053–4064.
11 A. Dowek, L. M. M. Lê, T. Rohmer, F.-X. Legrand, H. Remita, I. Lampre, A. Tfayli, M. Lavielle and E. Caudron, *Talanta*, 2020, **217**, 121040.
12 Micheleourevitch. Loubaki, 7.
13 S.-H. Lim and S. M. Hudson, *Carbohydrate Research*, 2004, **339**, 313–319.
14 S. W. Provencher, *Computer Physics Communications*, 1982, **27**, 229–242.
15 G. E. P. Box and D. W. Behnken, *Technometrics*, 1960, **2**, 455–475.
16 A. Czyrski and J. Sznura, *Sci Rep*, 2019, **9**, 19458.
17 PubChem, Epinephrine, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epinephrine#section=Computed-Properties.
18 C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson and P. C. White, *Langmuir*, 1995, **11**, 3712–3720.
19 J.-W. Park and J. S. Shumaker-Parry, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 1907–1921.
20 N. Soo. Lee, Y. Zung. Hsieh, R. F. Paisley and M. D. Morris, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 442–446.
21 A. S. Moody, P. C. Baghernejad, K. R. Webb and B. Sharma, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 5688–5692.
22 M. Y. Lin, R. Klein, H. M. Lindsay, D. A. Weitz, R. C. Ball and P. Meakin, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1990, **137**, 263–280.

Self-assembly of gold nanoparticles by quaternized chitosan in solution to improve surface enhanced Raman spectroscopy sensing of epinephrine

Journal : Talanta (full paper)

Antoine Dowek[1⊥], Florent Voisin[2⊥], Laetitia Minh Mai Le[1,3], Jean Maurice Mallet[4], Celine Tan[3], Florent Carn[2]*, Eric Caudron[1,3]*

[1]Université Paris-Saclay, Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France

[2]Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, Université de Paris, CNRS, Paris, France

[3]Service de Pharmacie, Hôpital Européen Georges Pompidou, APHP, Centre Université-Paris, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France

[4]Laboratoire des Biomolécules, UMR 7203, Ecole Normale Supérieure, PSL Research University, Sorbonne Universités, CNRS, Paris, France

[⊥]Equal contribution

*Corresponding auhtor

Highlights:

- Improvement of surface enhanced Raman spectroscopy analysis by aggregation / self-assembly optimization.
- Controlling aggregation process by using a specific polymer for a more simple and reliable analysis.
- Design of experiments by Box-Behnken design to fixe optimized conditions to increase signal sensibility.
- Signal stability in matrices used in practice to prepare intravenous drug.

I. Gold nanoparticles synthesis

Citrate-stabilized gold nanoparticles were first synthesized in aqueous medium by seeded growth process. The nanoparticles, noted AuNPs have a final concentration of 5.8×10^{10} NP.mL^{-1}. DLS measurements revealed a single population of NPs with $R_{H\ (AuNPs)}$ = 29.5 nm (Figure S1a). As expected, such nanoparticles dispersed at pH = 6.5 were negatively charged with an averaged electrophoretic mobility μ = - 2.927×10^{-8} m^{2}V^{-1}s^{-1} (Figure S1b), that can be related to a ζ -potential of – 37.3 mV according to the Debye–Hückel model. The as-obtained red dispersion displays a surface plasmon resonance (SPR) absorption band at 525 nm (Figure S1e). Accordingly, TEM observations (Figures S1c and S1d) revealed isotropic nanoparticles R = 28 nm. Gold nanoparticles concentration was calculated with the following calculations:

We made the assumption that all the gold salt was reduced

- $[Au]_{Atoms}(atoms/L) = \left(\frac{0.025/_{0.002}}{0.152}\right) * N_A$ with N_A Avogadro Number
- Gold unit cell volume is equal to $V_{unit\ cell} 5.56 * 10^{-29}\ m^3$ and was composed of four atoms
- So the number of gold atoms in one nanoparticle is equal to : $N_{atoms/NP} = \left(\frac{V_{NP}}{V_{unit\ cell}}\right) * 4$ with V_{NP} the volume of a nanoparticle measured by TEM
- Gold nanoparticles concentration is equal to : $[NP](NPs/L) = \frac{[Au]_{Atoms}}{N_{atoms/NP}}$

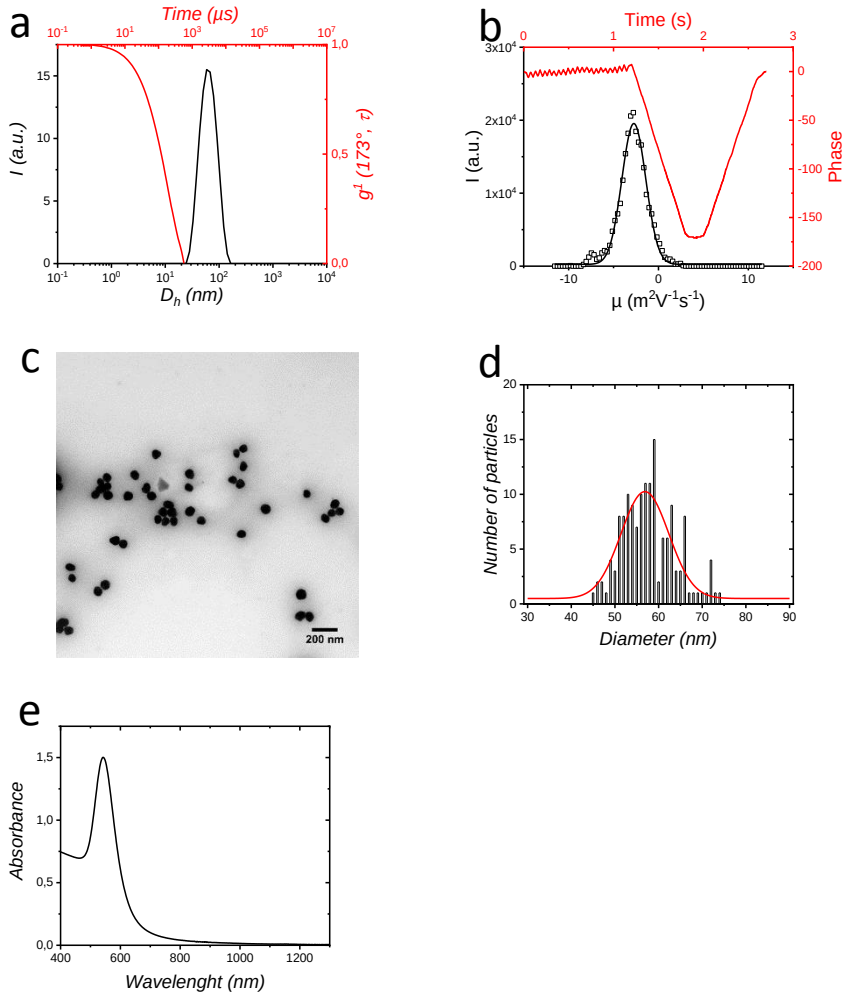


Figure S 1. Optical and structural characterizations of citrate coated AuNPs. (a) Scattered electric field autocorrelation function $g^{(1)}$ (173°,t) and corresponding normalized distributions of the scattered intensity as a function of size by applying the Contin method to our data. (b) Time evolution of the phase for electric field oscillating at 20 Hz and 0.2 Hz. Corresponding electrophoretic mobility (mV). (c) TEM images (scale bar 100 nm). (d) corresponding histogram of size distribution. (e) UV−Vis. spectra.

III) Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu sonder le potentiel applicatif des agrégats dans le domaine biomédical.

Les études en SERS ont permis de mettre en évidence la possibilité de détecter l'épinéphrine en milieu simple aqueux (0,1 µg/mL), mais aussi dans des milieux plus complexes comme les solutions salines ou glucosées utilisées pour les transfusions. Si les premiers résultats sont encourageants, il serait tout de même intéressant, dans un futur proche, de réaliser de nouvelles analyses SERS dans des milieux beaucoup plus complexes tels que le plasma, le sang ou encore l'urine.

La toxicité du chitosan s'est révélé rapidement problématique dans le cadre d'application en milieu cellulaire. Cependant les assemblages ont montré des résultats très encourageant pour des applications SERS avec la détection de l'epinéphrine en milieux aqueux jusqu'à des concentrations de 0,1 µg/mL. Les résultats obtenus dans le milieu NaCl 0,9% nous amène cependant à reconsidérer les propriétés des agrégats. Il serait notamment intéressant d'optimiser leur taille mais aussi de fixer des conditions d'écrantages dans un but de reproductibilité.

Il serait intéressant, pour les applications intracellulaires, de travailler avec des agrégats stabilisés avec un polyanion qui montrent une meilleure stabilité en milieu de culture et une cytotoxicité moins élevée. Le contrôle du nombre d'agrégation pourrait permettre d'optimiser les propriétés thermiques par unité de matière. Dans un même temps, l'étude de la biotransformation de ces agrégats pourrait se révéler intéressante sur l'impact du polymère et du nombre d'agrégation. Enfin, les propriétés thermiques obtenues pour ces assemblages en milieu cellulaire seraient comparées à celles obtenues pour des nanoparticules isolées.

L'application la plus prometteuse après ces études est l'utilisation des agrégats pour la détection en SERS. En effet, la méthode se veut peu coûteuse avec des résultats rapides. Comme cité précédemment, il serait intéressant de travailler dans des milieux tampons permettant un meilleur contrôle sur la variabilité des structures et des signaux. Dans un second temps, l'analyse SERS pourrait être effectuée dans des milieux plus complexes comme l'urine ou le sang. Cette collaboration établie pendant la thèse nous amènerait ensuite à travailler sur des molécules d'anticancéreux dont le dosage, en milieu hospitalier, est un paramètre important vis-à-vis de la toxicité de certaines de ces molécules.

CHAPITRE VI

Synthèse de copolymères « peignes » de type polyélectrolytes pour l'assemblage de nanoparticules

I) Introduction

Ce chapitre concerne la synthèse de copolymères composés d'un squelette sur lequel sont greffées plusieurs chaînes pendantes d'un ou plusieurs polymères. Ce type de copolymère, annoté squelette-*g*-greffons, est qualifié de copolymère de type « peigne » ou « brosse » lorsque le taux de greffage est suffisamment élevé pour que les greffons prennent une conformation étirée et que la taille de ces derniers soit sensiblement identique[193]. Les premiers travaux sur ce type de copolymère remontent aux années 1980[194,195]. Ces travaux étaient initialement basés sur des stratégies de synthèses de polymères par l'intermédiaire de différentes réactions comme la polymérisation radicalaire ou l'ouverture de cycle. Aujourd'hui, une grande variété de molécules peuvent être synthétisées pour le domaine des nanotechnologies[196–201], ou le domaine biomédical. Par exemple, Shukla et al.[202] a synthétisé un copolymère peigne poly(uréthane-*g*-dextrin) comme vecteur de principe actif pour le traitement de cellules cancéreuses. Ce copolymère, pour optimiser la libération du principe actif, est enrobé par un gel de méthyle cellulose. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés au cas particulier de copolymères « peignes » de type polyélectrolyte, constitués d'un squelette neutre polaire et de greffons chargés.

Les recherches sur ce type de macromolécules en milieux aqueux ont été moins importantes que celles dévolues au cas de copolymères non-ioniques en milieu organique. Les principaux résultats concernent des copolymères dont la composante ionique est le squelette. On peut, par exemple, citer les travaux de Feuz et al.[203,204] qui ont étudié la conformation de copolymères « peignes » avec un squelette de Poly-(L-lysine) et des greffons de poly(éthylène glycol). Ces travaux montrent, d'un point vue théorique et expérimental (i.e SANS), comment le volume des greffons et la longueur de persistance varient en fonction du degré de polymérisation des greffons en condition de bon solvant. Hanpanich et al.[205] ont, quant à eux travaillé sur un copolymère avec squelette de poly-L-lysine (PLL) et des greffons de Dextran, hydrophile, pour aider à la formation de complexes interpolyélectrolyte avec des bio polymères comme l'ADN.

À notre connaissance, le cas de copolymère « peigne » dont la composante chargée provient des greffons a été encore moins étudié. Nous pouvons citer les travaux théoriques concernant la conformation de ce type de molécule en régime dilué[206]. Sur le plan expérimental, les principales études concernent la synthèse de copolymères « peignes » visant des applications dans le domaine de l'électronique. Par exemple, Wang et al.[207] ont synthétisé un copolymère PVA-*g*-PAA pour ensuite obtenir un hydrogel en présence de chlorure de potassium et de borax (Figure VI.1). Le matériau final présente d'excellentes propriétés en tant que condensateur électrochimique en plus de pouvoir s'auto régénérer.

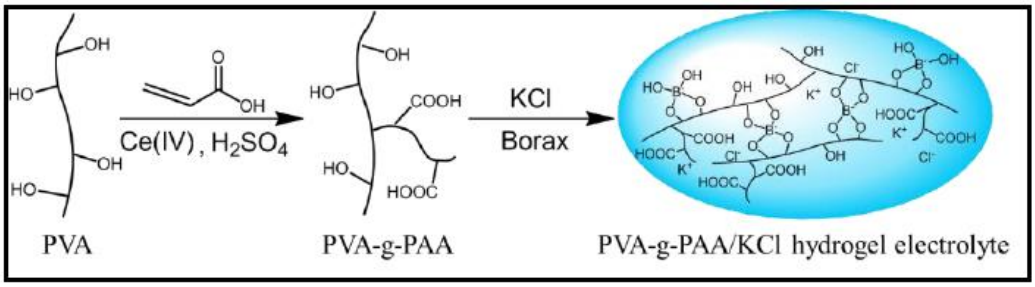


Figure VI.1. Schéma de synthèse d'un hydrogel PVA-g-PAA/KCl/borax. Issue des travaux de Wang et al.[207].

De tels copolymères composés de greffons flexibles chargés peuvent aussi s'apparenter à des molécules déjà présentes dans la nature telles que les agrécanes[208] présentes dans la matrice de collagène dans les tissus mous, ou par exemple, la mucine[209] qui est une glycoprotéine aux propriétés lubrifiantes permettant de protéger les tissues contre les agressions extérieures. En plus de l'étude sur la conformation de ces copolymères en solution, l'aspect biomimétique de ces molécules peut s'avérer être particulièrement intéressant pour plusieurs applications.

Dans ce contexte, nous avons essayé de mettre en place un protocole de synthèse de copolymères hydrophiles/polaires permettant de contrôler la longueur de contour du squelette et des greffons (L_c) ainsi que la densité de greffage comme illustré sur la figure VI.2.

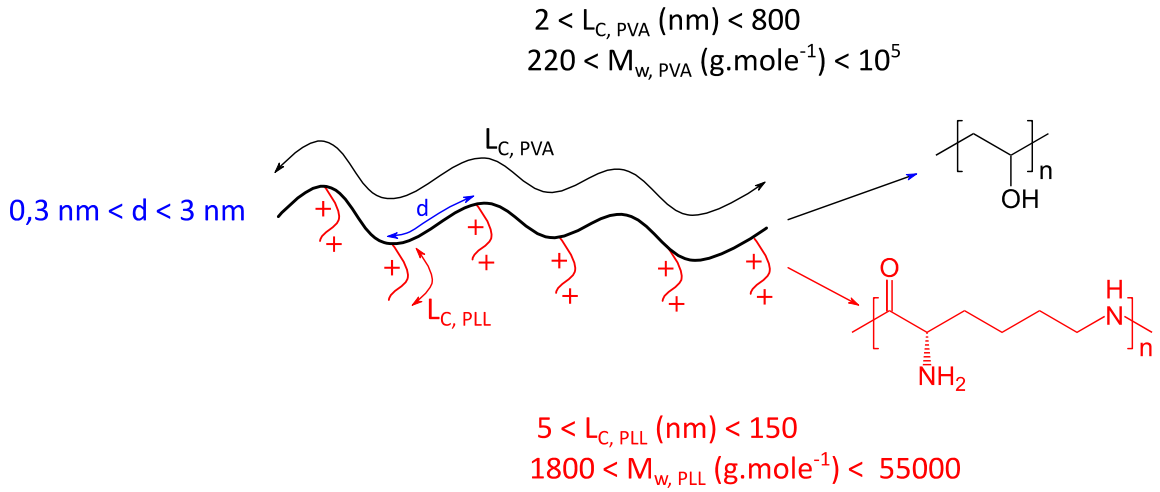


Figure VI.2. Schématisation d'un copolymère avec des greffons chargés.

Toutes les voies explorées présenteront le même squelette de poly(vinylalcool) (PVA) qui est un polymère ne présentant pas de toxicité particulière, soluble dans l'eau et sur lequel seront greffés différents polyélectrolytes : poly-L-lysine (PLL), poly(styrène sulfonate) (PSS) et du poly(acide acrylique) (PAA).

À l'étape d'après, nous souhaitions étudier par diffusion du rayonnement la conformation de ces copolymères dans l'eau en régime dilué en lien avec les prédictions théoriques de Gay et Raphaël[206] montrant l'influence des caractéristiques de la chaîne (Figure VI.3).

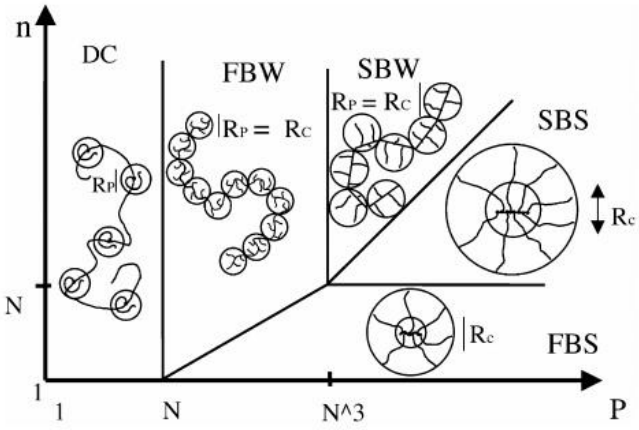


Figure VI.3. Comportement d'un polymère "peigne" en bon solvant composé de n segments, chacun comportant N monomère le long du squelette et P monomère le long des greffons (DC = decorated chain, FBW = flexible backbone worm, SBW = stretched backbone worm, SBS = stretched backbone star et FBS = flexible backbone star). Issue des travaux de Gay et Raphaël[206].

Enfin, nous souhaitions étudier le couplage de ces copolymères avec des particules de charge opposée afin de montrer dans quelle mesure il est possible de contrôler la taille et la structure des assemblages en modulant les caractéristiques du copolymère « peigne ». En particulier, nous souhaitions contrôler le nombre de particules par agrégat et la distance inter-particules avec respectivement le contrôle sur la densité de greffage et la taille des greffons.

En outre, sur une chaîne, la charge d'un complexe greffon/nanoparticule devrait être reliée au rapport de charge des deux espèces $+/-$.

Ainsi, globalement, cette approche mènerait à la formation d'oligomères colloïdaux dont les principales caractéristiques pourraient être variées indépendamment du milieu.

Ceci dit, le travail initial de synthèse s'est révélé plus difficile que prévu dans la mesure où nous n'avons pas réussi à identifier de protocole robuste préexistant pour la synthèse de macromolécules présentant les caractéristiques souhaitées. Dans ce chapitre de nature exploratoire, nous allons décrire les résultats obtenus pour les différentes approches envisagées après un bref rappel des grandes voies de synthèse permettant d'obtenir des copolymères de type « peignes ».

II) Point de vue général sur la synthèse de copolymère de type « peigne »

Comme illustré sur la figure VI.4, des copolymères greffés peuvent présenter des structures très variées.

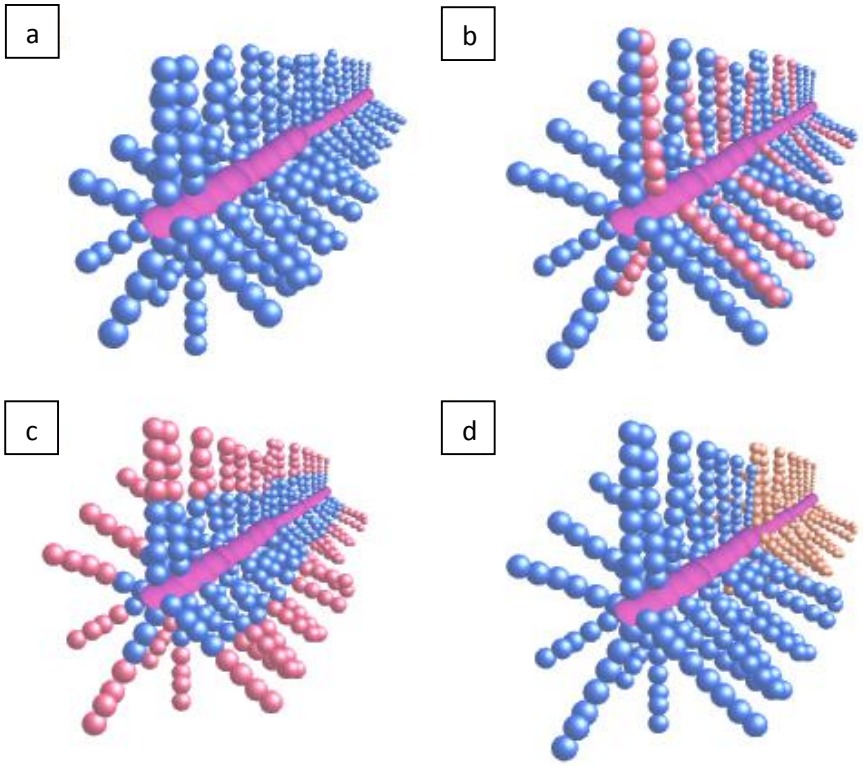


Figure VI.4. Représentation d'artiste de copolymère peigne (a) à branche homopolymère (b) à branche de plusieurs polymères réparties aléatoirement (c) à branche de copolymère multi blocs (d) à branche de type (peigne-b-peigne). Une sphère représente un monomère.

Ces architectures, bien que différentes, nécessitent de passer par des synthèses permettant de contrôler différents paramètres comme la densité de greffage, la position des greffons ou la longueur de contour. Il existe trois grandes familles de synthèses :

- « grafting through »[210–212] : cette méthode consiste à (co)polymériser un ou plusieurs macromonomères entre eux.
- « grafting from » [213–215] : cette méthode consiste à faire croître un greffon en polymérisant un monomère sur un site réactif, préalablement activé, sur le squelette.
- « grafting onto »[216–218] : cette méthode consiste à assembler deux polymères par l'intermédiaire de réactions (N-alkylation, ouverture de cycle, etc, …).

Ici ne seront abordées que les deux dernières stratégies qui ont été explorées pour la synthèse de copolymères « peignes » durant cette thèse en mettant l'accent sur les travaux impliquant un squelette polaire, non-ionique, tel que le PVA.

a) La voie « grafting onto »

La méthode « grafting onto » consiste à assembler deux polymères déjà préformés. Une méthode courante consiste à former une liaison covalente via une réaction entre un groupe fonctionnel en bout de chaîne du greffon et un groupe réactif le long du squelette (Figure VI.5).

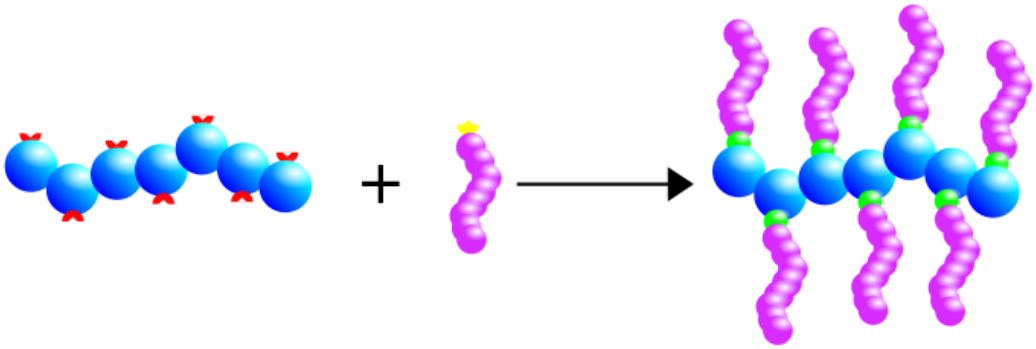


Figure VI.5. Schéma de la méthode « grafting onto ».

Cette voie de synthèse est a priori simple si l'on dispose de greffons adéquats et versatiles. Néanmoins, elle peut présenter quelques inconvénients :

- L'élimination des greffons qui n'ont pas réagi peut-être rendu difficile si les greffons ont une masse molaire proche de celle du squelette.
- Le taux de greffage : du fait de l'encombrement stérique entre greffons, lors de la fonctionnalisation du squelette, il est difficile d'obtenir un taux de greffage proche de 100%.
- Le greffage se fait de façon aléatoire sur le squelette.
- La compatibilité entre les deux polymères : le greffage sera d'autant plus compliqué si les deux espèces mises en jeu sont incompatibles, c'est-à-dire s'il y a immiscibilité des entités macromoléculaires.

Par cette voie de synthèse, il est possible de fonctionnaliser différents polymères[219–221]. On parlera ici de l'exemple du poly(vinylalcool) (PVA), polymère d'intérêt dans ces travaux. L'intérêt grandissant des copolymères semiconducteurs a motivé les travaux de Mougnier et al.[222] qui ont réalisé un greffage de chaînes de poly-(3-hexylthiophène) (P3HT) sur un squelette

de PVA. Le greffage se fait via une réaction d'estérification entre les groupements carboxyliques en bout de chaîne de P3HT avec les groupements alcools du PVA, via l'utilisation de différents catalyseurs. Cette méthode permet d'obtenir un copolymère « peigne » avec 75 % des chaînes de P3HT qui se sont greffées (Figure VI.6).

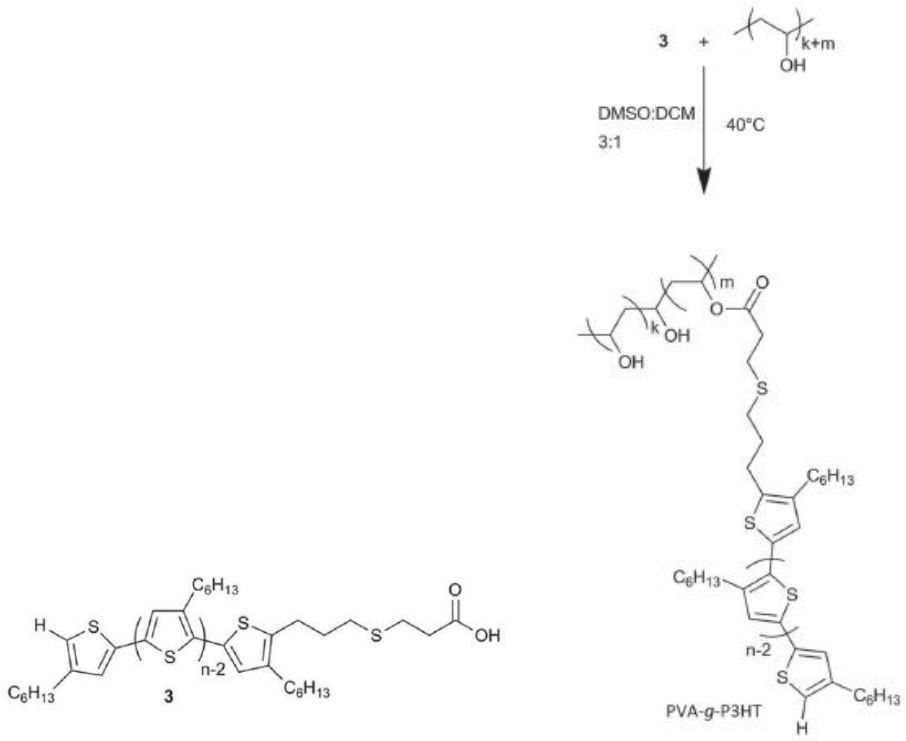


Figure VI.6. Synthèse du PVA-g-P3HT par voie « grafting onto ». Figure extraite des travaux de Mougnier et al.[222].

Les réactions conduisant à la formation de liaisons covalentes entre les entités moléculaires mettent souvent en jeu des solvants organiques toxiques tel que du dichlorométhane, utilisé dans les travaux de Mougnier et al. pour la réaction d'estérification. Il est donc intéressant de se tourner vers des voies de synthèses mettant en jeu des solvants moins nocifs tels que le DMSO ou l'eau.

Dans cette optique, il est possible de reporter une voie de fonctionnalisation très communément utilisée pour son efficacité, à savoir la voie par chimie « click »[223,224]. Ce concept, apporté par Sharpless en 2001, permet des réactions avec des hauts rendements et des champs d'applications très larges. Ces réactions stéréospécifiques et simples à mettre en œuvre produisent des sous-produits facilement éliminables. La chimie « click » a largement été appliquée à la bioconjuguaison de molécules. L'assemblage le plus répertorié est la réaction de cycloaddition de Huisgen[225] qui est une cycloaddition 1,3 dipolaire entre une fonction azide et une fonction alkyne dans l'eau ou un mélange eau/tert-butanol conduisant à la formation d'un hétérocycle à 5 atomes : le triazole (Figure VI.7).

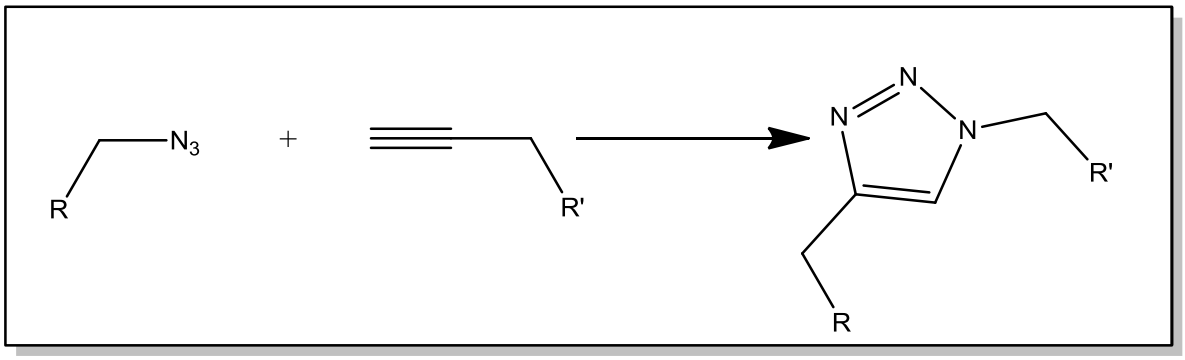


Figure VI.7. Schéma de la réaction de cycloaddition de Huisgen.

Cette méthode est très appréciée, notamment pour son efficacité évoquée précédemment, mais aussi pour sa rapidité et la possibilité d'utiliser l'eau comme solvant. Cette réaction met en jeu un sel de cuivre ayant le rôle de catalyseur et un agent réducteur qui, dans notre cas, est l'ascorbate de sodium.

Des travaux concernant la fonctionnalisation de PVA[226] par la chimie « click » ont été effectués, notamment par Ossipov et al.[227], qui ont réalisé un hydrogel de PVA par l'intermédiaire de la chimie « click » en milieu aqueux, catalysé par du sulfate de cuivre pentahydraté et de l'ascorbate de sodium (Figure VI.8).

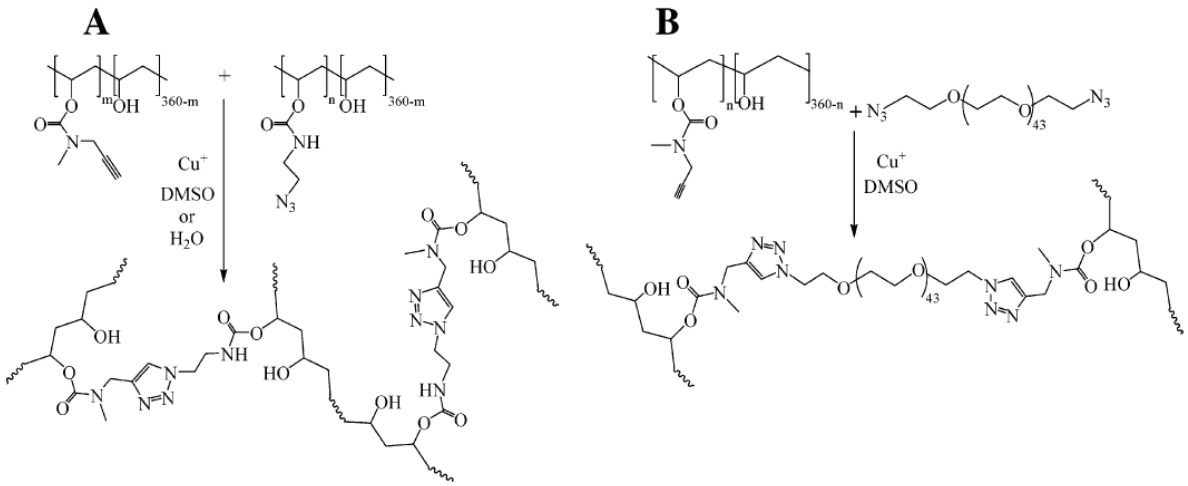


Figure VI.8. Réaction de réticulation entre (A) un PVA-N3 et un PVA-Alkyne et (B) un PVA-Alkyne et un PEG-N3 conduisant à la formation d'un gel. Issue des travaux de Ossipov et al.[227].

Ces travaux de thèses montreront deux voies de synthèses issues de la méthode « grafting onto » : une première synthèse d'un copolymère PVA-*g*-PLL basée sur la chimie « click » qui est potentiellement la plus intéressante grâce à l'utilisation de composés peu toxiques et une seconde voie basée sur la réaction d'estérification entre le PVA-OH et le PSS-COOH.

b) La voie « grafting from »

La méthode dite « grafting from » consiste à assembler deux polymères en faisant croître les greffons sur le squelette (Figure VI.9).

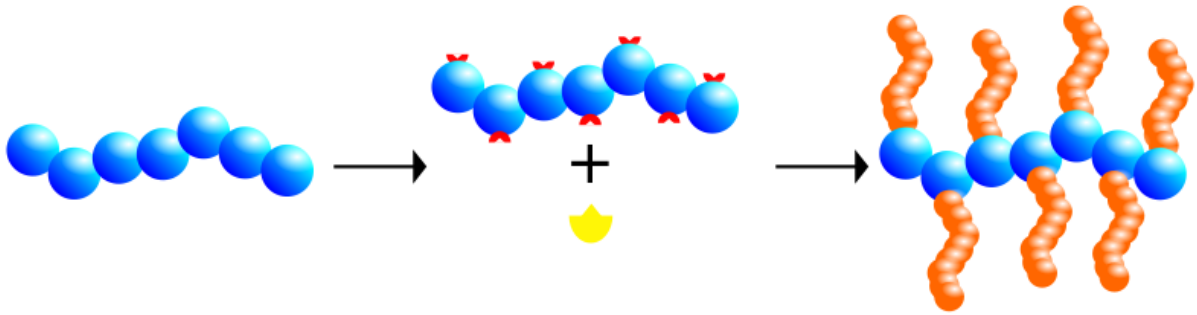


Figure VI.9. Schéma de la méthode « grafting from ».

Dans un premier temps, cette méthode nécessite d'activer des sites réactifs le long du squelette avant de pouvoir faire croître les greffons par polymérisation d'un monomère. La croissance des greffons peut être réalisée grâce à de multiples techniques de polymérisation (polymérisation anionique[228,229], polymérisation radicalaire[230,231], MADIX[232], …).

Cette technique peut, comme le « grafting onto », présenter quelques inconvénients :

- Limitation dans le nombre de centres actifs activés.
- Un mauvais contrôle de la longueur des greffons provoqué par l'encombrement stérique avec la proximité des chaînes déjà en croissance.

Il est possible de trouver quelques travaux utilisant cette méthode pour différents polymères[233,234], mais assez peu sur le PVA. Notamment, Liu et al.[235] ont réalisé la synthèse d'un copolymère « peigne » par polymérisation radicalaire de trois monomères (acide acrylique (AA), acrylate de lithium (LiAA) et l'acrylate hydroxyethyl (HEA)) sur un squelette de PVA qui lui a permis d'obtenir un matériau polymère aux propriétés mécaniques accrues comparées à un matériau PVA-*g*-PAA par exemple (Figure VI.10).

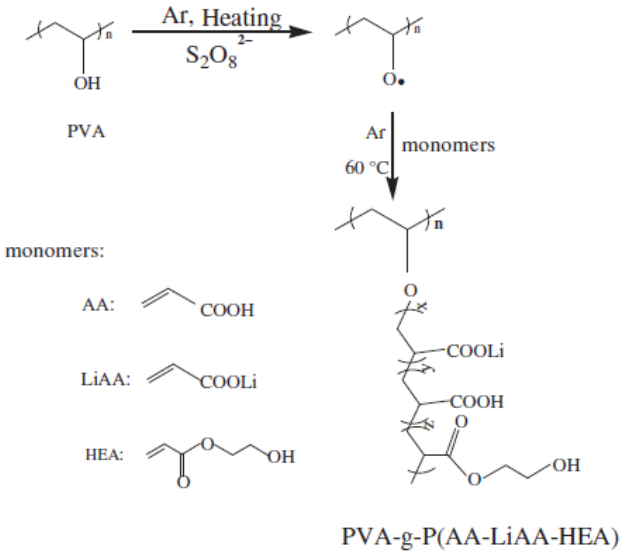


Figure VI.10. Synthèse du copolymère PVA-g-P(AA-LiAA-HEA) par polymérisation radicalaire. Issue des travaux de Liu et al.[235].

La méthode de « grafting from » a fait l'objet dans ces travaux de thèse d'une voie synthèse pour la polymérisation de monomères d'acide acrylique sur un squelette de polyvinylalcool préalablement activé.

III) Systèmes envisagés

Dans la suite de ce chapitre, trois grandes voies de synthèses seront exposées avec les protocoles utilisés et les résultats obtenus :

- Synthèse d'un copolymère PVA-*g*-PLL par chimie « click »
- Synthèse d'un copolymère PVA-*g*-PSS par estérification
- Synthèse d'un copolymère PVA-*g*-PAA par polymérisation radicalaire

Ces différents systèmes permettent de couvrir une large gamme de polyélectrolytes en faisant varier la charge des greffons. Dans l'optique de coupler ces différents systèmes avec des nanoparticules de charge opposée, les greffons seront de taille différente afin de contrôler le nombre d'agrégation.

La synthèse des copolymères polyélectrolytes peut être rendue compliquée, notamment par la nécessité de travailler dans des solvants polaires aqueux contrairement aux synthèses classiques réalisées dans des solvants organiques. Un autre paramètre pouvant être limitant provient de la taille et charges des greffons qui peuvent induire une baisse du taux de greffage par gêne électrostérique.

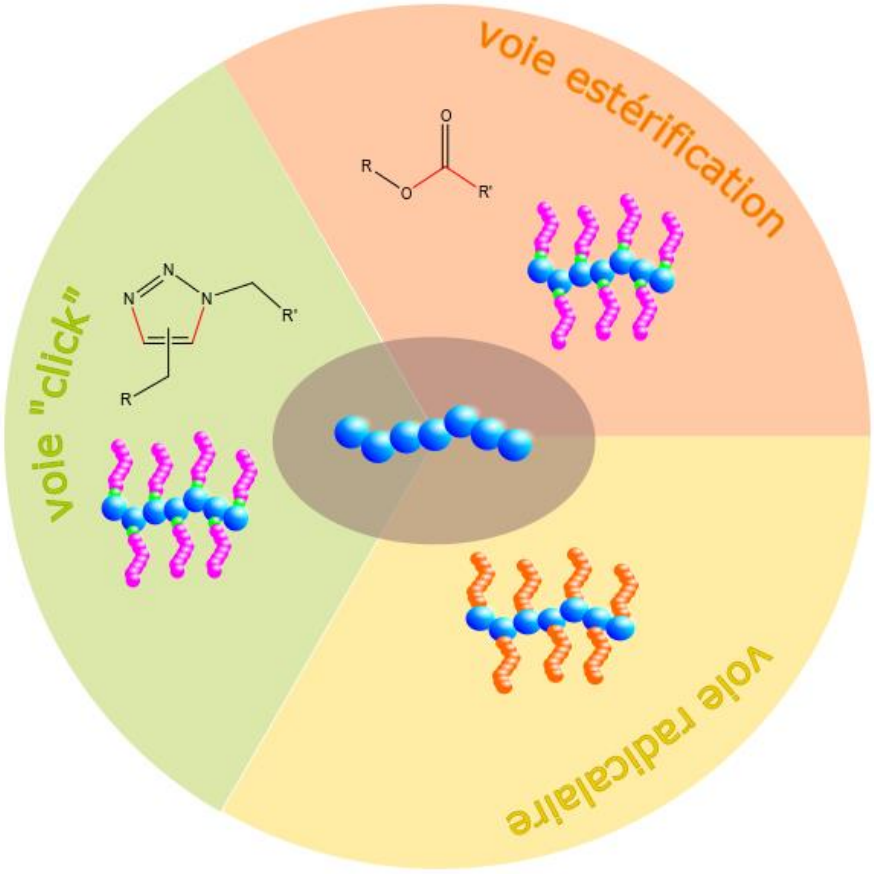


Figure VI.11. Schéma résumant les trois voies de synthèses étudiées pendant ces travaux de thèse.

IV) Produits chimiques

La totalité des produits pour les différentes voies de synthèses est exposée dans les tableaux suivants :

Nom (abréviation)	Fomule	Masse Molaire	Fournisseur	Pureté
Poly vinylalcool (PVA)	$(C_2H_4O)_n$	Mw = 200000 g/mol	Merck	
Chlorure 4-Toluènesulfonyl (TsCl)	$C_7H_7SO_2Cl$	M = 191 g/mol	Sigma-Aldrich	>99%
Azoture de sodium (NaN_3)	NaN_3	M = 65 g/mol	Sigma-Aldrich	>99,5%
Triéthylamine (Et_3N)	$C_6H_{15}N$	M = 101 g/mol	Sigma-Aldrich	>99%
Poly (L-lysine hydrobromide) alkyne		Mw = 6300 g/mol Mw = 21000 g/mol	Alamanda Polymers	>90%
Sulfate de cuivre pentahydrate ($CuSO_4$)	$CuSO_4.(H_2O)_5$	M = 250 g/mol	Sigma-Aldrich	99,999%
Ascorbate de sodium (NaAs)	$C_6H_7O_6Na$	M = 198 g/mol	Sigma-Aldrich	>99%

Tableau VI.1. Produits chimiques utilisés pour la voie "click".

Nom (abréviation)	Formule	Masse Molaire	Fournisseur	Pureté
Poly vinylalcool (PVA)	$(C_2H_4O)_n$	Mw = 200000 g/mol	Merck	
Poly vinylalcool (PVA)	$(C_2H_4O)_n$	Mw = 40000 g/mol	Sigma-Aldrich	
Poly styrène sulfonate (PSS)	$(C_8H_7SO_3Na)_n$	Mw = 5000 g/mol Mw = 10000 g/mol	Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques par Guillaume Pino (étudiant en thèse)	
Diméthylsulfoxide anhydre (DMSO)	C_2H_6OS	M = 78 g/mol	Sigma-Aldrich	>99,9%
Acétate d'éthyle anhydre (AcOH)	$C_4H_8O_2$	M = 88 g/mol	Sigma-Aldrich	>99,8%
Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)	$C_{13}H_{22}N_2$	M = 206 g/mol	Sigma-Aldrich	>99%
4-Diméthylaminopyridine (DMAP)	$C_7H_{10}N_2$	M = 122 g/mol	Sigma-Aldrich	>99%

Tableau VI.2. Produits chimiques utilisés pour la voie estérification.

Nom (abréviation)	Formule	Masse molaire	Fournisseur	Pureté
Poly vinylalcool (PVA)	$(C_2H_4O)_n$	Mw = 40000 g/mol	Sigma-Aldrich	
Acide acryle (AA)	$C_3H_4O_2$	M = 72 g/mol	Sigma-Aldrich	>99%
Persulfate de sodium	$Na_2S_2O_8$	M = 238 g/mol	Sigma-Aldrich	>98%
Bisulfite de sodium	$NaHSO_3$	M = 104 g/mol	Sigma-Aldrich	>54%
Nitrate de cerium et ammonium (CAN)	$H_8N_8CeO_{18}$	M = 548 g/mol	Sigma Aldrich	>98,5%

Tableau VI.3. Produits chimiques utilisés pour la voie radicalaire.

V) Voie « Click »

a) Etat de l'art

La synthèse de copolymères par voie « click » est couramment utilisée pour sa rapidité et sa possibilité de la réaliser dans des solvants peu voire non-toxiques. Il est cependant plus difficile de trouver des travaux de chimie « click » sur un squelette de PVA. Nous nous sommes basés sur quelques travaux de la littérature qui concerne le greffage de « petites » molécules sur les fonctions alcool du PVA[236,237]. Sur la figure VI.12, ci-dessous, Gurol et al.[237] ont synthétisé un matériau hybride PVA-*g*-Zinc phtalocyanine afin d'en mesurer les propriétés anti bactériennes vis-à-vis de plusieurs bactéries comme la *E. Coli*. Le produit final est caractérisé en spectroscopie infrarouge et en RMN du proton afin de déterminer le taux de tosylation et le taux final de fonctionnalisation. D'après l'auteur, le taux de tosylation est de 13 % et le taux de greffage final est de 11 %. Si les taux de greffages sont relativement intéressants, la principale barrière rencontrée dans ces travaux est l'utilisation d'un solvant de synthèse toxique, à savoir le DMF, qui peut être particulièrement difficile à éliminer notamment dans notre cas, ne disposant pas d'équipements adéquats.

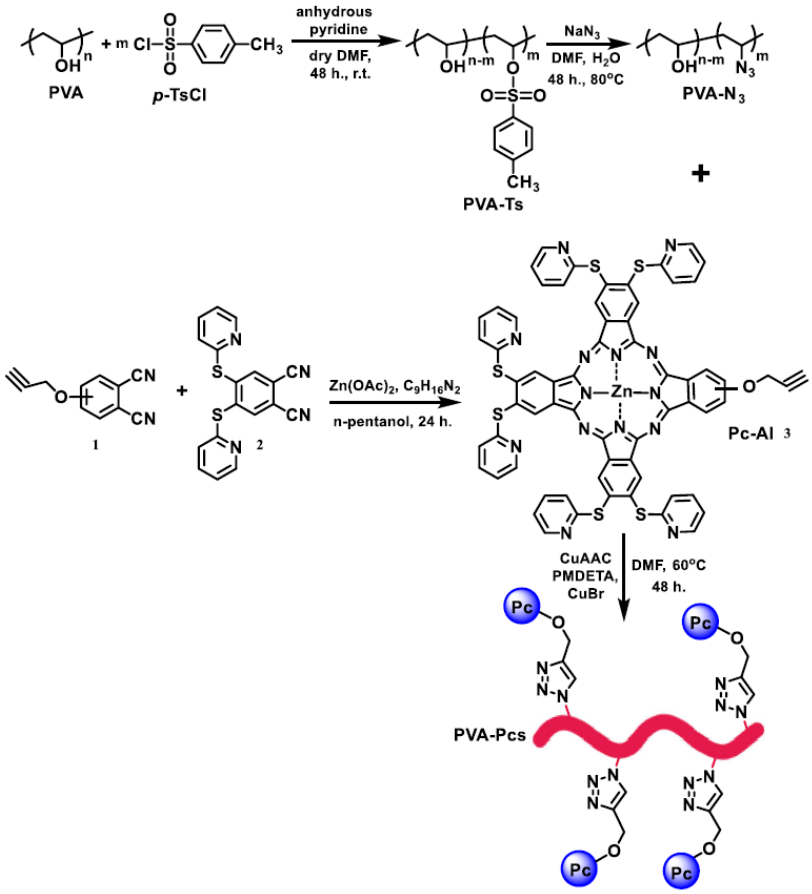


Figure VI.12. Voie de synthèse d'un PVA-g-Zinc phtalocyanine via la chimie « click ». Issue des travaux de Gurol et al.[237].

Awada et Daneault[238] ont, quant à eux, travaillé sur le greffage d'une molécule de propargylamine, sur un squelette de PVA en utilisant seulement l'eau comme solvant de synthèse (Figure VI.13).

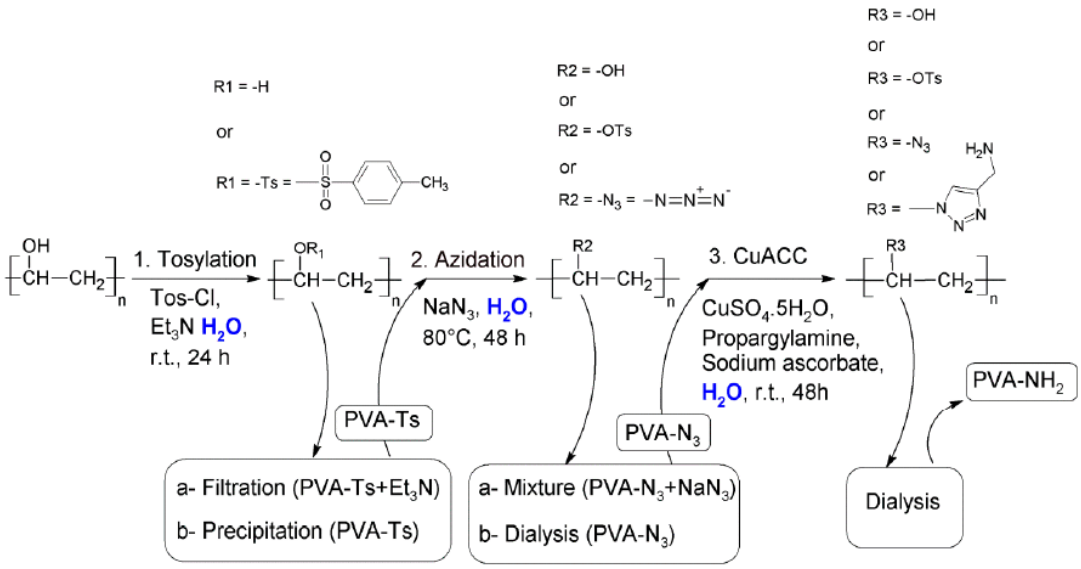


Figure VI.13. Voie de synthèse pour le greffage de la propargylamine sur un PVA via la chimie « click ». Issue des travaux de Awada et Daneault[238].

Les caractérisations sont réalisées aux différentes étapes de fonctionnalisation en spectroscopie infrarouge et X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). Le taux de greffage n'est déterminé que pour l'étape de tosylation avec une valeur de 17 % selon l'auteur. Le taux de greffage de la propargylamine n'est pas discuté dans le papier, mais seulement mis en évidence par la présence d'atome d'azote en analyse XPS. Si l'article semble peu complet sur le plan de la caractérisation, le protocole expérimental reste très intéressant notamment par l'utilisation de composés peu toxiques en milieu aqueux.

C'est sur la base de ces travaux que nos protocoles se sont inspirés afin de greffer des chaînes de PLL sur un squelette de PVA.

b) Synthèses et caractérisations

Dans la partie suivante, je vais successivement présenter les protocoles mis en place et les résultats obtenus concernant le greffage par chimie « click » de greffons de PLL sur un squelette de PVA.

Les premières synthèses ont été réalisées durant un séjour de trois mois au Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO) à Bordeaux. Les résultats et conclusions sont basés sur des caractérisations régulières par RMN du proton.

Ces travaux ont ensuite été repris au Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC) à Paris où nous avions accès à une seconde technique de caractérisation, la RMN DOSY,

permettant une meilleure vision du greffage des molécules par interprétation des coefficients de diffusion.

Dans un premier temps seront abordés les travaux réalisés au LCPO avec l'aide d'Eric Cloutet. Le squelette de PVA provenait de chez Merck avec une masse molaire de 200000 g/mol et un degré d'hydrolyse de 89 %. La poly (L-lysine hydrobromide) alkyne provient de Alamanda polymer (pureté comprise entre 90 et 100 %) avec deux masses molaires différentes 6300 g/mol et 51000 g/mol. L'azoture de sodium, la triéthylamine et le chlorure de 4-toluènesulfonyle provenaient tous trois de chez Sigma-Aldrich.

La synthèse du copolymère peut se segmenter en trois étapes :

- Tosylation : cette étape consiste à substituer le PVA avec une molécule de 4-Toluènesulfonyl qui fera un meilleur groupe partant pour la substitution par l'azoture (Figure VI.14).

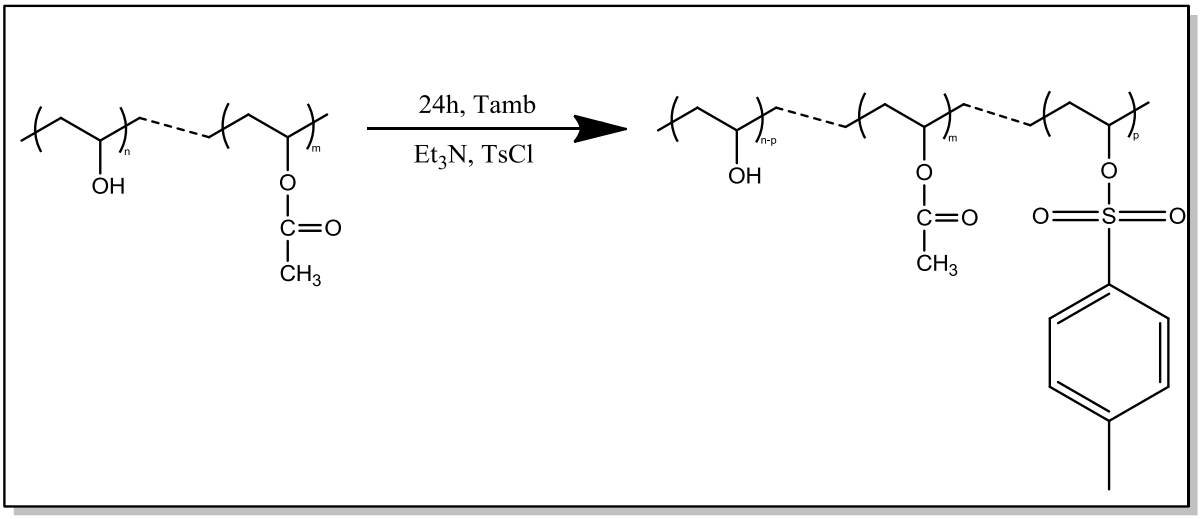


Figure VI.14. Etape de tosylation du PVA.

- Azidation : cette étape consiste à substituer les fonctions tosyls par des groupements azotures qui servent ensuite de sites réactifs pour la chimie « click » (Figure VI.15).

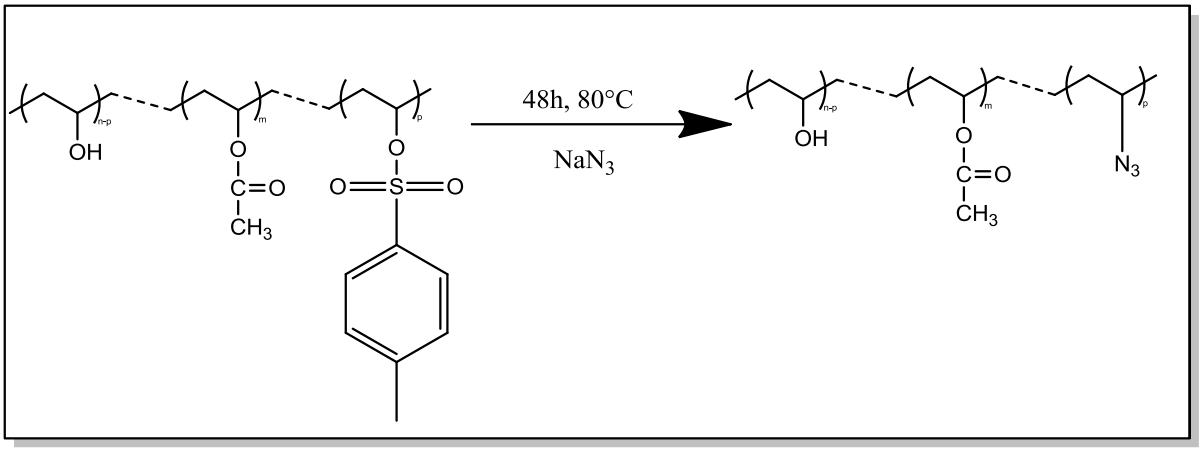


Figure VI.15. Etape d'azidation du PVA-Ts.

- « Click » : cette étape consiste à greffer les molécules de PLL par réactions entre le PVA-N3 et le PLL-alkyne (Figure VI.16).

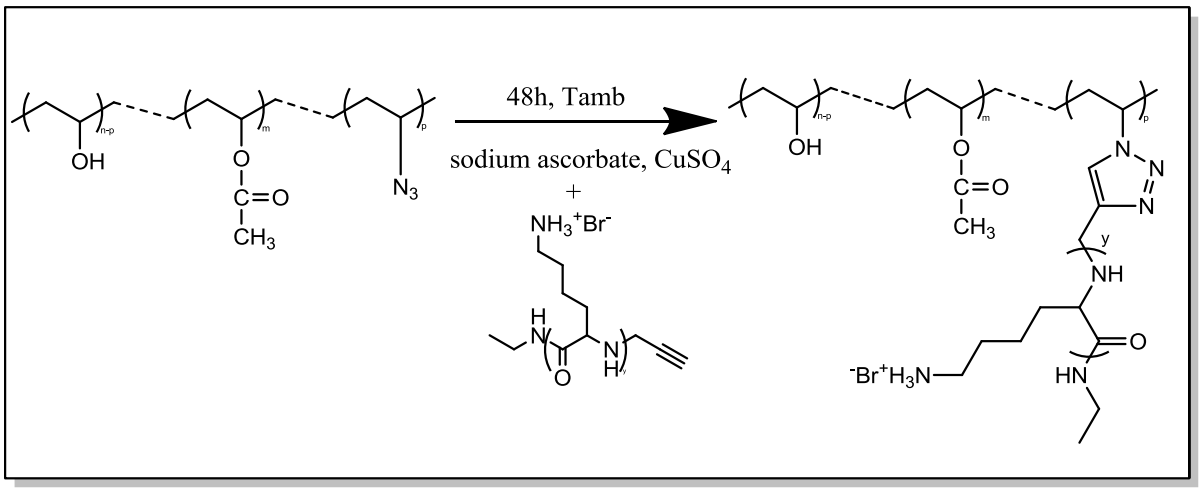


Figure VI.16. Schéma du greffage par voie « click » de la poly-L-lysine sur le PVA.

i) <u>Etape de tosylation</u>

Il est difficile de réaliser une azidation sur le PVA directement, car ce dernier est dépourvu de bon groupe partant. C'est dans cette optique qu'intervient l'étape de tosylation, en effet le 4-toluènesulfonyl est un meilleur groupe partant que le groupe hydroxyle pour la réaction d'azidation.

Dans un ballon bicol de 250 mL, 2 g de PVA sont dissous dans 100 mL d'eau MilliQ à 90 °C (le PVA n'étant pas soluble à température ambiante), sous agitation, à reflux pendant 2 h. Le PVA est totalement dissous lorsque la solution devient bien limpide, on laisse ensuite la solution revenir à température ambiante avant d'ajouter le TsCl puis la triéthylamine. La triéthylamine est ajoutée en excès et va aider à éliminer le HCl libéré pendant la réaction. Le TsCl étant peu soluble dans l'eau, la solution a un aspect turbide lors de l'ajout. Le mélange

est laissé ensuite sous agitation à température ambiante pendant 24 h. Les quantités de réactifs ajoutées sont répertoriées dans le tableau ci-dessous en fonction des taux de greffage finaux visés (Tableau VI.4).

Taux de greffage visé	V_{Eau} *(mL)*	m_{PVA} *(g)*	m_{TsCl} *(g)*	V_{Et3N} *(mL)*
0,5%	100	2	0,043	10
5%	100	2	0,43	10
25%	100	2	2,17	10

Tableau VI.4. Quantité de réactifs introduit en fonction du taux de greffage souhaité.

La solution est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif (45 °C, 50 mbar) permettant ainsi d'éliminer successivement la triéthylamine puis l'eau. Dans la solution visqueuse, est ensuite ajouté un excès d'éthanol afin de précipiter le PVA-Ts qui est ensuite filtré sur verre fritté puis rincé plusieurs fois à l'éthanol pour éliminer le tosyl qui n'aurait pas réagi.

Une petite quantité du produit récupéré est mise de côté afin de caractériser le polymère, le reste peut ensuite directement être utilisé pour l'étape d'azidation.

Après séchage du produit, un spectre RMN ^{1}H a été réalisé sur le polymère afin de suivre la fonctionnalisation de ce dernier. Le PVA-Ts et du TsCl seul ont été dissous dans du DMSO-*d6* (20 mg/mL) afin de réaliser les spectres.

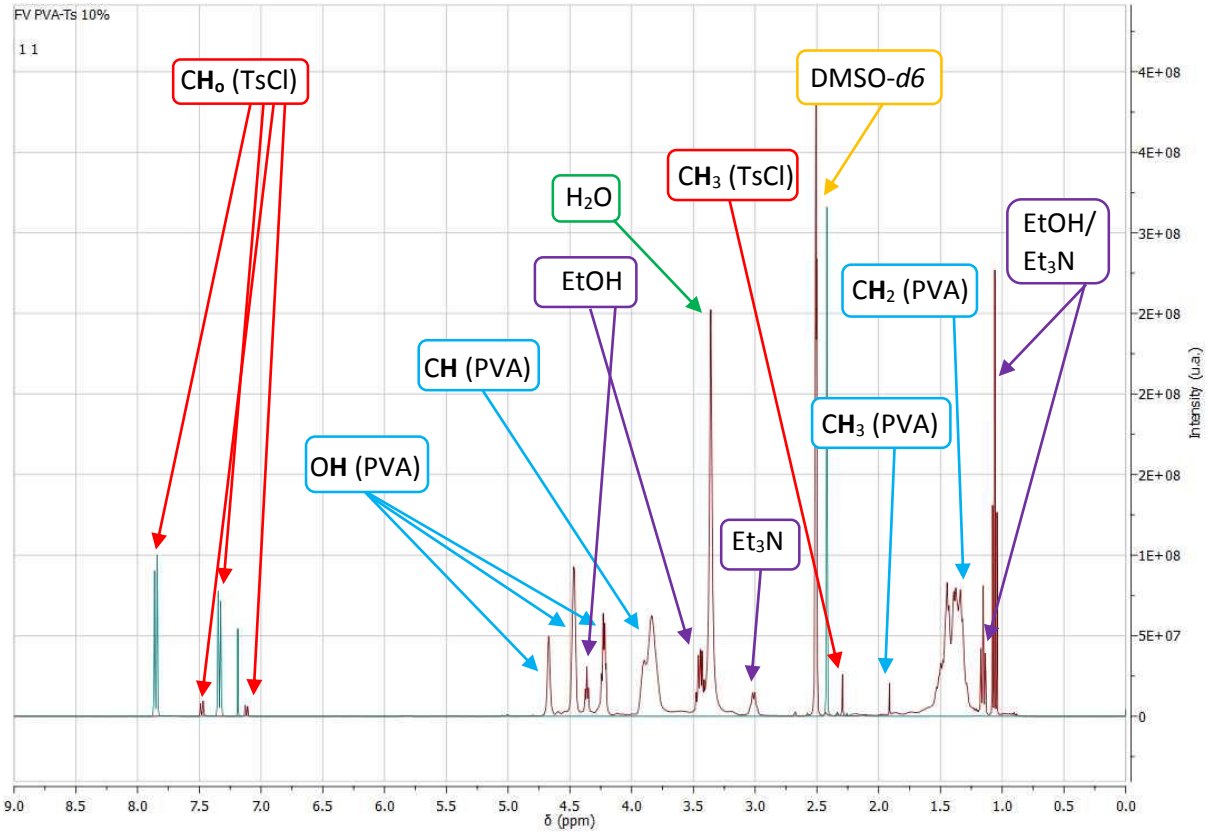


Figure VI.17. Spectre RMN 1H du TsCl (bleu) et du PVA-Ts (rouge) dans du DMSO-d6.

Sur le spectre RMN du tosyl, on peut constater la présence du pic correspondant aux protons C**H** situés sur le cycle à δ = 7,4 ppm et δ = 7,9 ppm et du groupement C**H₃** à δ = 2,25 ppm.

Concernant le PVA après tosylation, on peut observer le signal des protons liés aux groupements : C**H₂** à δ = 1,4 ppm ; C**H**-O à δ = 3,7 ppm ; CH-O**H** à 4,2 < δ < 4,7 ppm ; C**H₃** à δ = 1,9 ppm.

Les signaux à δ = 1 ppm ; δ = 3,4 ppm et δ = 4,4 ppm peuvent être attribués à des résidus d'éthanol.

D'après le spectre, on peut observer la présence des signaux des protons du TsCl bien présents après l'étape de tosylation. Par ailleurs le shift des déplacements chimiques laisse penser que l'on a bien fonctionnalisation du PVA. En effet, les déplacements chimiques sont en partie liés à la densité électronique autour du noyau et à ce que l'on appelle l'effet de blindage ou de déblindage[239]. L'aspect théorique de cet effet ne sera pas discuté ici, mais, brièvement, un groupement attracteur diminue la densité électronique (déblindage) et provoque la résonance du proton vers les champs faibles (fréquence plus élevée). De ce fait, un groupement donneur augmente la densité du champ électronique (blindage) et provoque la résonance du proton vers les champs plus élevés (fréquence plus faible). Dans ce cas, le TsCl perd son atome de chlore qui est un halogène, donc un groupement attracteur. On passe donc d'un état déblindé à un état blindé qui a pour conséquence de déplacer les signaux vers un plus petit déplacement chimique.

En se basant sur les résultats de RMN, il est possible de confirmer la présence de groupements tosyl après réaction. L'intensité des pics laisse penser qu'une faible quantité de tosyl a réagi. Cette quantité reste tout de même suffisante pour passer à l'étape de substitution par des groupements azotures.

ii) <u>Etape d'azidation</u>

Le PVA étant maintenant fonctionnalisé avec un groupe partant, il est possible de réaliser l'azidation pour obtenir un PVA avec des groupements pendants azotures (PVA-N_3).

Dans un ballon bicol de 250 mL, dissoudre le PVA-Ts synthétisé précédemment dans 100 mL d'eau à 90 °C, sous agitation, à reflux pendant 2 h. Une fois la solution totalement limpide, descendre ensuite la température à 80 °C avant d'ajouter l'azoture de sodium puis agiter à reflux pendant 48 h. L'azoture de sodium a été ajouté à ratio $^{n_{NaN_3}}/_{n_{TsCl}}$ de 1 pour l'échantillon PVA-Ts (25 %). Le ratio $^{n_{NaN_3}}/_{n_{TsCl}}$ a par la suite été fixé à 2 pour les échantillons PVA-Ts (0,5 % et 5 %) notamment pour assurer une substitution totale des fonctions tosyl (Tableau VI.5).

Taux de greffage visé	*V_{Eau} (mL)*	*$m_{PVA\text{-}Ts}$ (g)*	*m_{NaN3} (g)*
0,5%	100	2	0,029
5%	100	2	0,295
25%	100	2	0,738

Tableau VI.5. Quantité de réactif introduite en fonction du taux de greffage final visé.

Le produit est dialysé (coupure 12 kDa) par de l'eau ultra pure pendant 120 h à température ambiante sous agitation. Le bain de dialyse doit être changé toutes les deux heures. La solution dialysée est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif (45 °C, 50 mbar) avant d'être précipitée dans l'éthanol, filtrée, puis lavée plusieurs fois à l'éthanol. Une partie du PVA-N_3 est récupérée pour la caractérisation, le reste servant à la dernière étape de synthèse.

Après séchage du produit, un spectre RMN ^{1}H a été réalisé pour s'assurer que tout le tosyl avait été substitué et en parallèle, un spectre infrarouge a été effectué pour montrer la présence du groupe azoture. Pour la caractérisation en RMN, le PVA-N_3 a été dissous (20 mg/mL) dans du DMSO-*d6*. (Figures VI.18 et VI.19)

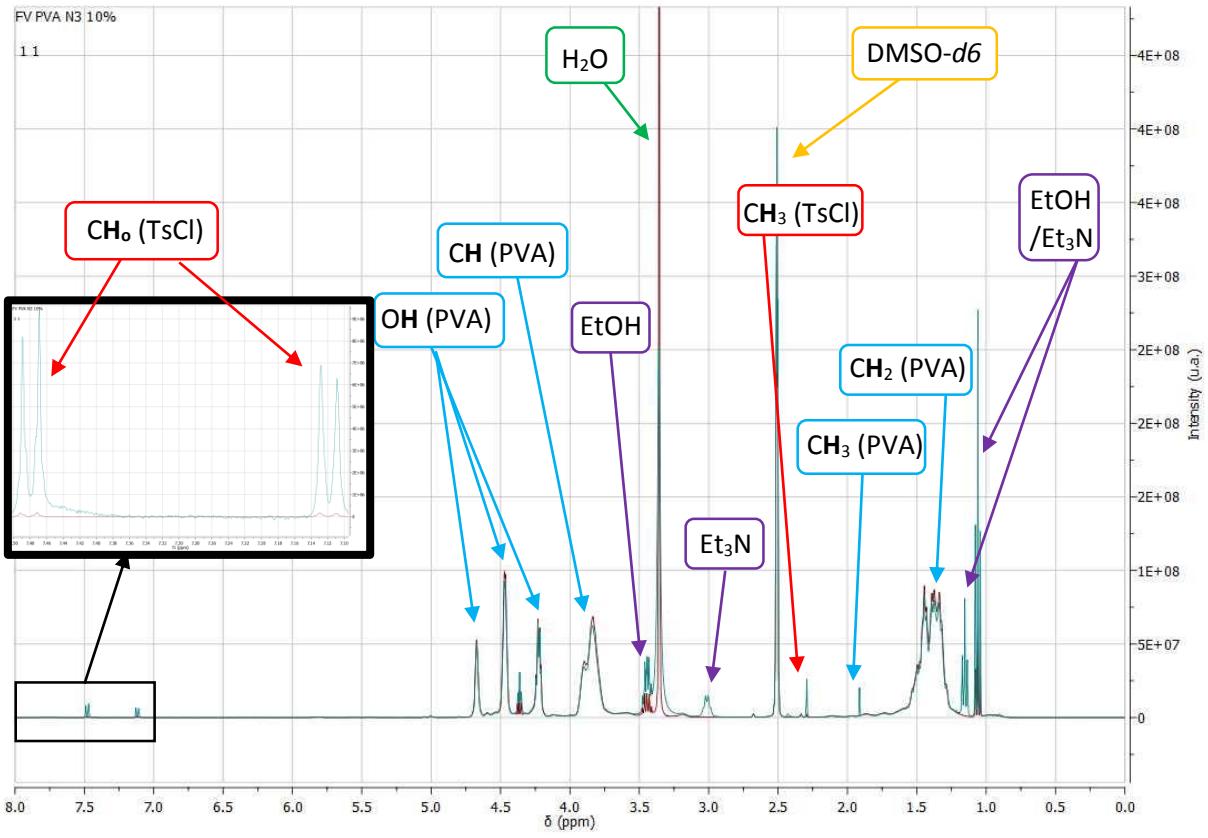


Figure VI.18. Spectre RMN 1H du PVA-N3 (rouge) et du PVA-Ts (bleu).

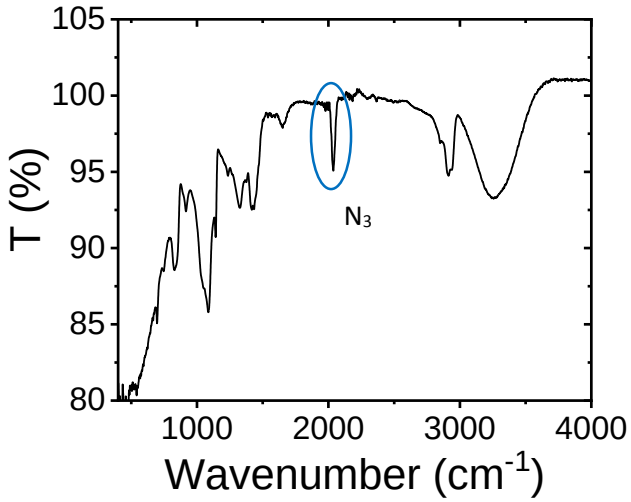


Figure VI.19. Spectre infrarouge du PVA-N3.

Sur le spectre RMN du PVA-N_3, on peut observer une nette diminution du signal des protons C**H** du tosyl situés sur le cycle à δ = 7,4 ppm et δ = 7,9 ppm. Par ailleurs, il est possible d'observer une persistance des traces d'éthanol servant à la précipitation de l'échantillon.

Le spectre infrarouge du polymère lui confirme la présence du groupement azoture caractérisé par un pic à 2100 cm^{-1}.

La diminution du signal de groupements tosyl en RMN du proton et l'apparition du pic caractéristique du groupement azoture en spectroscopie IR laisse penser que la réaction a bien eu lieu avec la substitution partielle des groupements tosyl. Il est donc possible de passer à la dernière étape de chimie « click ».

iii) <u>Etape de greffage par la voie « click »</u>

La « click » est la dernière étape qui va consister à greffer la poly-L-lysine sur le PVA-N_3 par l'intermédiaire de la réaction de cycloaddition entre les groupements azotures et les fonctions alkynes. La poly-L-lysine ne comportant qu'une fonction alkyne en fin de chaîne, la quantité de polymère requise pour l'étape de « click » peut devenir rapidement importante, notamment si sa masse molaire est élevée. Faute d'une quantité de PLL suffisante, le taux de greffage visé a été de 0,1 % soit 5 chaînes de PLL par squelette de PVA.

Dans un ballon bicol de 100 mL, dissoudre dans 50 mL d'eau milliQ 0,5 g de PVA à 80 °C, sous agitation, à reflux pendant 2 h. En parallèle, dissoudre 105 mg d'ascorbate de sodium (réducteur) dans 5 mL d'eau milliQ et 65 mg de sulfate de cuivre (catalyseur) dans 5 mL d'eau milliQ. La solution de PVA-N_3 est amenée à température ambiante avant d'ajouter la poly-L-lysine (6300 g/mol) et les solutions d'ascorbate de sodium et de sulfate de cuivre. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 48 h (Tableau VI.6).

V_{Eau} (mL)	$m_{PVA\text{-}N3}$ (g)	m_{PLL} (g)	m_{NaAs} (g)	m_{CuSO4} (g)
50	0,5	0,061	0,105	0,065

Tableau VI.6. Quantité de réactif introduite pour la synthèse du PVA-g-PLL.

La solution est ensuite dialysée (coupure 12 kda) dans de l'eau ultra pure pendant 72 h à température ambiante sous agitation. Le bain de dialyse doit être changé toutes les deux heures. Par ailleurs, on peut noter lors de l'étape de « click » la présence, faible, d'une teinte bleue après dialyse, possiblement provoquée par la présence résiduelle de cuivre. (Figure VI.20)

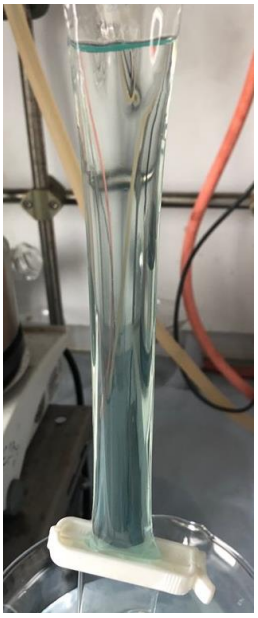


Figure VI.20. Produit de dialyse du PVA-g-PLL.

Enfin, le produit est précipité dans l'éthanol, filtré et lavé plusieurs fois à l'éthanol puis séché avant caractérisation.

Comme pour l'étape précédente, un spectre RMN ^{1}H du PVA-*g*-PLL est réalisé dans du DMSO-*d6* (20 mg/mL) en parallèle d'un spectre infrarouge pour vérifier l'absence de la bande liée à l'azoture (Figures VI.21 et VI.22).

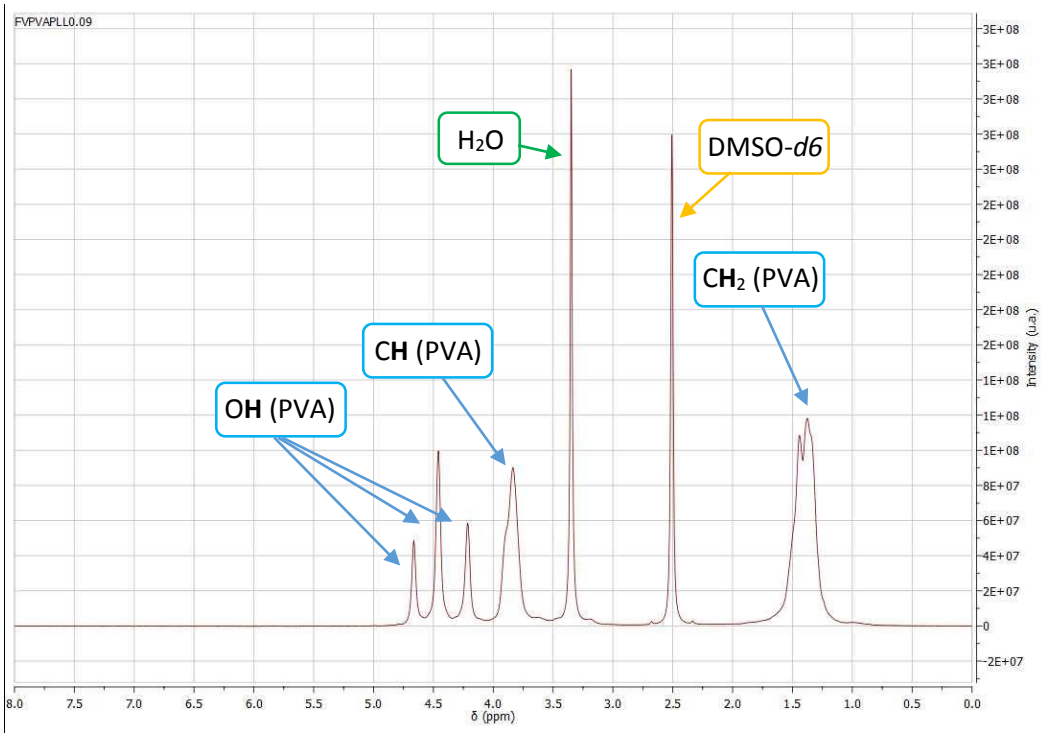


Figure VI.21. Spectre RMN 1H du PVA-g-PLL.

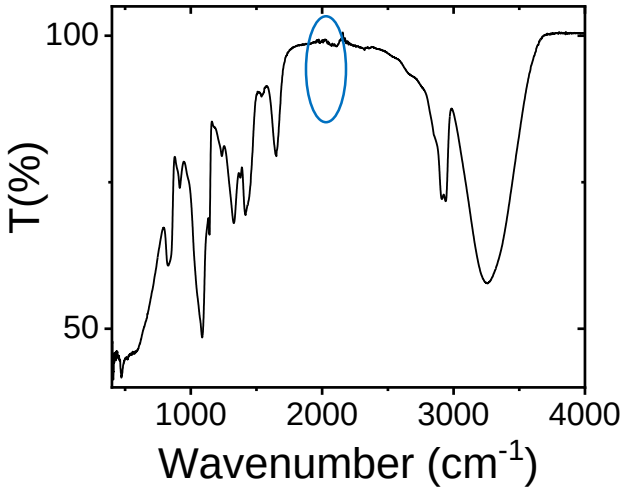


Figure VI.22. Spectre infrarouge du PVA-g-PLL.

On peut observer sur le spectre infrarouge, l'absence du pic lié aux groupements azotures. Ce résultat laisse penser que l'étape de « click » a possiblement fonctionné.

Cependant, le spectre RMN du polymère montre seulement des signaux propres au PVA. Aucun signal des protons liés à la poly-L-lysine ne sont observés. Par ailleurs le signal du proton lié au cycle azoture, qui devrait se trouver à δ = 7,6 ppm, n'est pas présent sur le spectre. Ce résultat permet de conclure que la « click » n'a pas eu lieu, possiblement car la quantité de poly-L-lysine peut être trop faible soit pour fonctionner soit pour être détectée.

La dernière étape ne montre pas la présence de chaînes de PLL. Si les raisons précédentes peuvent expliquer cette absence, une explication supplémentaire va être détaillée ci-dessous dans les travaux réalisés sur ce système au laboratoire MSC avec la technique de RMN DOSY.

Une nouvelle étape de tosylation est réalisée (fonctionnalisation à 25 %). Dans un ballon bicol de 250 mL, 2 g de PVA est dissout dans 100 mL d'eau milliQ à 90 °C sous agitation. Une fois la solution limpide, faire revenir la solution à température ambiante. Ajouter ensuite 2,3 g de TsCl et 7 mL de triéthylamine. Le mélange est laissé sous agitation pendant 24 h. Les quantités de réactifs ajoutées sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

V_{Eau} (mL)	m_{PVA} (g)	m_{TsCl} (g)	V_{Et3N} (mL)
100	2	2,3	7

Tableau VI.7. Quantité de réactif pour l'étape de tosylation.

La solution est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif (45 °C, 50 mbar) permettant ainsi d'éliminer successivement la triethylamine puis l'eau. Dans la solution visqueuse, est ensuite ajouté un excès d'éthanol afin de précipiter le PVA-Ts qui est ensuite filtré sur verre fritté puis rincé plusieurs fois à l'éthanol pour éliminer le tosyl qui n'aurait pas réagi.

Après séchage du produit, un spectre RMN ^{1}H et un spectre RMN DOSY ont été réalisés par François Ribot sur le polymère afin de suivre la fonctionnalisation de ce dernier (Figures VI.23 et VI.24). Le PVA-Ts a été dissous (31,4 mg/mL) dans du DMSO-*d6* afin de réaliser les spectres.

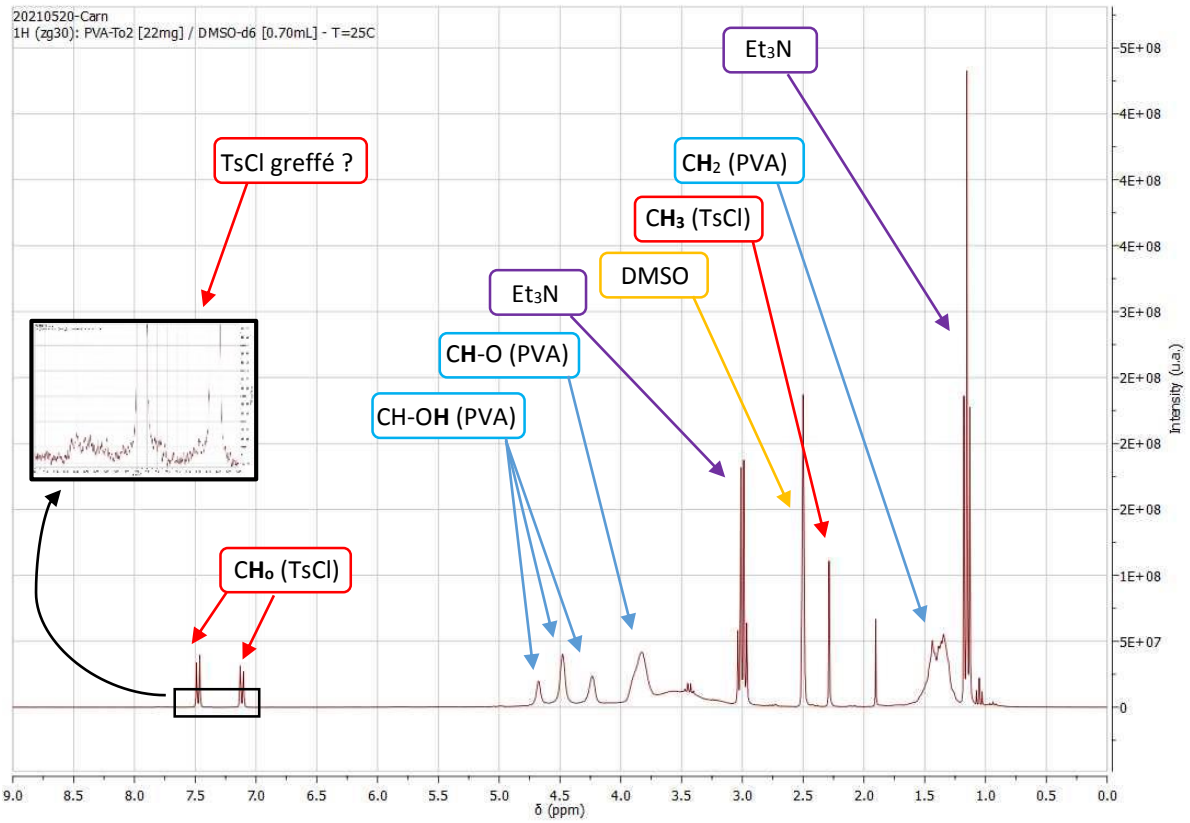


Figure VI.23. Spectre RMN 1H du PVA-Ts.

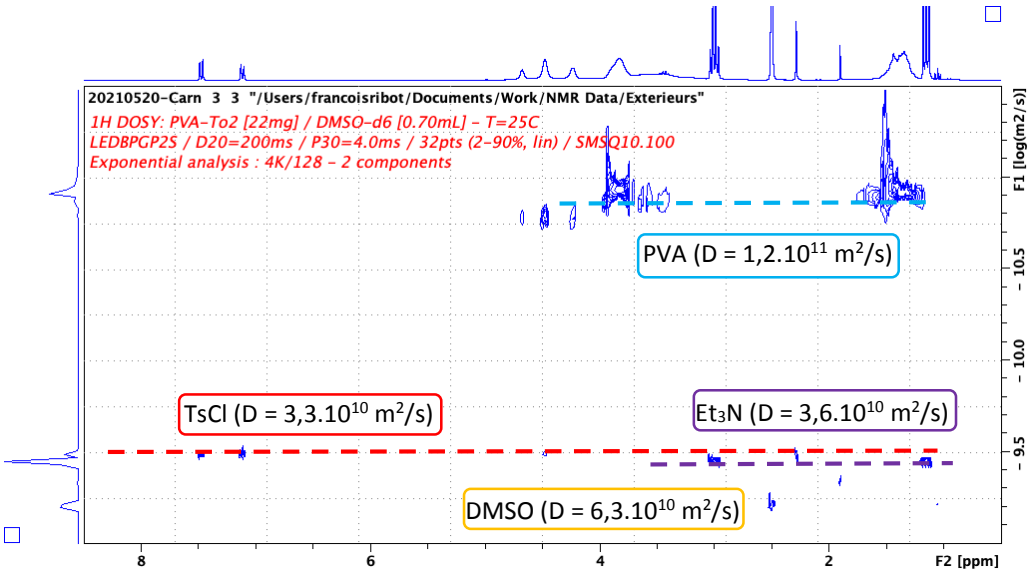


Figure VI.24. Spectre RMN DOSY du PVA-Ts.

Sur le spectre RMN du proton du copolymère, on observe des pics liés à la globalité des espèces dont des impuretés liées à la triéthylamine.HCl. Si l'on se base seulement sur ce spectre RMN, comme pour les résultats obtenus à Bordeaux, on pourrait conclure au greffage du tosyl sur le PVA. Cependant, l'analyse en RMN DOSY apporte une réponse supplémentaire

très importante puisque ce spectre nous montre que toutes les espèces présentes sont caractérisées par des coefficients de diffusion tous différents. Or, dans le cas où le PVA aurait été correctement substitué par le tosyl, on devrait alors retrouver une composante commune à ces deux espèces ce qui n'est pas le cas. Le mauvais greffage du tosyl peut donc expliquer les mauvais résultats obtenus pour l'étape de click.

Les résultats obtenus sont bien différents des travaux répertoriés dans la littérature dont nos protocoles se sont inspirés. Cependant, on trouve dans la littérature des techniques de caractérisation qui, selon nous, n'apportent pas la confirmation d'un greffage des deux molécules. Le spectre RMN du proton ou encore les analyses en XPS donnent des résultats sur les espèces présentes dans le produit final, mais ne confirment pas le greffage.

Pour conclure sur cette voie de synthèse, il pourrait été intéressant de travailler sur une autre base de squelette dont la substitution ou le greffage sur les groupes pendants serait plus aisé que sur le PVA. Dans l'optique d'avoir des taux de greffages suffisamment élevés, il serait nécessaire de travailler avec une quantité de poly-L-lysine bien plus élevée. Cependant, face à la difficulté de réaliser cette synthèse à plus grande échelle, notamment due au prix du produit et à la grande quantité requise, la voie du greffage direct de la poly-L-lysine sera délaissé au profit d'un greffage de molécule moins onéreuse et disponible en plus grande quantité.

VI) Voie estérification

a) Etat de l'art

La modification du PVA par réaction d'estérification avec d'autres molécules ou nanoparticules est une voie de synthèse peu explorée. On peut mentionner les travaux de Fu et al.[240] et Lin et al.[241] qui ont travaillé sur la fonctionnalisation de nanotubes de carbone par du PVA dans du DMSO avec des catalyseurs dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et 4-diméthylaminopyridine (DMAP) afin d'obtenir des films composites avec une amélioration des propriétés mécaniques (Figure VI.25).

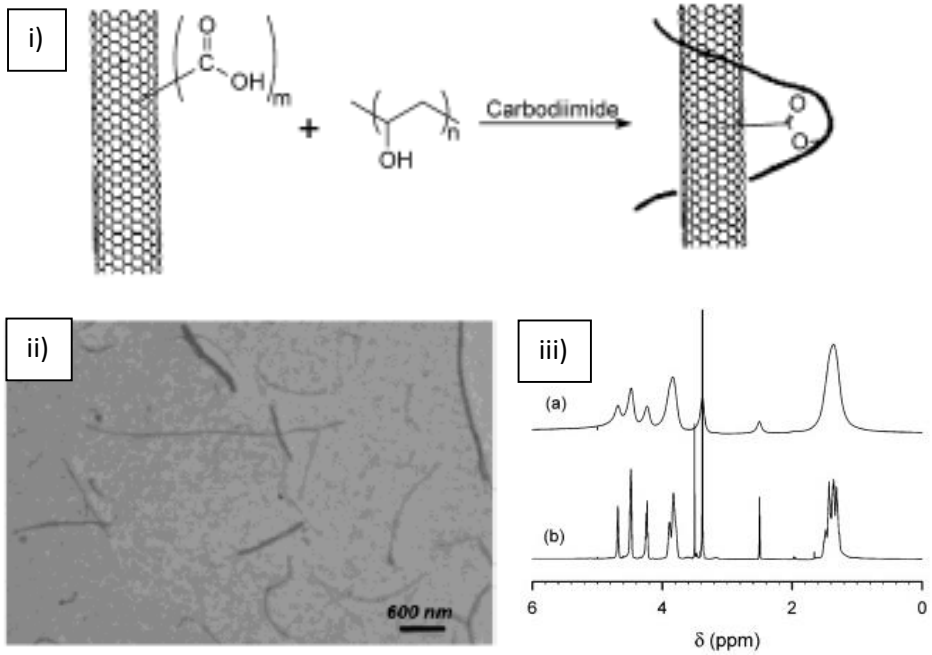


Figure VI.25. (i) Schéma et (ii) image de microscopie électronique en transmission de nanotubes de carbone (MWCNTs) fonctionnalisés avec du PVA par estérification. (iii) Spectre RMN 1H du PVA-MWCNTs (a) et du PVA seul (b). Issue des travaux de Lin et al.[241].

Ici, les deux briques élémentaires utilisées sont de taille nanométrique. On peut donc imaginer que l'estérification d'un polymère le long du squelette du PVA est possible. Dans la suite, je présenterais les résultats concernant la synthèse de PVA-*g*-PLL inspirés des travaux de Fu et al.[240] et Lin et al.[241] qui utilisent une estérification de Steglich[242].

b) Synthèses et caractérisations

Dans le cadre de cette synthèse, nous ferons le choix de travailler en utilisant l'estérification de Steglich[242] qui met en jeu l'utilisation de deux catalyseurs, le dicyclohexylcarbodiimide et le 4-diméthylaminopyridine. La particularité de cette réaction est de consommer de l'eau pour former un sous-produit dicyclohexylurée (DCU). Nous avons donc travaillé dans un solvant anhydre qui sera le DMSO. Le choix de ce solvant est basé sur sa compatibilité avec les deux espèces utilisées à savoir le PVA et le polystyrène sulfonate fonctionnalisé par un acide carboxylique en bout de chaîne.

Pour cette réaction, le PVA provient de chez Sigma-Aldrich avec une masse molaire de 40000 g/mol et un degré d'hydrolyse de 85 %. Le DCC, DMAP, acétate d'éthyle et DMSO anhydre proviennent tous les quatre de chez Sigma-Aldrich. Le PSS (2500 g/mol Ip = 1,7, 5000 g/mol Ip = 1.07 et 10000 g/mol Ip = 1.03) a été synthétisé et caractérisé par Guillaume Pino (étudiant en thèse 2018/2021) au Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques de Bordeaux (Figure VI.26).

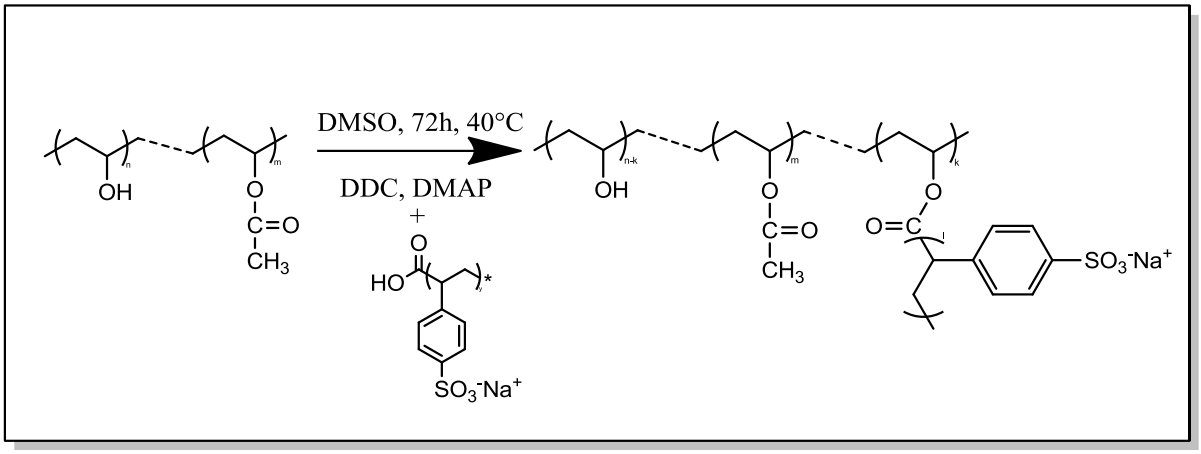


Figure VI.26. Schéma de synthèse du PVA-g-PSS par voie estérification.

Les synthèses ont été réalisées avec un PSS 10000 g/mol et un PVA 40000 g/mol. Les quantités de réactifs seront détaillées dans deux tableaux différents pour les différentes synthèses.

Dans un ballon bicol, dissoudre le PVA dans le DMSO à 80 °C à reflux, sous agitation pendant 2 h. En parallèle, dissoudre 2,3 g de PSS 10000 g/mol dans 50 mL de DMSO (4,6 mM). Une fois la solution limpide, abaisser la température de la solution à 40 °C puis ajouter la solution de PSS goutte à goutte et laisser sous agitation pendant 30 minutes. Finir en ajoutant les catalyseurs DCC et DMAP. Laisser la solution sous agitation pendant 72 h.

À la fin de la synthèse, précipiter la solution dans de l'éthyl acétate puis filtrer et laver plusieurs fois à l'éthyl acétate. Une étape de purification est nécessaire pour éliminer les chaînes de PSS qui n'auraient pas réagi. Le produit est dialysé (coupure 25 kda) dans l'eau milliQ à température ambiante sous agitation. Le bain de dialyse est changé toutes les 3 h pendant 5 jours. (Tableau VI.8).

Taux de greffage visé	m_{PVA} *(g)*	$V_{DMSO(PVA)}$ *(mL)*	m_{PSS} *(g)*	$V_{DMSO(PSS)}$ *(mL)*	m_{DCC} *(g)*	m_{DMAP} *(g)*
100%	0,008	9	2,3	50	0,052	0,056

Tableau VI.8. Quantité de réactifs utilisée pour la réaction d'estérification.

Le polymère issu de la synthèse a été caractérisé en RMN ^{1}H et RMN DOSY pour vérifier si le greffage du PSS sur le squelette de PVA a fonctionné (Figures VI.27 et VI.28).

Les spectres RMN ^{1}H des composés seuls (PVA et PSS) ont été réalisés et disponibles dans la partie annexe chapitre V (Figures A1-A6).

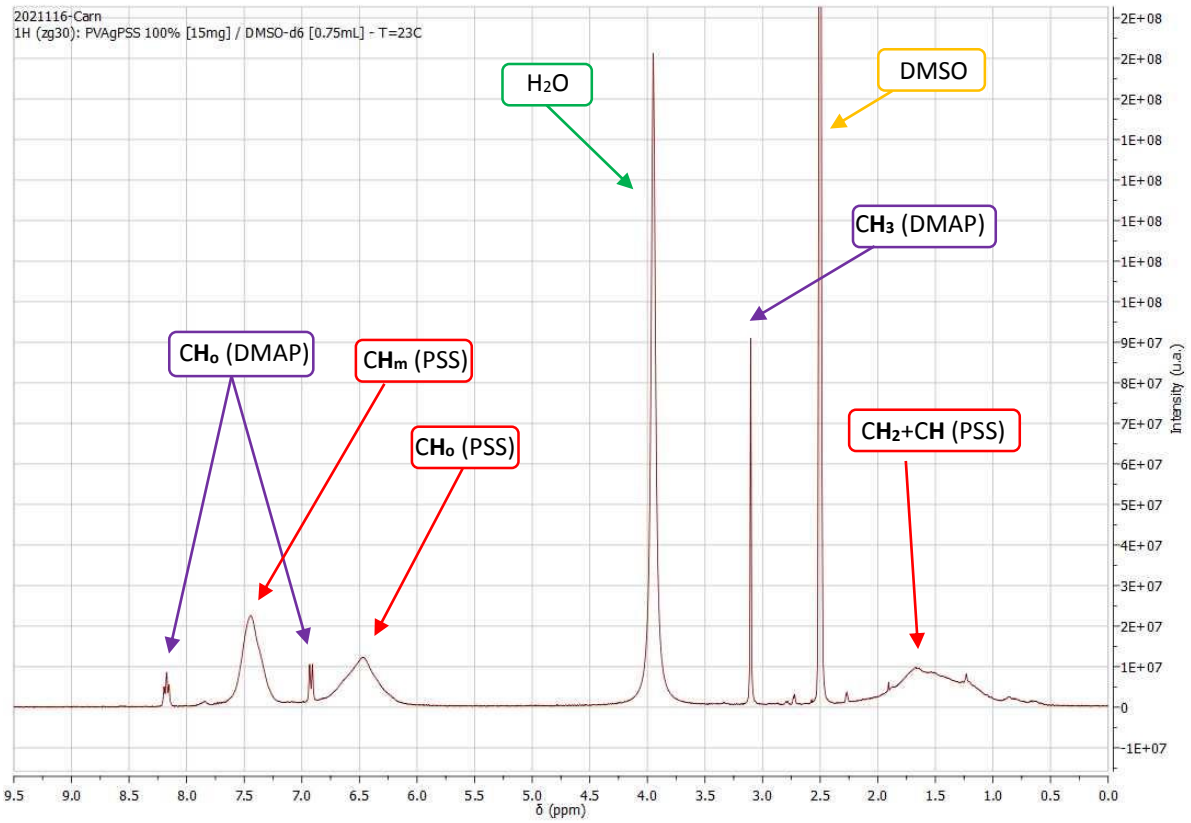


Figure VI.27. Spectre RMN 1H du PVA-g-PSS.

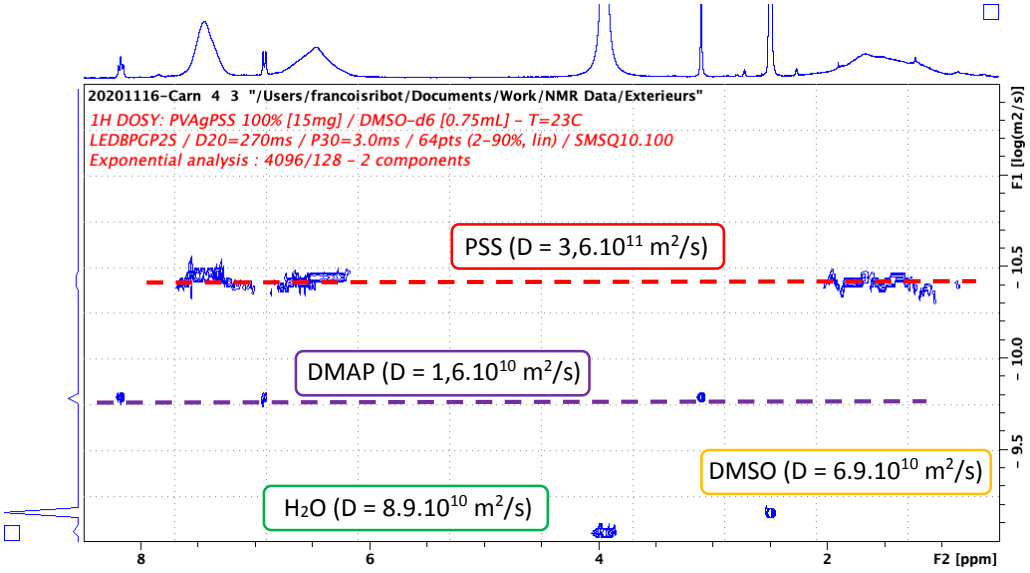


Figure VI.28. Spectre RMN DOSY du PVA-g-PSS (100%), analyse exponentielle.

Le spectre RMN du proton du produit de synthèse nous montre la présence de deux espèces avec les signaux à δ = 7,4 ppm / δ = 6,4 ppm / δ = 1,7 ppm liés au PSS et les signaux à δ = 8,2 ppm / δ = 6,9 ppm / δ = 3,1 ppm liés aux résidus de DMAP.

Le spectre RMN DOSY confirme cette tendance avec les coefficients de diffusion des chaînes de PSS et du DMAP.

L'absence de PVA dans le produit final est probablement liée à la faible quantité utilisée pour la réaction qui ne permet pas de détecter le squelette. Dans l'optique d'obtenir un taux de greffage maximal et avec une quantité de PSS limité, nous avons fait le choix de travailler avec une faible quantité de PVA.

Une nouvelle synthèse a été réalisée avec une quantité de PVA plus élevée, mais en visant un taux de greffage moins important, 2 %, qui permet tout de même de détecter le PSS en RMN. Le protocole étant identique, nous ne montrerons que les résultats obtenus en RMN ^{1}H et RMN DOSY (Figures VI.29 et VI.30).

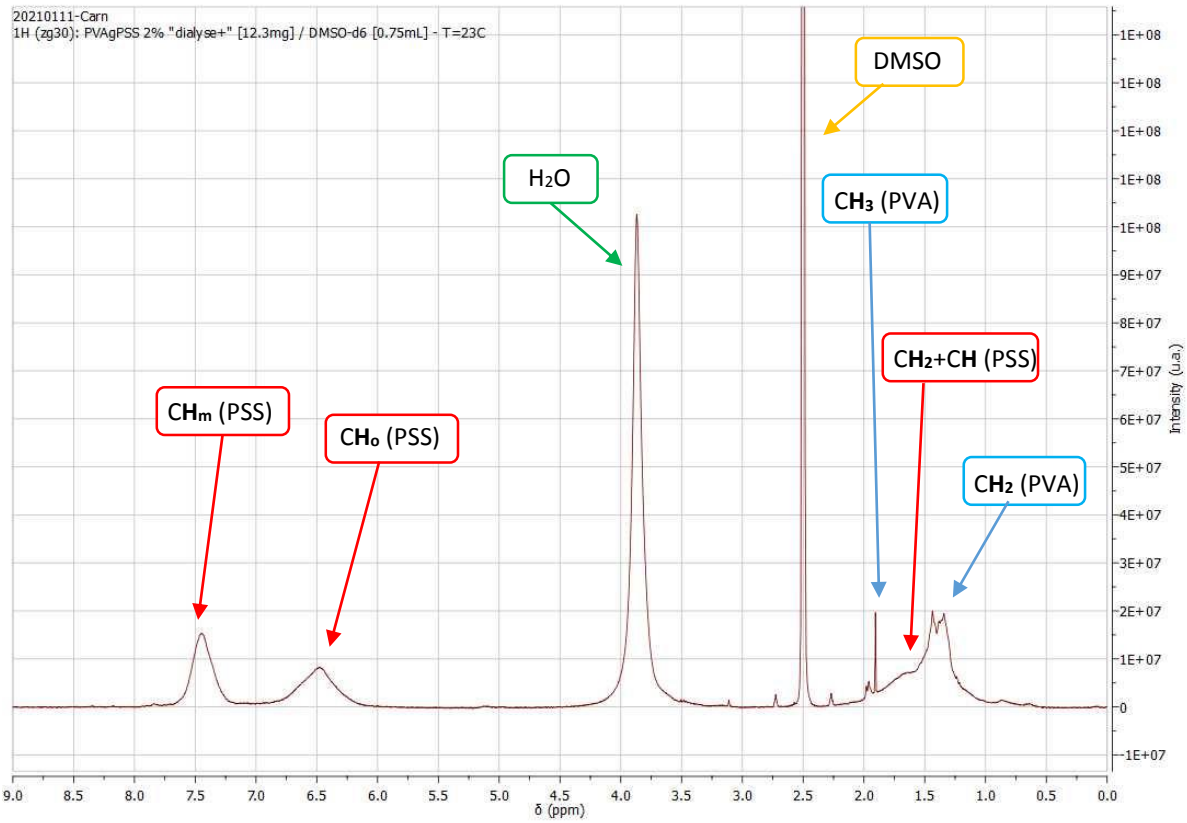


Figure VI.29. Spectre RMN 1H du PVA-g-PSS.

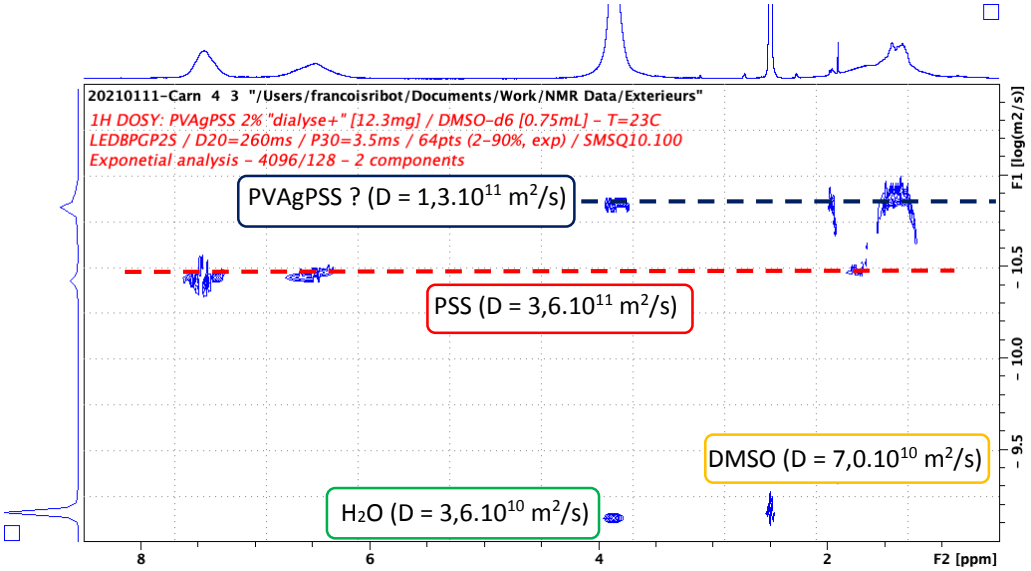


Figure VI.30. Spectre RMN DOSY du PVA-g-PSS, analyse exponentielle.

Sur le spectre RMN du proton, nous retrouvons les composantes associées au PVA et au PSS avec disparition des signaux liés au DMAP.

Cependant, la caractérisation en RMN DOSY nous montre deux coefficients de diffusion très différents et aucune composante commune ce qui signifie que les deux espèces ne sont pas greffées ou en quantité infime.

Les travaux de Fu et al. et Lin et al. montraient des résultats obtenus pour un système avec une espèce commune, le PVA et dans leur cas des nanotubes de carbones. Ces nanoparticules peuvent présenter un comportement très différent de notre polyélectrolyte (PSS) ce qui peut expliquer l'absence de greffage dans notre cas.

Dans l'optique de travailler avec des systèmes plus proches, une nouvelle synthèse a été réalisée avec un protocole basé sur les travaux de Liu et al.[243]. Ces travaux consistent à montrer la différence de greffage entre une estérification par voie chimique ou en phase solide avec un système PVA/acide malonique. L'estérification par voie chimique est réalisée avec les mêmes produits de synthèse (DMSO, DCC et DMAP), seul le protocole diffère.

Ce protocole a été réalisé avec du PSS 5000 g/mol et le même PVA a 40000 g/mol

Dans un ballon bicol le PVA et le PSS 5000 g/mol sont dissous dans 60 mL de DMSO anhydre à 105 °C à reflux sous agitation pendant 1 h 30. En parallèle, le DCC et le DMAP sont dissous dans 5 mL de DMSO anhydre. Après 1 h 30, laisser la solution revenir à température ambiante avant d'ajouter la solution de catalyseur. Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 5 jours. Les étapes de précipitation, filtration et purification sont les mêmes que celles citées dans la synthèse précédente (Tableau VI.9).

Taus de greffage visé	m_{PVA} (g)	m_{PSS} (g)	$V_{DMSO(PVA/PSS)}$ (mL)	m_{DCC} (g)	m_{DMAP} (g)	$V_{DMSO(catal)}$ (mL)
5%	0,2	1,14	60	0,938	0,115	5

Tableau VI.9. Quantité de réactifs utilisé pour la réaction d'estérification.

Le produit a ensuite été caractérisé en RMN du proton et en RMN DOSY par François Ribot pour observer si le greffage a eu lieu (Figures VI.31 et VI.32).

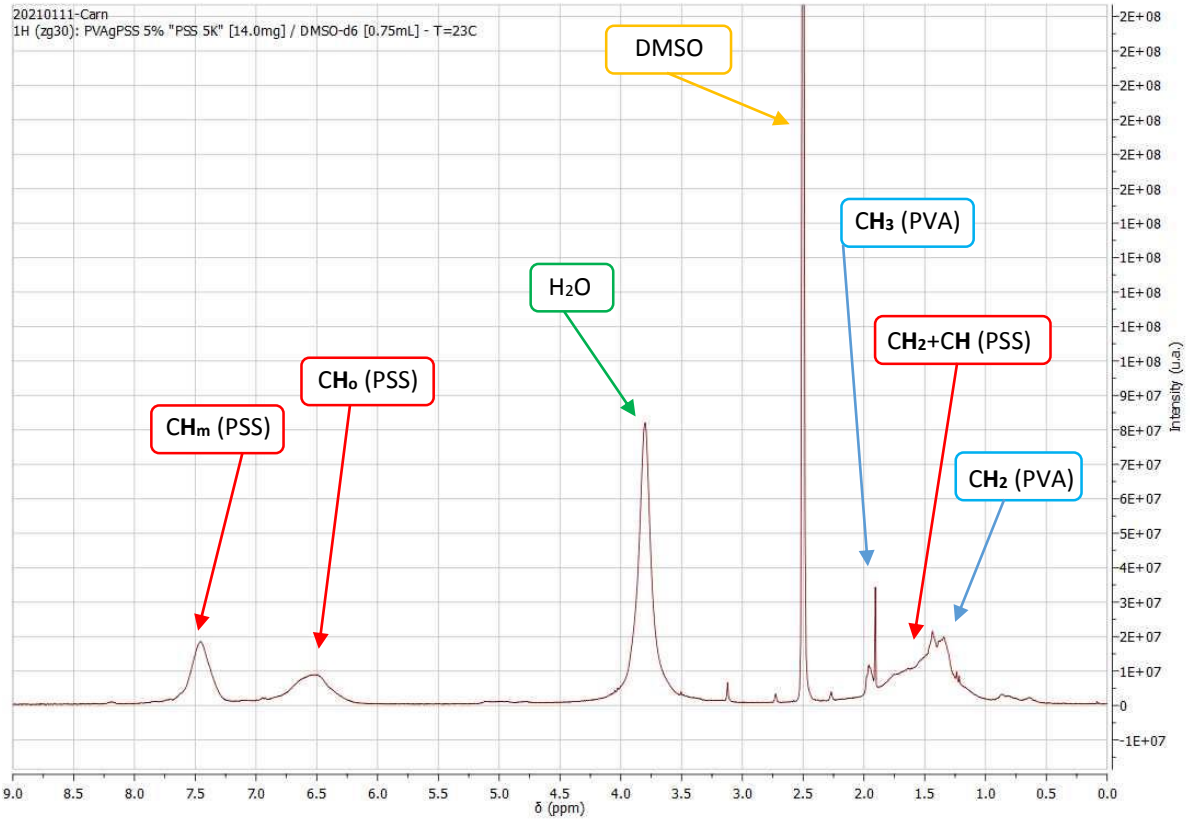


Figure VI.31. Spectre RMN 1H du PVA-g-PSS.

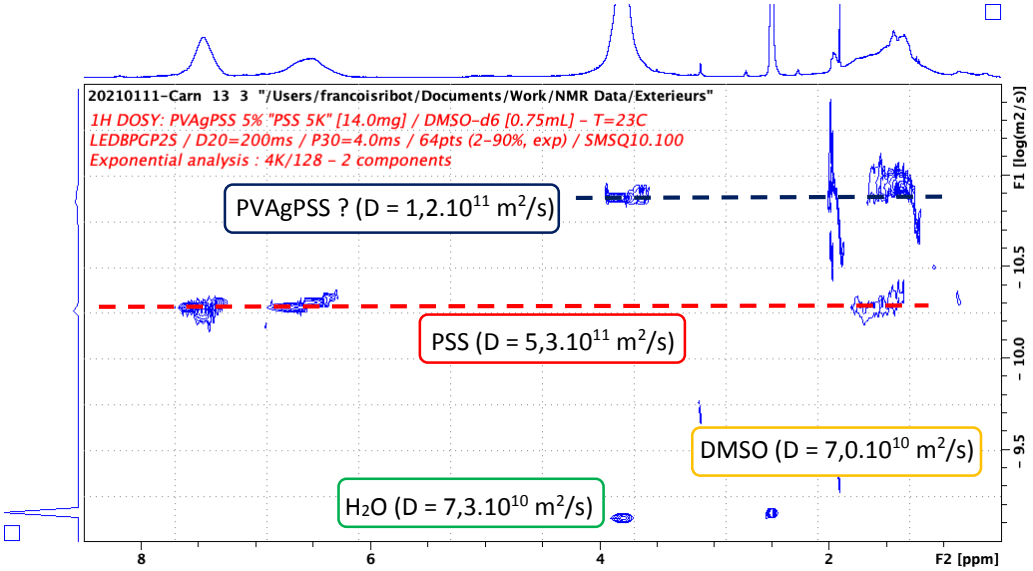


Figure VI.32. Spectre RMN DOSY du PVA-g-PSS, analyse exponentielle.

Le spectre RMN ^{1}H du polymère montre la présence des signaux du PVA et du PSS et l'absence de DMAP comme pour la synthèse précédente

Selon les méthodes d'analyses utilisées, la RMN DOSY montre des résultats équivalents. En effet, la méthode d'analyse des profils d'atténuation montre la présence de signaux identiques pour le PSS et le PVA avec un coefficient de diffusion commun D = $1,1*10^{-11}$ m^2s^{-1} (Figure A7) que l'on retrouve en analyse exponentielle. Si ces résultats laissent penser au greffage du PSS, celui-ci a lieu en quantité vraiment infime.

Il est donc difficile de conclure sur le greffage de chaînes de PSS sur le squelette de PVA. Si l'on considère la méthode des profils d'atténuations, alors on peut considérer qu'une infime partie du PSS s'est greffée, mais cette quantité est beaucoup trop basse pour valider la voie de synthèse, mais également pour obtenir un polymère d'intérêt. Cela reste cependant encourageant pour la suite. Le système peut être perfectionnable notamment en travaillant avec un autre squelette ou en travaillant dans des solvants plus adaptés aux réactions d'estérification comme le dichlorométhane.

VII) Voie radicalaire

Une voie de synthèse basée sur la polymérisation radicalaire. Ces travaux ont été réalisés en fin de thèse et sont exposés dans la partie annexe. Les résultats n'ont pas été concluants mais manque, cependant, de caractérisations qualitatives.

VIII) Conclusion

Nous avons, à travers ce chapitre, exploré de nombreuses voies de synthèses afin de greffer des chaînes de polyélectrolytes sur un squelette non ionique polaire de PVA. Les

travaux décrivant ce type de système sont peu nombreux. La synthèse de ce type de molécules présente un grand défi. Les voies explorées ont conduit à des résultats peu concluants.

Cependant, il est à noter que ces voies restent tout de même intéressantes notamment la chimie « click » habituellement utilisée pour son haut rendement. La caractérisation en RMN DOSY nous a permis de mettre en évidence que l'étape de tosylation conduit à des rendements très faibles, en contraste avec ceux indiqués dans la littérature. Le PVA présentant l'inconvénient d'ajouter cette étape de tosylation, il serait intéressant par la suite de travailler un autre squelette permettant de s'affranchir de cette étape afin de pouvoir réaliser directement l'étape d'azidation, voire, de directement réaliser la « click » sur le squelette.

La voie estérification a montré des limites très rapidement vis-à-vis de notre système. En effet, l'utilisation d'un squelette de PVA nous a contraint à travailler dans un solvant peu efficace pour ce type de réaction. Cette voie de synthèse serait plus appropriée pour un système mettant en jeu un squelette soluble dans des solvants plus adaptés à l'estérification tel que le dichlorométhane.

Pour conclure, les difficultés rencontrées pendant ces travaux sont étroitement liées au squelette de PVA choisi pour les synthèses. Il serait plus intéressant par la suite de travailler avec un squelette non ionique polaire plus adaptés type poly(imidazole).

Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié les processus de complexation électrostatique entre des nanoparticules d'or et des longues chaînes de polyélectrolytes de différentes natures. L'objectif principal était ainsi d'obtenir, par simple mélange en milieu aqueux, des assemblages nanométriques comprenant un nombre limité de nanoparticules d'or en contact étroit afin de permettre un couplage plasmonique entre particules adjacentes. Cet objectif était lié aux applications exploitant le dégagement local d'énergie induit par l'excitation du plasmon à l'aide d'un rayonnement lumineux dans le proche infrarouge. Dans ce cadre, la volonté de former des agrégats de taille finie était motivée par plusieurs résultats de simulations numériques montrant que le facteur d'amplification de la section efficace d'absorption d'un agrégat, en comparaison de particules individuelles, sature au-delà d'un nombre d'agrégation de l'ordre de 30 particules par agrégats. En outre, la densité importante de l'or favorise une sédimentation rapide des agrégats lorsque le nombre d'agrégation devient important, ce qui est un inconvénient pour les applications nécessitant des milieux homogènes.

Le travail s'est développé autour de deux approches respectivement basées sur des chaînes polyélectrolytes linéaires ou de type « peigne ». Dans les deux cas, nous avons considéré des particules d'or recouvertes de citrate et des chaînes dont le squelette présente une longueur de contour beaucoup plus grande que le périmètre des particules afin de permettre la collection de plusieurs d'entre elles par chaîne.

Dans la deuxième partie, nous avons utilisé des chaînes polycationiques de chitosan. Ce choix était d'abord guidé par l'état de l'art montrant le potentiel de ce polymère pour permettre la formation d'agrégats de particules de structures variées. Nous avions aussi la volonté d'utiliser un polymère naturel suivant une démarche sobre et durable. Néanmoins, il avait été montré qu'un inconvénient notable du chitosan était la dépendance de sa charge avec le pH le rendant faiblement compatible avec les particules citratées les plus courantes. Un premier travail a donc été de « quaterniser » les chaînes de chitosan afin d'obtenir un polycation fort, susceptible de se coupler avec les particules sur une large gamme de pH. Ensuite, l'étude du diagramme d'état du système particules d'or/chitosan quaternisé en régime dilué de chitosan dans l'eau milliQ nous a permis de montrer que les assemblages formés au voisinage de la stœchiométrie de charge entre les deux partenaires étaient ceux présentant, à la fois, les meilleures propriétés optiques, et, la moins bonne stabilité colloïdale. Nous avons alors essayé de stabiliser ces suspensions d'assemblages globalement neutres par l'ajout de chaînes polyélectrolytes. Cette démarche originale nous a permis d'identifier des conditions expérimentales permettant de former des suspensions liquides, stables, sans modification de la structure de l'assemblage de particules et des propriétés optiques associées. Nous avons montré que ces assemblages demeurent stables d'un point de vue structural et colloïdal dans différents milieux et que le signe de la charge globale est déterminé par le signe du polyélectrolyte utilisé pour stabiliser l'agrégat neutre. Nous avons proposé d'expliquer le processus de stabilisation en considérant que les agrégats globalement neutres présentent probablement des hétérogénéités de charges à l'échelle locale permettant le

couplage électrostatique de chaînes stabilisantes cationiques ou anioniques. Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre directement en évidence ce processus d'absorption par des techniques d'imagerie ou de diffusion du rayonnement en raison des faibles quantités de polymère mises en jeu et de leur faible contraste (i.e. électronique, neutronique).

Dans un second temps, nous avons utilisé une méthode de mélangeage rapide pour accroître la reproductibilité de ce processus d'assemblage en deux étapes et pour contrôler le nombre d'agrégation dans la gamme d'intérêt allant de 10 à 30 particules par agrégats. La méthode employée s'inspire d'un procédé microfluidique préexistant, dit de « flash chemistry », développé dans la dernière décennie pour contrôler des réactions rapides en synthèse organique. De manière décevante, les résultats obtenus à l'aide de ce dispositif se sont d'abord révélés moins reproductibles que ceux obtenus par la méthode de mélangeage « manuel » initiale. Nous avons analysé ce résultat en considérant que la conformation des longues chaînes polyélectrolytes utilisées pour assurer la formation du complexe neutre initial devait être fortement modifiée, et de façon chaotique, par le procédé de mélange turbulent. L'état de dispersion des particules n'étant pas affecté par le processus d'injection rapide, nous avons décidé de conserver le dispositif mais en induisant l'agrégation des particules par une élévation soudaine de la force ionique à l'aide d'un sel multivalent (i.e. $AlCl_3$). L'agrégation des particules est, dans ce cas aussi, arrêtée par l'injection rapide de chaînes polyélectrolytes après un temps d'agrégation donné. En effet, la modification de conformation supposée des chaînes polyélectrolytes dans l'écoulement turbulent ne semble pas modifier le processus de stabilisation. Les résultats obtenus de cette manière se sont révélés reproductibles. Nous avons pu montrer qu'il est possible d'obtenir des suspensions stables d'agrégats dont le nombre d'agrégation moyen est contrôlé entre 1 et 60 par le temps auquel est injecté le polymère stabilisant après induction de l'agrégation. L'évolution de la structure des agrégats avec leur taille suit la loi de puissance attendue pour un processus d'agrégation limité par la diffusion. En outre, la structure et la taille des agrégats obtenus aux temps longs sont similaires à celles obtenues par un mélange manuel. Ces résultats suggèrent que le procédé de mélange microfluidique n'influence pas la structure des assemblages obtenus.

Nous avons conclu cette première partie en sondant le potentiel des assemblages pour différentes applications dans le domaine biomédical (i.e. photothermie, photoacoustique et spectroscopie Raman exaltée de surface). La toxicité du chitosan s'est révélée rapidement problématique pour les applications en milieu cellulaire. En revanche, les assemblages se sont révélés être de bons substrats pour la spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) dans différents milieux. Nous avons ainsi pu quantifier la présence d'épinéphrine dans l'eau milliQ jusqu'à 0,1 µg/mL. Le signal s'est révélé encore exploitable dans les solutions de perfusion avec même une augmentation sensible d'intensité dans les solutions de NaCl 0,9%. Dans ce cas, les agrégats formés se sont révélés être de taille plus importante que ceux formés dans des conditions d'écrantage plus faibles. Cet aspect, que nous aurions pu anticiper, montre qu'il sera intéressant d'optimiser la taille des agrégats pour ces applications et de fixer les conditions d'écrantage au moment d'induire l'agrégation afin d'accroître la reproductibilité des mesures en terme de sensibilité.

Les résultats obtenus sur cette partie nous encouragent à poursuivre dans cette voie. En effet, nous avons montré qu'il est possible de former rapidement des suspensions stables d'assemblages plasmoniques dans différents milieux aqueux avec des composés courants. Néanmoins, il parait important de compléter ce travail sur plusieurs points. D'un point de vue fondamental, le contrôle du nombre d'agrégation rendu possible par le dispositif microfluidique peut permettre d'étudier expérimentalement la variation du facteur d'amplification de l'absorption d'un ensemble d'agrégats en suspension par rapport à des particules individuelles. Une telle étude serait complémentaire des travaux réalisés jusqu'alors par des approches numériques ou par des mesures sur des agrégats uniques déposés sur des surfaces. Le dispositif d'injection et de stabilisation pourrait être également utilisé pour préparer des suspensions de cristaux colloïdaux de nombre d'agrégation contrôlé. En effet, il a été récemment montré dans l'eau salée (i.e. [NaCl] = 0,1 M) des cristaux colloïdaux par complexation électrostatique entre des chaînes d'acide hyaluronique (i.e. polyanion) et des nanoparticules d'or recouvertes d'une couche auto-assemblée de ligands thiolés. Cette approche serait une alternative aux méthodes actuelles qui nécessitent souvent l'usage de différents solvants.

D'un point de vue applicatif, il serait intéressant de reconsidérer les applications biomédicales nécessitant une internalisation cellulaire en utilisant des assemblages stabilisés avec des chaînes polyanioniques. En effet, ces assemblages sont plus stables en milieu de culture et moins cytotoxiques. Le fait de pouvoir contrôler le nombre d'agrégation pourrait permettre de maximiser le chauffage par unité de matière ce qui peut permettre de réduire les doses à injecter. Dans le même temps, il serait nécessaire d'étudier les processus de biotransformations pour des agrégats de structure fractale préformés afin de conclure sur l'effet réel du nombre d'agrégation *in situ*. Il serait aussi nécessaire de comparer les performances en photothermie avec celles obtenues avec des structures fractales formées dans les cellules suite à l'internalisation de particules initialement non agrégées dans le milieu de culture. Sur ce point, on s'attend à obtenir une distance inter-particules plus importante pour ce dernier cas en raison de l'enveloppe de protéine qui devrait recouvrir les particules avant leur assemblage.

Par comparaison, l'utilisation des agrégats comme substrat pour la détection SERS dans le milieu biomédical est *a priori* plus prometteuse compte tenu de la simplicité de l'approche, de son faible coût et des premiers résultats obtenus pendant la thèse. Comme évoqué précédemment, un premier travail consistera à étudier l'effet des conditions physicochimiques au moment du couplage sur la structure finale des agrégats afin de minimiser l'influence de ce paramètre sur l'intensité des signaux. Il est probable que l'usage d'un simple milieu tampon avec une osmolarité suffisante puisse permettre de minimiser la variabilité des structures et des signaux dans des milieux différents. Dans un second temps, nous pourrions envisager des mesures dans des milieux plus complexes tels que l'urine ou le sang. Dans la suite de la collaboration établie pendant la thèse, on s'intéresserait à la détection d'un anticancéreux, tel que le 5-fluorouracile, dont le dosage en milieu hospitalier par des pharmaciens, est un enjeu en raison de sa toxicité élevée. Le fait de pouvoir changer la nature et le signe de la charge des chaînes polyélectrolytes stabilisants pourrait permettre de

modifier le pouvoir complexant des agrégats afin de détecter différents types d'espèces présentes dans un même milieu complexe. En dernier lieu, si cela était nécessaire, nous pourrions aussi envisager la fonctionnalisation des chaînes polyélectrolytes avec des groupements susceptibles de complexer spécifiquement une espèce cible.

Dans la deuxième partie, nous avons considéré une voie d'assemblage consistant à assembler des particules d'or par complexation avec des chaînes copolymères à bloc, de type « peigne », présentant un long squelette non ionique polaire et des greffons polyélectrolytes. Cette approche est plus exploratoire que la précédente car le comportement de ce type de copolymère n'a jamais été étudié expérimentalement dans l'eau en régime dilué. Ainsi, notre projet sur cette partie était initialement basé sur des travaux théoriques montrant les différentes conformations adoptées par la chaîne en fonction des grandeurs la caractérisant (i.e. densité de greffage, tailles respectives des différents blocs, conditions d'écrantage). Pendant la thèse, nous avons identifié dans la littérature différentes voies pour la synthèse de matériaux macroscopiques à base de copolymères comprenant un squelette poly(vinylalcool) (PVA) et des greffons polyélectrolytes. La première voie, dite de chimie « click », consistait à greffer des chaînes de poly(L-lysine hydrobromide) alkyne (PLL) sur un squelette de PVA préalablement tosylé et azidé. Cette première approche n'a pas permis de montrer qu'une limitation provenait de la première étape de tosylation dont le rendement s'est avéré très faible. Ce résultat combiné au coût important des greffons PLL nous ont amené à considérer une seconde voie de greffage par estérification. Dans ce cas, nous avons considéré le greffage de chaînes de poly(styrène sulfonate) (PSS) fonctionnalisées par un acide carboxylique en bout de chaîne sur un squelette de PVA. Là encore, les taux de fonctionnalisation déterminés par RMN DOSY se sont révélés très faibles pour les différentes conditions explorées. Ce résultat s'explique en partie par la difficulté de solubiliser le PVA dans les solvants plus compatibles avec la réaction d'estérification. Bien que les résultats n'aient pas été à la hauteur de nos attentes, nous avons acquis un certain savoir-faire dans le domaine de la synthèse de ce type de copolymère et de leur caractérisation. Compte tenu de cette base et du potentiel de ce type de macromolécules encore peu étudiées, nous pensons qu'il serait pertinent de poursuivre les travaux de synthèse amorcés en substituant le PVA par une molécule permettant un greffage direct par chimie « click » et/ou soluble dans un solvant plus propice à l'estérification tel que le dichlorométhane. Dans ce contexte, nous avons commencé à nous intéresser au poly(imidazole).

Bibliographie :

(1) Catellin, S. Nanomonde, entre science et fiction : quelles visions du futur ? http://revel.unice.fr/alliage/index.html?id=3434.

(2) Barnes, W. L.; Dereux, A.; Ebbesen, T. W. Surface Plasmon Subwavelength Optics. *Nature* **2003**, *424* (6950), 824–830. https://doi.org/10.1038/nature01937.

(3) Adleman, J. R.; Boyd, D. A.; Goodwin, D. G.; Psaltis, D. Heterogenous Catalysis Mediated by Plasmon Heating. *Nano Lett.* **2009**, *9* (12), 4417–4423. https://doi.org/10.1021/nl902711n.

(4) Baffou, G.; Cichos, F.; Quidant, R. Applications and Challenges of Thermoplasmonics. *Nat. Mater.* **2020**, *19* (9), 946–958. https://doi.org/10.1038/s41563-020-0740-6.

(5) Halas, N. J.; Lal, S.; Chang, W.-S.; Link, S.; Nordlander, P. Plasmons in Strongly Coupled Metallic Nanostructures. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (6), 3913–3961. https://doi.org/10.1021/cr200061k.

(6) Lal, S.; Link, S.; Halas, N. J. Nano-Optics from Sensing to Waveguiding. *Nature Photon* **2007**, *1* (11), 641–648. https://doi.org/10.1038/nphoton.2007.223.

(7) Lin, S.; Li, M.; Dujardin, E.; Girard, C.; Mann, S. One-Dimensional Plasmon Coupling by Facile Self-Assembly of Gold Nanoparticles into Branched Chain Networks. *Adv. Mater.* **2005**, *17* (21), 2553–2559. https://doi.org/10.1002/adma.200500828.

(8) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puntes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11098–11105. https://doi.org/10.1021/la201938u.

(9) Bond, G. C.; Louis, C.; Thompson, D. T. *Catalysis by Gold*; Catalytic science series; Imperial college Press: London, 2006.

(10) Pyykk, P. Relativity, Gold, Closed-Shell Interactions, and CsAu·NH3. 6.

(11) Pyykkö, P. Theoretical Chemistry of Gold. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (34), 4412–4456. https://doi.org/10.1002/anie.200300624.

(12) Greenwood, N. N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the Elements*, 2. ed., repr.; Elsevier-Butterworth-Heinemann: Amsterdam, 2010.

(13) Mohr, C.; Claus, P. Hydrogenation Properties of Supported Nanosized Gold Particles. *Science Progress* **2001**, *84* (4), 311–334. https://doi.org/10.3184/003685001783238925.

(14) LADEPECHE. Un Promeneur Découvre La plus Grosse Pépite d'or En France Depuis 120 Ans. November 15, 2007.

(15) Barber, D. J.; Freestone, I. C. AN INVESTIGATION OF THE ORIGIN OF THE COLOUR OF THE LYCURGUS CUP BY ANALYTICAL TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY. *Archaeometry* **1990**, *32* (1), 33–45. https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x.

(16) Verità, M.; Santopadre, P. Analysis of Gold-Colored Ruby Glass Tesserae in Roman Church Mosaics of the Fourth to 12th Centuries. *Journal of Glass Studies* **2010**, *5*, 11–24.

(17) British Museum. Coupe de Lycrugus https://www.britishmuseum.org/collection/object/H_1958-1202-1.

(18) Hunt, L. B. The True Story of Purple of Cassius: The Birth of Gold-Based Glass and Enamel Colours. *Gold Bull* **1976**, *9* (4), 134–139. https://doi.org/10.1007/BF03215423.

(19) Weyl, W. A. *Coloured Glasses*; Society of Glass Technology: Sheffield, 2016.

(20) Baccarat. Collection Baccarat https://www.baccarat.fr/.

(21) Faraday, M. X. The Bakerian Lecture. —Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Phil. Trans. R. Soc.* **1857**, *147*, 145–181. https://doi.org/10.1098/rstl.1857.0011.

(22) Park, J.; Joo, J.; Kwon, S. G.; Jang, Y.; Hyeon, T. Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (25), 4630–4660. https://doi.org/10.1002/anie.200603148.

(23) LaMer, V. K.; Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72* (11), 4847–4854. https://doi.org/10.1021/ja01167a001.

(24) Jana, N. R.; Peng, X. Single-Phase and Gram-Scale Routes toward Nearly Monodisperse Au and Other Noble Metal Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (47), 14280–14281. https://doi.org/10.1021/ja038219b.
(25) Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C. Synthesis and Reactions of Functionalised Gold Nanoparticles. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, No. 16, 1655. https://doi.org/10.1039/c39950001655.
(26) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seeding Growth for Size Control of 5−40 Nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2001**, *17* (22), 6782–6786. https://doi.org/10.1021/la0104323.
(27) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55. https://doi.org/10.1039/df9511100055.
(28) Langille, M. R.; Personick, M. L.; Mirkin, C. A. Plasmon-Mediated Syntheses of Metallic Nanostructures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (52), 13910–13940. https://doi.org/10.1002/anie.201301875.
(29) Drude, P. Zur Elektronentheorie der Metalle. *Ann. Phys.* **1900**, *306* (3), 566–613. https://doi.org/10.1002/andp.19003060312.
(30) Noguez, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (10), 3806–3819. https://doi.org/10.1021/jp066539m.
(31) Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, *330* (3), 377–445. https://doi.org/10.1002/andp.19083300302.
(32) Lassiter, J. B.; Aizpurua, J.; Hernandez, L. I.; Brandl, D. W.; Romero, I.; Lal, S.; Hafner, J. H.; Nordlander, P.; Halas, N. J. Close Encounters between Two Nanoshells. *Nano Lett.* **2008**, *8* (4), 1212–1218. https://doi.org/10.1021/nl080271o.
(33) Bruggeman, D. A. G. Berechnung verschiedener physikalischer Konstanten von heterogenen Substanzen. I. Dielektrizitätskonstanten und Leitfähigkeiten der Mischkörper aus isotropen Substanzen. *Ann. Phys.* **1935**, *416* (7), 636–664. https://doi.org/10.1002/andp.19354160705.
(34) Garnett, J. C. M.; Larmor, J. Colours in Metal Glasses and in Metallic Films. *Proc. R. Soc. Lond.* **1904**, *73* (488–496), 443–445. https://doi.org/10.1098/rspl.1904.0058.
(35) Khlebtsov, B.; Zharov, V.; Melnikov, A.; Tuchin, V.; Khlebtsov, N. Optical Amplification of Photothermal Therapy with Gold Nanoparticles and Nanoclusters. *Nanotechnology* **2006**, *17* (20), 5167–5179. https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/20/022.
(36) Citrin, D. S. Plasmon Polaritons in Finite-Length Metal−Nanoparticle Chains: The Role of Chain Length Unravelled. *Nano Lett.* **2005**, *5* (5), 5.
(37) Barrow, S. J.; Funston, A. M.; Gómez, D. E.; Davis, T. J.; Mulvaney, P. Surface Plasmon Resonances in Strongly Coupled Gold Nanosphere Chains from Monomer to Hexamer. *Nano Lett.* **2011**, *11* (10), 4180–4187. https://doi.org/10.1021/nl202080a.
(38) Willingham, B.; Link, S. Energy Transport in Metal Nanoparticle Chains via Sub-Radiant Plasmon Modes. *Opt. Express* **2011**, *19* (7), 6450. https://doi.org/10.1364/OE.19.006450.
(39) Baffou, G.; Quidant, R. Nanoplasmonics for Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (11), 3898. https://doi.org/10.1039/c3cs60364d.
(40) Buriuli, M.; Verma, D. Polyelectrolyte Complexes (PECs) for Biomedical Applications. In *Advances in Biomaterials for Biomedical Applications*; Tripathi, A., Melo, J. S., Eds.; Springer Singapore: Singapore, 2017; Vol. 66, pp 45–93. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3328-5_2.
(41) Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-Based Hydrogels for Controlled, Localized Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (1), 83–99. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019.
(42) Shi, H.; Liu, C.; Jiang, Q.; Xu, J. Effective Approaches to Improve the Electrical Conductivity of PEDOT:PSS: A Review. *Adv. Electron. Mater.* **2015**, *1* (4), 1500017. https://doi.org/10.1002/aelm.201500017.
(43) Odijk, T. Polyelectrolytes near the Rod Limit. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* **1977**, *15* (3), 477–483. https://doi.org/10.1002/pol.1977.180150307.

(44) Skolnick, J.; Fixman, M. Electrostatic Persistence Length of a Wormlike Polyelectrolyte. *Macromolecules* **1977**, *10* (5), 944–948. https://doi.org/10.1021/ma60059a011.
(45) Barrat, J.-L.; Joanny, F. Theory of Polyelectrolyte Solutions. In *Advances in Chemical Physics*; Prigogine, I., Rice, S. A., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2007; pp 1–66. https://doi.org/10.1002/9780470141533.ch1.
(46) Manning, G. S. Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties. *The Journal of Chemical Physics* **1969**, *51* (3), 924–933. https://doi.org/10.1063/1.1672157.
(47) Schatz, C. Cours d'auto-Assemblage En Solution. 2018.
(48) De Gennes, P. G.; Pincus, P.; Velasco, R. M.; Brochard, F. Remarks on Polyelectrolyte Conformation. *J. Phys. France* **1976**, *37* (12), 1461–1473. https://doi.org/10.1051/jphys:0197600370120146100.
(49) Kiriy, A.; Gorodyska, G.; Minko, S.; Jaeger, W.; Štěpánek, P.; Stamm, M. Cascade of Coil-Globule Conformational Transitions of Single Flexible Polyelectrolyte Molecules in Poor Solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (45), 13454–13462. https://doi.org/10.1021/ja0261168.
(50) Chodanowski, P.; Stoll, S. Polyelectrolyte Adsorption on Charged Particles in the Debye−Hückel Approximation. A Monte Carlo Approach. *Macromolecules* **2001**, *34* (7), 2320–2328. https://doi.org/10.1021/ma000482z.
(51) Fixman, M. The Flexibility of Polyelectrolyte Moleculesa). **1982**, *76* (12), 8.
(52) Barrat, J.-L.; Joanny, J.-F. Persistence Length of Polyelectrolyte Chains. *Europhys. Lett.* **1993**, *24* (5), 333–338. https://doi.org/10.1209/0295-5075/24/5/003.
(53) Buhler, E.; Boué, F. Persistence Length for a Model Semirigid Polyelectrolyte as Seen by Small Angle Neutron Scattering: A Relevant Variation of the Lower Bound with Ionic Strength. *Eur. Phys. J. E* **2003**, *10* (2), 89–92. https://doi.org/10.1140/epje/e2003-00012-3.
(54) Cheng, W.; Campolongo, M. J.; Cha, J. J.; Tan, S. J.; Umbach, C. C.; Muller, D. A.; Luo, D. Free-Standing Nanoparticle Superlattice Sheets Controlled by DNA. *Nature Mater* **2009**, *8* (6), 519–525. https://doi.org/10.1038/nmat2440.
(55) Dujardin, E.; Peet, C.; Stubbs, G.; Culver, J. N.; Mann, S. Organization of Metallic Nanoparticles Using Tobacco Mosaic Virus Templates. *Nano Lett.* **2003**, *3* (3), 413–417. https://doi.org/10.1021/nl034004o.
(56) Do, S.-P.; Missaoui, A.; Coati, A.; Coursault, D.; Jeridi, H.; Resta, A.; Goubet, N.; Wojcik, M. M.; Choux, A.; Royer, S.; Briand, E.; Donnio, B.; Gallani, J. L.; Pansu, B.; Lhuillier, E.; Garreau, Y.; Babonneau, D.; Goldmann, M.; Constantin, D.; Gallas, B.; Croset, B.; Lacaze, E. From Chains to Monolayers: Nanoparticle Assembly Driven by Smectic Topological Defects. *Nano Lett.* **2020**, *20* (3), 1598–1606. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b04347.
(57) Bragg, W. L.; Nye, J. F. A Dynamical Model of a Crystal Structure. *Proc. R. Soc. Lond. A* **1947**, *190* (1023), 474–481. https://doi.org/10.1098/rspa.1947.0089.
(58) Technology network. DNA vs. RNA – 5 Key Differences and Comparison https://www.technologynetworks.com/genomics/lists/what-are-the-key-differences-between-dna-and-rna-296719.
(59) Sharma, J.; Chhabra, R.; Yan, H.; Liu, Y. PH-Driven Conformational Switch of "i-Motif" DNA for the Reversible Assembly of Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2007**, No. 5, 477–479. https://doi.org/10.1039/B612707J.
(60) Aldaye, F. A.; Sleiman, H. F. Dynamic DNA Templates for Discrete Gold Nanoparticle Assemblies: Control of Geometry, Modularity, Write/Erase and Structural Switching. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (14), 4130–4131. https://doi.org/10.1021/ja070017i.
(61) Tian, Y.; Zhang, Y.; Wang, T.; Xin, H. L.; Li, H.; Gang, O. Lattice Engineering through Nanoparticle–DNA Frameworks. *Nature Mater* **2016**, *15* (6), 654–661. https://doi.org/10.1038/nmat4571.
(62) Cando. Structure origami ADN https://cando-dna-origami.org/.

(63) Sardar, R.; Shumaker-Parry, J. S. Asymmetrically Functionalized Gold Nanoparticles Organized in One-Dimensional Chains. *Nano Lett.* **2008**, *8* (2), 731–736. https://doi.org/10.1021/nl073154m.
(64) Tanjeem, N.; Chomette, C.; Schade, N. B.; Ravaine, S.; Duguet, E.; Tréguer-Delapierre, M.; Manoharan, V. N. Polyhedral Plasmonic Nanoclusters through Multi-Step Colloidal Chemistry. *Mater. Horiz.* **2021**, *8* (2), 565–570. https://doi.org/10.1039/D0MH01311K.
(65) Li, W.; Liu, B.; Hubert, C.; Perro, A.; Duguet, E.; Ravaine, S. Self-Assembly of Colloidal Polymers from Two-Patch Silica Nanoparticles. *Nano Res.* **2020**, *13* (12), 3371–3376. https://doi.org/10.1007/s12274-020-3024-1.
(66) Cabane, B.; Li, J.; Artzner, F.; Botet, R.; Labbez, C.; Bareigts, G.; Sztucki, M.; Goehring, L. Hiding in Plain View: Colloidal Self-Assembly from Polydisperse Populations. *Phys. Rev. Lett.* **2016**, *116* (20), 208001. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.116.208001.
(67) Damasceno, P. F.; Engel, M.; Glotzer, S. C. Predictive Self-Assembly of Polyhedra into Complex Structures. *Science* **2012**, *337* (6093), 453–457. https://doi.org/10.1126/science.1220869.
(68) Boles, M. A.; Engel, M.; Talapin, D. V. Self-Assembly of Colloidal Nanocrystals: From Intricate Structures to Functional Materials. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (18), 11220–11289. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00196.
(69) Bowden, N. B.; Weck, M.; Choi, I. S.; Whitesides, G. M. Molecule-Mimetic Chemistry and Mesoscale Self-Assembly. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34* (3), 231–238. https://doi.org/10.1021/ar0000760.
(70) Hajiw, S.; Pansu, B.; Sadoc, J.-F. Evidence for a C14 Frank–Kasper Phase in One-Size Gold Nanoparticle Superlattices. *ACS Nano* **2015**, *9* (8), 8116–8121. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b02216.
(71) Frank, F. C.; Kasper, J. S. Complex Alloy Structures Regarded as Sphere Packings. I. Definitions and Basic Principles. *Acta Cryst* **1958**, *11* (3), 184–190. https://doi.org/10.1107/S0365110X58000487.
(72) Han, X.; Goebl, J.; Lu, Z.; Yin, Y. Role of Salt in the Spontaneous Assembly of Charged Gold Nanoparticles in Ethanol. *Langmuir* **2011**, *27* (9), 5282–5289. https://doi.org/10.1021/la200459t.
(73) Ahniyaz, A.; Sakamoto, Y.; Bergstrom, L. Magnetic Field-Induced Assembly of Oriented Superlattices from Maghemite Nanocubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (45), 17570–17574. https://doi.org/10.1073/pnas.0704210104.
(74) Hermanson, K. D.; Lumsdon, S. O.; Williams, J. P.; Kaler, E. W.; Velev, O. D. Microwires from Nanoparticle Suspensions. **2001**, *294*, 6.
(75) Gangwal, S.; Cayre, O. J.; Velev, O. D. Dielectrophoretic Assembly of Metallodielectric Janus Particles in AC Electric Fields. *Langmuir* **2008**, *24* (23), 13312–13320. https://doi.org/10.1021/la8015222.
(76) Smoukov, S. K.; Gangwal, S.; Marquez, M.; Velev, O. D. Reconfigurable Responsive Structures Assembled from Magnetic Janus Particles. *Soft Matter* **2009**, *5* (6), 1285. https://doi.org/10.1039/b814304h.
(77) Grzelczak, M.; Vermant, J.; Furst, E. M.; Liz-Marzán, L. M. Directed Self-Assembly of Nanoparticles. *ACS Nano* **2010**, *4* (7), 3591–3605. https://doi.org/10.1021/nn100869j.
(78) Thorkelsson, K.; Bai, P.; Xu, T. Self-Assembly and Applications of Anisotropic Nanomaterials: A Review. *Nano Today* **2015**, *10* (1), 48–66. https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.12.005.
(79) Thoma, F.; Koller, T.; Klug, A. Involvement of Histone H1 in the Organization of the Nucleosome and of the Salt-Dependent Superstructures of Chromatin. *Journal of Cell Biology* **1979**, *83* (2), 403–427. https://doi.org/10.1083/jcb.83.2.403.
(80) Mohd-Sarip, A. MOLECULAR BIOLOGY: A Higher Order of Silence. *Science* **2004**, *306* (5701), 1484–1485. https://doi.org/10.1126/science.1106767.
(81) Thakur, V. K.; Voicu, S. I. Recent Advances in Cellulose and Chitosan Based Membranes for Water Purification: A Concise Review. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *146*, 148–165. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.030.

(82) Al-Manhel, A. J.; Al-Hilphy, A. R. S.; Niamah, A. K. Extraction of Chitosan, Characterisation and Its Use for Water Purification. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* **2018**, *17* (2), 186–190. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.04.001.
(83) Huang, H.; Yang, X. Synthesis of Polysaccharide-Stabilized Gold and Silver Nanoparticles: A Green Method. *Carbohydrate Research* **2004**, *339* (15), 2627–2631. https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.08.005.
(84) Mulens-Arias, V.; Nicolás-Boluda, A.; Gehanno, A.; Balfourier, A.; Carn, F.; Gazeau, F. Polyethyleneimine-Assisted One-Pot Synthesis of Quasi-Fractal Plasmonic Gold Nanocomposites as a Photothermal Theranostic Agent. *Nanoscale* **2019**, *11* (7), 3344–3359. https://doi.org/10.1039/C8NR09849B.
(85) Pugh, T. L.; Heller, W. Coagulation and Stabilization of Colloidal Solutions with Polyelectrolytes. *J. Polym. Sci.* **1960**, *47* (149), 219–227. https://doi.org/10.1002/pol.1960.1204714919.
(86) Napper, D. H. *Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions*, 3. print.; Colloid science; Academic Press: London, 1989.
(87) Schneider, G.; Decher, G. Functional Core/Shell Nanoparticles via Layer-by-Layer Assembly. Investigation of the Experimental Parameters for Controlling Particle Aggregation and for Enhancing Dispersion Stability. *Langmuir* **2008**, *24* (5), 1778–1789. https://doi.org/10.1021/la7021837.
(88) Netz, R. R. Complexation between a Semiflexible Polyelectrolyte and an Oppositely Charged Sphere. **1999**, *32* (26), 15.
(89) Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. Complexation of a Polyelectrolyte with Oppositely Charged Spherical Macroions: Giant Inversion of Charge. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *114* (13), 5905–5916. https://doi.org/10.1063/1.1355289.
(90) Zinchenko, A. A.; Yoshikawa, K.; Baigl, D. Compaction of Single-Chain DNA by Histone-Inspired Nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95* (22), 228101. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.95.228101.
(91) Keren, K.; Soen, Y.; Yoseph, G. B.; Gilad, R.; Braun, E.; Sivan, U.; Talmon, Y. Microscopics of Complexation between Long DNA Molecules and Positively Charged Colloids. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89* (8), 088103. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.89.088103.
(92) Han, J.; Ohara, S.; Sato, K.; Xu, H.; Tan, Z.; Morisada, Y.; Kuruma, K.; Naito, M.; Shan, P.; Umetsu, M. Directed Assembly of Metal Oxide Nanoparticles by DNA. *Materials Letters* **2012**, *79*, 78–80. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.03.094.
(93) Shi, L.; Carn, F.; Boué, F.; Buhler, E. Role of the Ratio of Biopolyelectrolyte Persistence Length to Nanoparticle Size in the Structural Tuning of Electrostatic Complexes. *Phys. Rev. E* **2016**, *94* (3), 032504. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.94.032504.
(94) Balfourier, A.; Mulens-Arias, V.; Gazeau, F.; Carn, F. Rational Design of Fractal Gold Nanosphere Assemblies with Optimized Photothermal Conversion Using a Quantitative Structure Property Relationship (QSPR) Approach. *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124* (16), 8938–8948. https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c00384.
(95) Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (45), 13939–13948. https://doi.org/10.1021/ja074447k.
(96) Park, J.-W.; Shumaker-Parry, J. S. Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (5), 1907–1921. https://doi.org/10.1021/ja4097384.
(97) Shi, L. Structures de Complexes Électrostatiques Entre Un Polyélectrolyte de Rigidité Variable et Des Nanoparticules de Taille Contrôlée, Université Paris Diderot, 2013.
(98) Londoño, O. M.; Tancredi, P.; Rivas, P.; Muraca, D.; Socolovsky, L. M.; Knobel, M. Small-Angle X-Ray Scattering to Analyze the Morphological Properties of Nanoparticulated Systems. In *Handbook of Materials Characterization*; Sharma, S. K., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 37–75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_2.

(99) Danglade, C. Etude Par Diffusion de Lumière de Suspensions Colloïdales Concentrées Sous Contrainte. 143.
(100) Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Reprint ed.; Krieger: Malabar, Fla, 1990.
(101) Provencher, S. W. A Constrained Regularization Method for Inverting Data Represented by Linear Algebraic or Integral Equations. *Computer Physics Communications* **1982**, *27* (3), 213–227. https://doi.org/10.1016/0010-4655(82)90173-4.
(102) Provencher, S. W. CONTIN: A General Purpose Constrained Regularization Program for Inverting Noisy Linear Algebraic and Integral Equations. *Computer Physics Communications* **1982**, *27* (3), 229–242. https://doi.org/10.1016/0010-4655(82)90174-6.
(103) Koppel, D. E. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *The Journal of Chemical Physics* **1972**, *57* (11), 4814–4820. https://doi.org/10.1063/1.1678153.
(104) Einstein, A.; Fürth, R.; Cowper, A. D. *Investigations on the Theory of Brownian Movement*; Dover: New York, 1956.
(105) Einstein, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Phys.* **1905**, *322* (8), 549–560. https://doi.org/10.1002/andp.19053220806.
(106) Ohshima, H. Electrophoresis of Soft Particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, 47.
(107) *Nano-Surface Chemistry*; Rosoff, M., Ed.; Dekker: New York, 2002.
(108) Lizana, L.; Grosberg, A. Y. Exact Expressions for the Mobility and Electrophoretic Mobility of a Weakly Charged Sphere in a Simple Electrolyte. *EPL* **2013**, *104* (6), 68004. https://doi.org/10.1209/0295-5075/104/68004.
(109) MalvernPanalytical. Nanoparticles Tracking Analysis https://www.malvernpanalytical.com/fr/products/technology/light-scattering/nanoparticle-tracking-analysis.
(110) Schéma spectro UV-Vis http://dalmeyda.chez.com/cours/spectro/UV-spectro.htm.
(111) Ruihua, H.; Bingchao, Y.; Zheng, D.; Wang, B. Preparation and Characterization of a Quaternized Chitosan. *J Mater Sci* **2012**, *47* (2), 845–851. https://doi.org/10.1007/s10853-011-5862-4.
(112) Cho, J.; Grant, J.; Piquette-Miller, M.; Allen, C. Synthesis and Physicochemical and Dynamic Mechanical Properties of a Water-Soluble Chitosan Derivative as a Biomaterial. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (10), 2845–2855. https://doi.org/10.1021/bm060436s.
(113) Sun, X.; Dong, S.; Wang, E. One-Step Synthesis and Characterization of Polyelectrolyte-Protected Gold Nanoparticles through a Thermal Process. *Polymer* **2004**, *45* (7), 2181–2184. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.01.010.
(114) Shan, C.; Li, F.; Yuan, F.; Yang, G.; Niu, L.; Zhang, Q. Size-Controlled Synthesis of Monodispersed Gold Nanoparticles Stabilized by Polyelectrolyte-Functionalized Ionic Liquid. *Nanotechnology* **2008**, *19* (28), 285601. https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/28/285601.
(115) Spalla, O.; Cabane, B. Growth of Colloidal Aggregates through Polymer Bridging. *Colloid Polym Sci* **1993**, *271* (4), 357–371. https://doi.org/10.1007/BF00657417.
(116) Spalla, O. Nanoparticle Interactions with Polymers and Polyelectrolytes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2002**, *7* (3–4), 179–185. https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00045-6.
(117) Chapel, J.-P.; Berret, J.-F. Versatile Electrostatic Assembly of Nanoparticles and Polyelectrolytes: Coating, Clustering and Layer-by-Layer Processes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2012**, *17* (2), 97–105. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.08.009.
(118) Ulrich, S.; Laguecir, A.; Stoll, S. Complexation of a Weak Polyelectrolyte with a Charged Nanoparticle. Solution Properties and Polyelectrolyte Stiffness Influences. *Macromolecules* **2005**, *38* (21), 8939–8949. https://doi.org/10.1021/ma051142m.

(119) Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. Complexation of DNA with Positive Spheres: Phase Diagram of Charge Inversion and Reentrant Condensation. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *115* (15), 7298–7308. https://doi.org/10.1063/1.1402988.
(120) Shi, L.; Carn, F.; Boué, F.; Mosser, G.; Buhler, E. Nanorods of Well-Defined Length and Monodisperse Cross-Section Obtained from Electrostatic Complexation of Nanoparticles with a Semiflexible Biopolymer. *ACS Macro Lett.* **2012**, *1* (7), 857–861. https://doi.org/10.1021/mz300200y.
(121) Shi, L.; Carn, F.; Boué, F.; Mosser, G.; Buhler, E. Control over the Electrostatic Self-Assembly of Nanoparticle Semiflexible Biopolyelectrolyte Complexes. *Soft Matter* **2013**, *9* (20), 5004. https://doi.org/10.1039/c3sm27138b.
(122) Shi, L.; Buhler, E.; Boué, F.; Carn, F. Shape-Tailored Colloidal Molecules Obtained by Self-Assembly of Model Gold Nanoparticles with Flexible Polyelectrolyte. *Langmuir* **2015**, *31* (21), 5731–5737. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00854.
(123) Lin, M. Y.; Klein, R.; Lindsay, H. M.; Weitz, D. A.; Ball, R. C.; Meakin, P. The Structure of Fractal Colloidal Aggregates of Finite Extent. *Journal of Colloid and Interface Science* **1990**, *137* (1), 263–280. https://doi.org/10.1016/0021-9797(90)90061-R.
(124) Jonsson, M.; Linse, P. Polyelectrolyte–Macroion Complexation. II. Effect of Chain Flexibility. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *115* (23), 10975–10985. https://doi.org/10.1063/1.1417508.
(125) Shi, L.; Carn, F.; Goukassov, A.; Buhler, E.; Boué, F. Self-Induced Crystallization in Charged Gold Nanoparticle-Semiflexible Biopolyelectrolyte Complexes. *Langmuir* **2020**, *36* (27), 7925–7932. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01064.
(126) Novotny, L.; Hecht, B. *Principles of Nano-Optics*, 1. paperback ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2011.
(127) Murthy, V. S.; Cha, J. N.; Stucky, G. D.; Wong, M. S. Charge-Driven Flocculation of Poly(L -Lysine)Gold Nanoparticle Assemblies Leading to Hollow Microspheres. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (16), 5292–5299. https://doi.org/10.1021/ja038953v.
(128) Murthy, V. S.; Kadali, S. B.; Wong, M. S. Polyamine-Guided Synthesis of Anisotropic, Multicompartment Microparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1* (3), 590–596. https://doi.org/10.1021/am8001499.
(129) Yu, J.; Javier, D.; Yaseen, M. A.; Nitin, N.; Richards-Kortum, R.; Anvari, B.; Wong, M. S. Self-Assembly Synthesis, Tumor Cell Targeting, and Photothermal Capabilities of Antibody-Coated Indocyanine Green Nanocapsules. 10.
(130) Rana, R. K.; Murthy, V. S.; Yu, J.; Wong, M. S. Nanoparticle Self-Assembly of Hierarchically Ordered Microcapsule Structures. *Adv. Mater.* **2005**, *17* (9), 1145–1150. https://doi.org/10.1002/adma.200401612.
(131) Plush, S. E.; Woods, M.; Zhou, Y.-F.; Kadali, S. B.; Wong, M. S.; Sherry, A. D. Nanoassembled Capsules as Delivery Vehicles for Large Payloads of High Relaxivity Gd^{3+} Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (43), 15918–15923. https://doi.org/10.1021/ja906981w.
(132) Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Progress in Polymer Science* **2006**, *31* (7), 603–632. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
(133) Weltrowski, M.; Martel, B. Chitosan N-benzyl Sulfonate Derivatives as Sorbents for Removal of Metal Ions in an Acidic Medium. 8.
(134) Peniche-Covas, C.; Alvarez, L. W.; Argüelles-Monal, W. The Adsorption of Mercuric Ions by Chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, *46* (7), 1147–1150. https://doi.org/10.1002/app.1992.070460703.
(135) Liu, W. G.; Zhang, X.; Sun, S. J.; Sun, G. J.; Yao, K. D.; Liang, D. C.; Guo, G.; Zhang, J. Y. N-Alkylated Chitosan as a Potential Nonviral Vector for Gene Transfection. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (4), 782–789. https://doi.org/10.1021/bc020051g.
(136) Yi, H.; Wu, L.-Q.; Bentley, W. E.; Ghodssi, R.; Rubloff, G. W.; Culver, J. N.; Payne, G. F. Biofabrication with Chitosan. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (6), 2881–2894. https://doi.org/10.1021/bm050410l.

(137) Kumar, M. N. V. R.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (12), 6017–6084. https://doi.org/10.1021/cr030441b.
(138) Aiba, S.; Minoura, N.; Fujiwara, Y. Graft Copolymerization of Amino Acids onto Partially Deacetylated Chitin. *International Journal of Biological Macromolecules* **1985**, *7* (2), 120–121. https://doi.org/10.1016/0141-8130(85)90042-X.
(139) Eli, W.; Chen, W.; Xue, Q. The Association of Anionic Surfactants with β -Cyclodextrin. An Isothermal Titration Calorimeter Study. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **1999**, *31* (10), 1283–1296. https://doi.org/10.1006/jcht.1999.0539.
(140) Heras, A. N-Methylene Phosphonic Chitosan: A Novel Soluble Derivative. *Carbohydrate Polymers* **2001**, *44* (1), 1–8. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00195-8.
(141) Holme, K. R.; Perlin, A. S. Chitosan N-Sulfate. A Water-Soluble Polyelectrolyte. *Carbohydrate Research* **1997**, *302* (1–2), 7–12. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00117-1.
(142) Shariatinia, Z. Carboxymethyl Chitosan: Properties and Biomedical Applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *120*, 1406–1419. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.131.
(143) Andreica, B.-I.; Cheng, X.; Marin, L. Quaternary Ammonium Salts of Chitosan. A Critical Overview on the Synthesis and Properties Generated by Quaternization. *European Polymer Journal* **2020**, *139*, 110016. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110016.
(144) Wolfrom, M. L.; Vercellotti, J. R.; Horton, D. Methylation Studies on Carboxyl-Reduced Heparin. 2-Amino-2-Deoxy-3,6-Di-O-Methyl-α-D-Glucopyranose from the Methylation of Chitosan [1]. *J. Org. Chem.* **1964**, *29* (3), 547–550. https://doi.org/10.1021/jo01026a006.
(145) Muzzarelli, R. A. A.; Tanfani, F. The N-Permethylation of Chitosan and the Preparation of N-Trimethyi Chitosan Iodide. 11.
(146) Jia, Z.; shen, D.; Xu, W. Synthesis and Antibacterial Activities of Quaternary Ammonium Salt of Chitosan. *Carbohydrate Research* **2001**, *333* (1), 1–6. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00112-4.
(147) Verheul, R. J.; Amidi, M.; van der Wal, S.; van Riet, E.; Jiskoot, W.; Hennink, W. E. Synthesis, Characterization and in Vitro Biological Properties of O-Methyl Free N,N,N-Trimethylated Chitosan. *Biomaterials* **2008**, *29* (27), 3642–3649. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.026.
(148) Kim, C. H.; Choi, J. W.; Chun, H. J.; Choi, K. S. Synthesis of Chitosan Derivatives with Quaternary Ammonium Salt and Their Antibacterial Activity. *Polymer Bulletin* **1997**, *38* (4), 387–393. https://doi.org/10.1007/s002890050064.
(149) SASmSSIcsIc, Micheleourevitch. 13C- AND LH-NMR SPECTROSCOPY. 7.
(150) Domard, A.; Rinaudo, M.; Terrassin, C. New Method for the Quaternization of Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* **1986**, *8* (2), 105–107. https://doi.org/10.1016/0141-8130(86)90007-3.
(151) Luan, F.; Wei, L.; Zhang, J.; Tan, W.; Chen, Y.; Dong, F.; Li, Q.; Guo, Z. Preparation and Characterization of Quaternized Chitosan Derivatives and Assessment of Their Antioxidant Activity. *Molecules* **2018**, *23* (3), 516. https://doi.org/10.3390/molecules23030516.
(152) Wan, A.; Xu, Q.; Sun, Y.; Li, H. Antioxidant Activity of High Molecular Weight Chitosan and N,O-Quaternized Chitosans. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (28), 6921–6928. https://doi.org/10.1021/jf402242e.
(153) Lim, S.-H.; Hudson, S. M. Synthesis and Antimicrobial Activity of a Water-Soluble Chitosan Derivative with a Fiber-Reactive Group. *Carbohydrate Research* **2004**, *339* (2), 313–319. https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.024.
(154) Wang, Y.; Coombs, N.; Turak, A.; Lu, Z.-H.; Manners, I.; Winnik, M. A. Interfacial Staining of a Phase-Separated Block Copolymer with Ruthenium Tetroxide. *Macromolecules* **2007**, *40* (5), 1594–1597. https://doi.org/10.1021/ma061914u.

(155) Tkachenko, V.; Vidal, L.; Josien, L.; Schmutz, M.; Poly, J.; Chemtob, A. Characterizing the Core-Shell Architecture of Block Copolymer Nanoparticles with Electron Microscopy: A Multi-Technique Approach. *Polymers* **2020**, *12* (8), 1656. https://doi.org/10.3390/polym12081656.
(156) Patterson, J. P.; Sanchez, A. M.; Petzetakis, N.; Smart, T. P.; Epps, III, T. H.; Portman, I.; Wilson, N. R.; O'Reilly, R. K. A Simple Approach to Characterizing Block Copolymer Assemblies: Graphene Oxide Supports for High Contrast Multi-Technique Imaging. *Soft Matter* **2012**, *8* (12), 3322. https://doi.org/10.1039/c2sm07040e.
(157) Shefelbine, T. A.; Vigild, M. E.; Matsen, M. W.; Hajduk, D. A.; Hillmyer, M. A.; Cussler, E. L.; Bates, F. S. Core−Shell Gyroid Morphology in a Poly(Isoprene- *Block* -Styrene- *Block* -Dimethylsiloxane) Triblock Copolymer. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (37), 8457–8465. https://doi.org/10.1021/ja991442h.
(158) Gundanna, S. K.; Mitra, A.; Bhatta, L. K. G.; Bhatta, U. M. Temperature-Dependent Interfacial Behaviour of Au@SiO2 Core Shell Nanoparticles on Si3N4 Support Film. *Solid State Sciences* **2020**, *109*, 106401. https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2020.106401.
(159) Yoshida, J.; Kim, H.; Nagaki, A. "Impossible" Chemistries Based on Flow and Micro. *Journal of Flow Chemistry* **2017**, *7* (3–4), 60–64. https://doi.org/10.1556/1846.2017.00017.
(160) Tseng, R. J.; Tsai, C.; Ma, L.; Ouyang, J.; Ozkan, C. S.; Yang, Y. Digital Memory Device Based on Tobacco Mosaic Virus Conjugated with Nanoparticles. *Nature Nanotech* **2006**, *1* (1), 72–77. https://doi.org/10.1038/nnano.2006.55.
(161) Abu-Reziq, R.; Wang, D.; Post, M.; Alper, H. Platinum Nanoparticles Supported on Ionic Liquid-Modified Magnetic Nanoparticles: Selective Hydrogenation Catalysts. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (13), 2145–2150. https://doi.org/10.1002/adsc.200700129.
(162) Liu, D.; Liu, L.; Liu, F.; Zhang, M.; Wei, P.; Yi, T. HOCl-Activated Aggregation of Gold Nanoparticles for Multimodality Therapy of Tumors. *Adv. Sci.* **2021**, 2100074. https://doi.org/10.1002/advs.202100074.
(163) Li Voti, R.; Leahu, G.; Sibilia, C.; Matassa, R.; Familiari, G.; Cerra, S.; Salamone, T. A.; Fratoddi, I. Photoacoustics for Listening to Metal Nanoparticle Super-Aggregates. *Nanoscale Adv.* **2021**, 10.1039.D1NA00333J. https://doi.org/10.1039/D1NA00333J.
(164) Sun, M.; Liu, F.; Zhu, Y.; Wang, W.; Hu, J.; Liu, J.; Dai, Z.; Wang, K.; Wei, Y.; Bai, J.; Gao, W. Salt-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles for Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy of Cancer. *Nanoscale* **2016**, *8* (8), 4452–4457. https://doi.org/10.1039/C6NR00056H.
(165) Kang, S.; Bhang, S. H.; Hwang, S.; Yoon, J.-K.; Song, J.; Jang, H.-K.; Kim, S.; Kim, B.-S. Mesenchymal Stem Cells Aggregate and Deliver Gold Nanoparticles to Tumors for Photothermal Therapy. *ACS Nano* **2015**, *9* (10), 9678–9690. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b02207.
(166) Li, H.; Liu, X.; Huang, N.; Ren, K.; Jin, Q.; Ji, J. "Mixed-Charge Self-Assembled Monolayers" as A Facile Method to Design PH-Induced Aggregation of Large Gold Nanoparticles for Near-Infrared Photothermal Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (21), 18930–18937. https://doi.org/10.1021/am504813f.
(167) Kwon, Y.; Choi, Y.; Jang, J.; Yoon, S.; Choi, J. NIR Laser-Responsive PNIPAM and Gold Nanorod Composites for the Engineering of Thermally Reactive Drug Delivery Nanomedicine. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (3), 204. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030204.
(168) Ghosh, S. K.; Pal, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 4797–4862. https://doi.org/10.1021/cr0680282.
(169) Espinosa, A.; Silva, A. K. A.; Sánchez-Iglesias, A.; Grzelczak, M.; Péchoux, C.; Desboeufs, K.; Liz-Marzán, L. M.; Wilhelm, C. Cancer Cell Internalization of Gold Nanostars Impacts Their Photothermal Efficiency In Vitro and In Vivo: Toward a Plasmonic Thermal Fingerprint in Tumoral Environment. *Adv. Healthcare Mater.* **2016**, *5* (9), 1040–1048. https://doi.org/10.1002/adhm.201501035.
(170) Cerón, M. R.; Izquierdo, M.; Alegret, N.; Valdez, J. A.; Rodríguez-Fortea, A.; Olmstead, M. M.; Balch, A. L.; Poblet, J. M.; Echegoyen, L. Reactivity Differences of $Sc_3N@C_{2n}$ (2n = 68 and 80).

Synthesis of the First Methanofullerene Derivatives of $Sc_3N@D_{5h}$-C_{80}. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (1), 64–67. https://doi.org/10.1039/C5CC07416A.
(171) Yin, D.; Li, X.; Ma, Y.; Liu, Z. Targeted Cancer Imaging and Photothermal Therapy via Monosaccharide-Imprinted Gold Nanorods. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (50), 6716–6719. https://doi.org/10.1039/C7CC02247F.
(172) Plan Sangnier, A.; Van de Walle, A.; Aufaure, R.; Fradet, M.; Motte, L.; Guénin, E.; Lalatonne, Y.; Wilhelm, C. Endosomal Confinement of Gold Nanospheres, Nanorods, and Nanoraspberries Governs Their Photothermal Identity and Is Beneficial for Cancer Cell Therapy. *Adv. Biosys.* **2020**, *4* (4), 1900284. https://doi.org/10.1002/adbi.201900284.
(173) Balfourier, A.; Luciani, N.; Wang, G.; Lelong, G.; Ersen, O.; Khelfa, A.; Alloyeau, D.; Gazeau, F.; Carn, F. Unexpected Intracellular Biodegradation and Recrystallization of Gold Nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* **2020**, *117* (1), 103–113. https://doi.org/10.1073/pnas.1911734116.
(174) Nanospectra. Aurolase therapy https://nanospectra.com/.
(175) Fernandez-Saiz, P.; Lagaron, J. M.; Ocio, M. J. Optimization of the Biocide Properties of Chitosan for Its Application in the Design of Active Films of Interest in the Food Area. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23* (3), 913–921. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.06.001.
(176) Mao, H.-Q.; Roy, K.; Troung-Le, V. L.; Janes, K. A.; Lin, K. Y.; Wang, Y.; August, J. T.; Leong, K. W. Chitosan-DNA Nanoparticles as Gene Carriers: Synthesis, Characterization and Transfection Efficiency. *Journal of Controlled Release* **2001**, *70* (3), 399–421. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00361-8.
(177) Wang, Y.; Corbitt, T. S.; Jett, S. D.; Tang, Y.; Schanze, K. S.; Chi, E. Y.; Whitten, D. G. Direct Visualization of Bactericidal Action of Cationic Conjugated Polyelectrolytes and Oligomers. *Langmuir* **2012**, *28* (1), 65–70. https://doi.org/10.1021/la2044569.
(178) Zubareva, A.; Shagdarova, B.; Varlamov, V.; Kashirina, E.; Svirshchevskaya, E. Penetration and Toxicity of Chitosan and Its Derivatives. *European Polymer Journal* **2017**, *93*, 743–749. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.021.
(179) Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (37), 13794–13803. https://doi.org/10.1021/jp0687908.
(180) Guo, Y.; Khaing Oo, M. K.; Reddy, K.; Fan, X. Ultrasensitive Optofluidic Surface-Enhanced Raman Scattering Detection with Flow-through Multihole Capillaries. *ACS Nano* **2012**, *6* (1), 381–388. https://doi.org/10.1021/nn203733t.
(181) Kong, K. V.; Lam, Z.; Lau, W. K. O.; Leong, W. K.; Olivo, M. A Transition Metal Carbonyl Probe for Use in a Highly Specific and Sensitive SERS-Based Assay for Glucose. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (48), 18028–18031. https://doi.org/10.1021/ja409230g.
(182) Li, M.; Cushing, S. K.; Zhang, J.; Suri, S.; Evans, R.; Petros, W. P.; Gibson, L. F.; Ma, D.; Liu, Y.; Wu, N. Three-Dimensional Hierarchical Plasmonic Nano-Architecture Enhanced Surface-Enhanced Raman Scattering Immunosensor for Cancer Biomarker Detection in Blood Plasma. *ACS Nano* **2013**, *7* (6), 4967–4976. https://doi.org/10.1021/nn4018284.
(183) Sun, F.; Ella-Menye, J.-R.; Galvan, D. D.; Bai, T.; Hung, H.-C.; Chou, Y.-N.; Zhang, P.; Jiang, S.; Yu, Q. Stealth Surface Modification of Surface-Enhanced Raman Scattering Substrates for Sensitive and Accurate Detection in Protein Solutions. *ACS Nano* **2015**, *9* (3), 2668–2676. https://doi.org/10.1021/nn506447k.
(184) Le Ru, E. C.; Grand, J.; Sow, I.; Somerville, W. R. C.; Etchegoin, P. G.; Treguer-Delapierre, M.; Charron, G.; Félidj, N.; Lévi, G.; Aubard, J. A Scheme for Detecting Every Single Target Molecule with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nano Lett.* **2011**, *11* (11), 5013–5019. https://doi.org/10.1021/nl2030344.
(185) Yu, F.; Su, M.; Tian, L.; Wang, H.; Liu, H. Organic Solvent as Internal Standards for Quantitative and High-Throughput Liquid Interfacial SERS Analysis in Complex Media. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (8), 5232–5238. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00008.

(186) Castro-Grijalba, A.; Montes-García, V.; Cordero-Ferradás, M. J.; Coronado, E.; Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I. SERS-Based Molecularly Imprinted Plasmonic Sensor for Highly Sensitive PAH Detection. *ACS Sens.* **2020**, *5* (3), 693–702. https://doi.org/10.1021/acssensors.9b01882.
(187) Agarwal, N. R.; Tommasini, M.; Fazio, E.; Neri, F.; Ponterio, R. C.; Trusso, S.; Ossi, P. M. SERS Activity of Silver and Gold Nanostructured Thin Films Deposited by Pulsed Laser Ablation. *Appl. Phys. A* **2014**, *117* (1), 347–351. https://doi.org/10.1007/s00339-014-8401-8.
(188) Spedalieri, C.; Szekeres, G. P.; Werner, S.; Guttmann, P.; Kneipp, J. Intracellular Optical Probing with Gold Nanostars. *Nanoscale* **2021**, *13* (2), 968–979. https://doi.org/10.1039/D0NR07031A.
(189) Saleh, T. A.; Al-Shalalfeh, M. M.; Al-Saadi, A. A. Graphene Dendrimer-Stabilized Silver Nanoparticles for Detection of Methimazole Using Surface-Enhanced Raman Scattering with Computational Assignment. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 32185. https://doi.org/10.1038/srep32185.
(190) Wu, H.-Y.; Cunningham, B. T. Point-of-Care Detection and Real-Time Monitoring of Intravenously Delivered Drugs via Tubing with an Integrated SERS Sensor. *Nanoscale* **2014**, *6* (10), 5162–5171. https://doi.org/10.1039/C4NR00027G.
(191) Huang, H.; Shi, H.; Feng, S.; Lin, J.; Chen, W.; Yu, Y.; Lin, D.; Xu, Q.; Chen, R. Quick Detection of Traditional Chinese Medicine 'Atractylodis Macrocephalae Rhizoma' Pieces by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Laser Phys.* **2013**, *23* (1), 015601. https://doi.org/10.1088/1054-660X/23/1/015601.
(192) Dowek, A.; Lê, L. M. M.; Rohmer, T.; Legrand, F.-X.; Remita, H.; Lampre, I.; Tfayli, A.; Lavielle, M.; Caudron, E. A Mathematical Approach to Deal with Nanoparticle Polydispersity in Surface Enhanced Raman Spectroscopy to Quantify Antineoplastic Agents. *Talanta* **2020**, *217*, 121040. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121040.
(193) Feng, C.; Huang, X. Polymer Brushes: Efficient Synthesis and Applications. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51* (9), 2314–2323. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00307.
(194) Masson, P.; Franta, E.; Rempp, P. [No title found]. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1982**, *3* (7), 499–504. https://doi.org/10.1002/marc.1982.030030709.
(195) Rempp, P.; Lutz, P.; Masson, P.; Chaumont, P. Macromonomers: A New Class of Polymeric Intermediates in Macromolecular Synthesis - II - Homo- and Copolymerization. *Makromol. Chem.* **1985**, *13* (S19851), 47–66. https://doi.org/10.1002/macp.1985.020131985105.
(196) Ignatova, M.; Voccia, S.; Gilbert, B.; Markova, N.; Mercuri, P. S.; Galleni, M.; Sciannamea, V.; Lenoir, S.; Cossement, D.; Gouttebaron, R.; Jérôme, R.; Jérôme, C. Synthesis of Copolymer Brushes Endowed with Adhesion to Stainless Steel Surfaces and Antibacterial Properties by Controlled Nitroxide-Mediated Radical Polymerization. *Langmuir* **2004**, *20* (24), 10718–10726. https://doi.org/10.1021/la048347t.
(197) Yao, D.-D.; Jin, R.-H. Synthesis of Comb-like Poly(Ethyleneimine)s and Their Application in Biomimetic Silicification. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (12), 2255–2263. https://doi.org/10.1039/C4PY01641F.
(198) Rzayev, J. Synthesis of Polystyrene−Polylactide Bottlebrush Block Copolymers and Their Melt Self-Assembly into Large Domain Nanostructures. *Macromolecules* **2009**, *42* (6), 2135–2141. https://doi.org/10.1021/ma802304y.
(199) Runge, M. B.; Bowden, N. B. Synthesis of High Molecular Weight Comb Block Copolymers and Their Assembly into Ordered Morphologies in the Solid State. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (34), 10551–10560. https://doi.org/10.1021/ja072929q.
(200) Müllner, M.; Yuan, J.; Weiss, S.; Walther, A.; Förtsch, M.; Drechsler, M.; Müller, A. H. E. Water-Soluble Organo−Silica Hybrid Nanotubes Templated by Cylindrical Polymer Brushes. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (46), 16587–16592. https://doi.org/10.1021/ja107132j.
(201) Yuan, J.; Xu, Y.; Müller, A. H. E. One-Dimensional Magnetic Inorganic–Organic Hybrid Nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (2), 640. https://doi.org/10.1039/c0cs00087f.
(202) Shukla, A.; Singh, A. P.; Maiti, P. Injectable Hydrogels of Newly Designed Brush Biopolymers as Sustained Drug-Delivery Vehicle for Melanoma Treatment. *Sig Transduct Target Ther* **2021**, *6* (1), 63. https://doi.org/10.1038/s41392-020-00431-0.

(203) Feuz, L.; Leermakers, F. A. M.; Textor, M.; Borisov, O. Bending Rigidity and Induced Persistence Length of Molecular Bottle Brushes: A Self-Consistent-Field Theory. *Macromolecules* **2005**, *38* (21), 8891–8901. https://doi.org/10.1021/ma050871z.
(204) Feuz, L.; Strunz, P.; Geue, T.; Textor, M.; Borisov, O. Conformation of Poly(L-Lysine)-Graft-Poly(Ethylene Glycol) Molecular Brushes in Aqueous Solution Studied by Small-Angle Neutron Scattering. *Eur. Phys. J. E* **2007**, *23* (3), 237–245. https://doi.org/10.1140/epje/i2007-10180-9.
(205) Hanpanich, O.; Maruyama, A. Cationic Comb-Type Copolymer as an Artificial Chaperone. *Polym J* **2019**, *51* (10), 935–943. https://doi.org/10.1038/s41428-019-0210-7.
(206) Gay, C.; Raphaël, E. Comb-like Polymers inside Nanoscale Pores. *Advances in Colloid and Interface Science* **2001**, *94* (1–3), 229–236. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(01)00062-8.
(207) Wang, Z.; Tao, F.; Pan, Q. A Self-Healable Polyvinyl Alcohol-Based Hydrogel Electrolyte for Smart Electrochemical Capacitors. *J. Mater. Chem. A* **2016**, *4* (45), 17732–17739. https://doi.org/10.1039/C6TA08018A.
(208) Papagiannopoulos, A.; Waigh, T. A.; Hardingham, T.; Heinrich, M. Solution Structure and Dynamics of Cartilage Aggrecan. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (7), 2162–2172. https://doi.org/10.1021/bm060287d.
(209) Strous, G. J.; Dekker, J. Mucin-Type Glycoproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1992**, *27* (1–2), 57–92. https://doi.org/10.3109/10409239209082559.
(210) Li, A.; Ma, J.; Sun, G.; Li, Z.; Cho, S.; Clark, C.; Wooley, K. L. One-Pot, Facile Synthesis of Well-Defined Molecular Brush Copolymers by a Tandem RAFT and ROMP, "Grafting-through" Strategy. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2012**, *50* (9), 1681–1688. https://doi.org/10.1002/pola.25954.
(211) Levi, A. E.; Lequieu, J.; Horne, J. D.; Bates, M. W.; Ren, J. M.; Delaney, K. T.; Fredrickson, G. H.; Bates, C. M. Miktoarm Stars via Grafting-Through Copolymerization: Self-Assembly and the Star-to-Bottlebrush Transition. *Macromolecules* **2019**, *52* (4), 1794–1802. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b02321.
(212) Lee, J.; Lopez, G.; Améduri, B.; Seo, M. Synthesis of Heterograft Copolymers with a Semifluorinated Backbone by Combination of Grafting-through and Grafting-from Polymerizations. *Macromolecules* **2020**, *53* (8), 2811–2821. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b02493.
(213) Lu, C.; Wang, C.; Yu, J.; Wang, J.; Chu, F. Metal-Free ATRP "Grafting from" Technique for Renewable Cellulose Graft Copolymers. *Green Chem.* **2019**, *21* (10), 2759–2770. https://doi.org/10.1039/C9GC00138G.
(214) Li, M.; Li, H.; De, P.; Sumerlin, B. S. Thermoresponsive Block Copolymer-Protein Conjugates Prepared by Grafting-from via RAFT Polymerization: Thermoresponsive Block Copolymer-Protein Conjugates Prepared by …. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32* (4), 354–359. https://doi.org/10.1002/marc.201000619.
(215) Carlmark, A.; Malmström, E. E. ATRP Grafting from Cellulose Fibers to Create Block-Copolymer Grafts. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1740–1745. https://doi.org/10.1021/bm030046v.
(216) Xiao, L.; Chen, Y.; Zhang, K. Efficient Metal-Free "Grafting Onto" Method for Bottlebrush Polymers by Combining RAFT and Triazolinedione–Diene Click Reaction. *Macromolecules* **2016**, *49* (12), 4452–4461. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b00782.
(217) Liu, M.; Yin, L.; Zhang, S.; Zhang, Z.; Zhang, W.; Zhu, X. Design and Synthesis of a Cyclic Double-Grafted Polymer Using Active Ester Chemistry and Click Chemistry via A "Grafting onto" Method. *Polymers* **2019**, *11* (2), 240. https://doi.org/10.3390/polym11020240.
(218) Gao, H.; Matyjaszewski, K. Synthesis of Molecular Brushes by "Grafting onto" Method: Combination of ATRP and Click Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (20), 6633–6639. https://doi.org/10.1021/ja0711617.
(219) Pan, J.; Zhao, M.; Liu, Y.; Wang, B.; Mi, L.; Yang, L. Development of a New Poly(Ethylene Glycol)-Graft-Poly(D,L-Lactic Acid) as Potential Drug Carriers. *J. Biomed. Mater. Res.* **2008**. https://doi.org/10.1002/jbm.a.31965.

(220) Coudane, J.; Laurent, E.; Vert, M. Poly(?-Caprolactone)-Based Organogels and Hydrogels with Poly(Ethylene Glycol) Cross-Linkings. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25* (21), 1865–1869. https://doi.org/10.1002/marc.200400310.
(221) Ponsart, S.; Coudane, J.; McGrath, J.; Vert, M. Study of the Grafting of Bromoacetylated α-Hydroxy-ω-Methoxypoly(Ethyleneglycol) onto Anionically Activated Poly(∈-Caprolactone). *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2002**, *17* (6), 417–432. https://doi.org/10.1177/088391102030911.
(222) Mougnier, S.-J.; Brochon, C.; Cloutet, E.; Fleury, G.; Cramail, H.; Hadziioannou, G. Design of Well-Defined Monofunctionalized Poly(3-Hexylthiophene)s: Toward the Synthesis of Semiconducting Graft Copolymers. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (8), 703–709. https://doi.org/10.1002/marc.201100703.
(223) Acik, G.; Sey, E.; Tasdelen, M. A. Polypropylene-Based Graft Copolymers via CuAAC Click Chemistry. *Express Polym. Lett.* **2018**, *12* (5), 418–428. https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2018.35.
(224) Obhi, N. K.; Peda, D. M.; Kynaston, E. L.; Seferos, D. S. Exploring the Graft-To Synthesis of All-Conjugated Comb Copolymers Using Azide–Alkyne Click Chemistry. *Macromolecules* **2018**, *51* (8), 2969–2978. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b00138.
(225) Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolr Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (11), 633–645. https://doi.org/10.1002/anie.196306331.
(226) Gacal, B. N.; Koz, B.; Gacal, B.; Kiskan, B.; Erdogan, M.; Yagci, Y. Pyrene Functional Poly(Vinyl Alcohol) by "Click" Chemistry. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2009**, *47* (5), 1317–1326. https://doi.org/10.1002/pola.23240.
(227) Ossipov, D. A.; Hilborn, J. Poly(Vinyl Alcohol)-Based Hydrogels Formed by "Click Chemistry." *Macromolecules* **2006**, *39* (5), 1709–1718. https://doi.org/10.1021/ma052545p.
(228) Yu, J. W.; Jung, J.; Choi, Y.-M.; Choi, J. H.; Yu, J.; Lee, J. K.; You, N.-H.; Goh, M. Enhancement of the Crosslink Density, Glass Transition Temperature, and Strength of Epoxy Resin by Using Functionalized Graphene Oxide Co-Curing Agents. *Polym. Chem.* **2016**, *7* (1), 36–43. https://doi.org/10.1039/C5PY01483B.
(229) Wang, J.; Cao, M.; Zhou, P.; Wang, G. Exploration of a Living Anionic Polymerization Mechanism into Polymerization-Induced Self-Assembly and Site-Specific Stabilization of the Formed Nano-Objects. *Macromolecules* **2020**, *53* (8), 3157–3165. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c00371.
(230) Gao, Y.; Zhou, D.; Lyu, J.; A, S.; Xu, Q.; Newland, B.; Matyjaszewski, K.; Tai, H.; Wang, W. Complex Polymer Architectures through Free-Radical Polymerization of Multivinyl Monomers. *Nat Rev Chem* **2020**, *4* (4), 194–212. https://doi.org/10.1038/s41570-020-0170-7.
(231) Corrigan, N.; Jung, K.; Moad, G.; Hawker, C. J.; Matyjaszewski, K.; Boyer, C. Reversible-Deactivation Radical Polymerization (Controlled/Living Radical Polymerization): From Discovery to Materials Design and Applications. *Progress in Polymer Science* **2020**, *111*, 101311. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101311.
(232) Barthet, C.; Wilson, J.; Cadix, A.; Destarac, M.; Chassenieux, C.; Harrisson, S. Micellar RAFT/MADIX Polymerization. *ACS Macro Lett.* **2017**, *6* (12), 1342–1346. https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.7b00791.
(233) Mecerreyes, D.; Atthoff, B.; Boduch, K. A.; Trollsås, M.; Hedrick, J. L. Unimolecular Combination of an Atom Transfer Radical Polymerization Initiator and a Lactone Monomer as a Route to New Graft Copolymers. *Macromolecules* **1999**, *32* (16), 5175–5182. https://doi.org/10.1021/ma982005a.
(234) Mecerreyes, D.; Humes, J.; Miller, R. D.; Hedrick, J. L.; Detrembleur, C.; Lecomte, P.; Jerome, R.; Roman, J. S. First Example of an Unsymmetrical Difunctional Monomer Polymerizable by Two Living/Controlled Methods. 6.
(235) Liu, S.; Zhang, L. Partially Lithiated Ternary Graft Copolymer with Enhanced Elasticity as Aqueous Binder for Si Anode. *J Appl Polym Sci* **2021**, *138* (10), 49950. https://doi.org/10.1002/app.49950.

(236) Ravichandran, R.; Venugopal, J. R.; Sundarrajan, S.; Mukherjee, S.; Forsythe, J.; Ramakrishna, S. Click Chemistry Approach for Fabricating PVA/Gelatin Nanofibers for the Differentiation of ADSCs to Keratinocytes. *J Mater Sci: Mater Med* **2013**, *24* (12), 2863–2871. https://doi.org/10.1007/s10856-013-5031-1.
(237) Gurol, I.; Altinkok, C.; Agel, E.; Tasaltin, C.; Durmuş, M.; Acik, G. Phthalocyanine Functionalized Poly(Vinyl Alcohol)s via CuAAC Click Chemistry and Their Antibacterial Properties. *J Coat Technol Res* **2020**, *17* (6), 1587–1596. https://doi.org/10.1007/s11998-020-00363-y.
(238) Awada, H.; Daneault, C. Chemical Modification of Poly(Vinyl Alcohol) in Water. *Applied Sciences* **2015**, *5* (4), 840–850. https://doi.org/10.3390/app5040840.
(239) Jameson, C. J. UNDERSTANDING NMR CHEMICAL SHIFTS. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1996**, *47* (1), 135–169. https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.47.1.135.
(240) Fu, C.; Gu, L. Composite Fibers from Poly(Vinyl Alcohol) and Poly(Vinyl Alcohol)-Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *128* (2), 1044–1053. https://doi.org/10.1002/app.38260.
(241) Lin, Y.; Zhou, B.; Shiral Fernando, K. A.; Liu, P.; Allard, L. F.; Sun, Y.-P. Polymeric Carbon Nanocomposites from Carbon Nanotubes Functionalized with Matrix Polymer. *Macromolecules* **2003**, *36* (19), 7199–7204. https://doi.org/10.1021/ma0348876.
(242) Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17* (7), 522–524. https://doi.org/10.1002/anie.197805221.
(243) Liu, T.; Peng, X.; Chen, Y.; Zhang, J.; Jiao, C.; Wang, H. Solid-Phase Esterification between Poly(Vinyl Alcohol) and Malonic Acid and Its Function in Toughening Hydrogels. *Polym. Chem.* **2020**, *11* (29), 4787–4797. https://doi.org/10.1039/D0PY00023J.
(244) Yan, J.; Malakooti, M. H.; Lu, Z.; Wang, Z.; Kazem, N.; Pan, C.; Bockstaller, M. R.; Majidi, C.; Matyjaszewski, K. Solution Processable Liquid Metal Nanodroplets by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14* (7), 684–690. https://doi.org/10.1038/s41565-019-0454-6.
(245) Discekici, E. H.; Anastasaki, A.; Read de Alaniz, J.; Hawker, C. J. Evolution and Future Directions of Metal-Free Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2018**, *51* (19), 7421–7434. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b01401.
(246) Gurnani, P.; Perrier, S. Controlled Radical Polymerization in Dispersed Systems for Biological Applications. *Progress in Polymer Science* **2020**, *102*, 101209. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101209.
(247) Matyjaszewski, K. Advanced Materials by Atom Transfer Radical Polymerization. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (23), 1706441. https://doi.org/10.1002/adma.201706441.
(248) Parkatzidis, K.; Wang, H. S.; Truong, N. P.; Anastasaki, A. Recent Developments and Future Challenges in Controlled Radical Polymerization: A 2020 Update. *Chem* **2020**, *6* (7), 1575–1588. https://doi.org/10.1016/j.chempr.2020.06.014.
(249) He, J.; Zhang, L. Polyvinyl Alcohol Grafted Poly (Acrylic Acid) as Water-Soluble Binder with Enhanced Adhesion Capability and Electrochemical Performances for Si Anode. *Journal of Alloys and Compounds* **2018**, *763*, 228–240. https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.05.286.

Annexes :

I) Annexes chapitre VI Voie estérification

Spectre RMN 1H et DOSY du PVA (40000 g/mol) réalisé dans du DMSO-*d6*

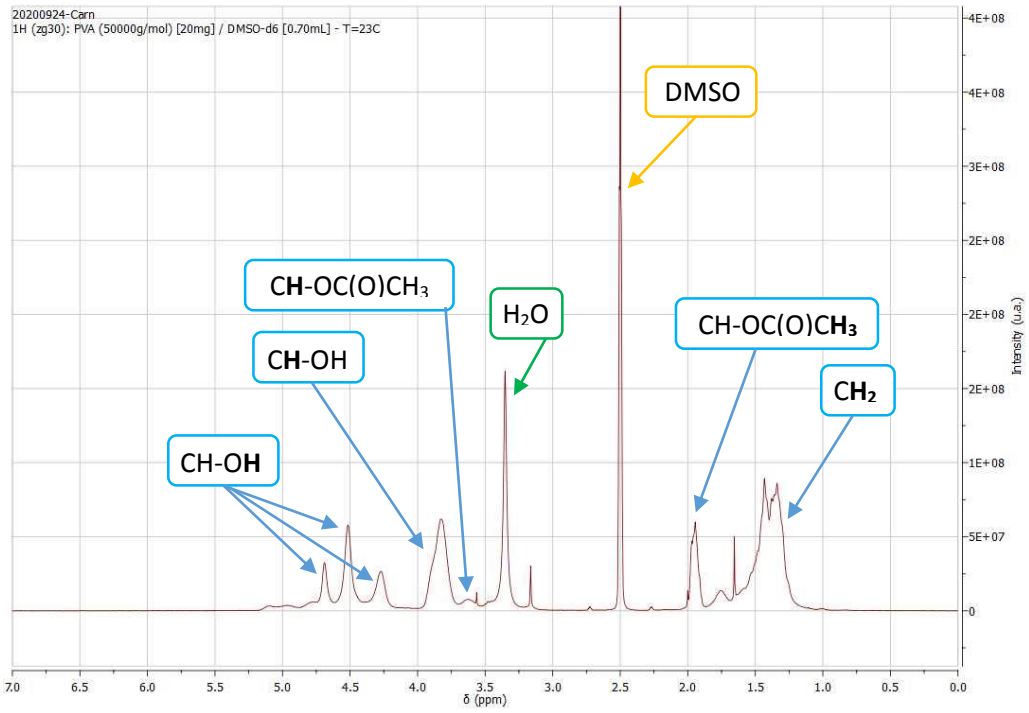


Figure A 1. Spectre RMN 1H du PVA (40000 g/mol)

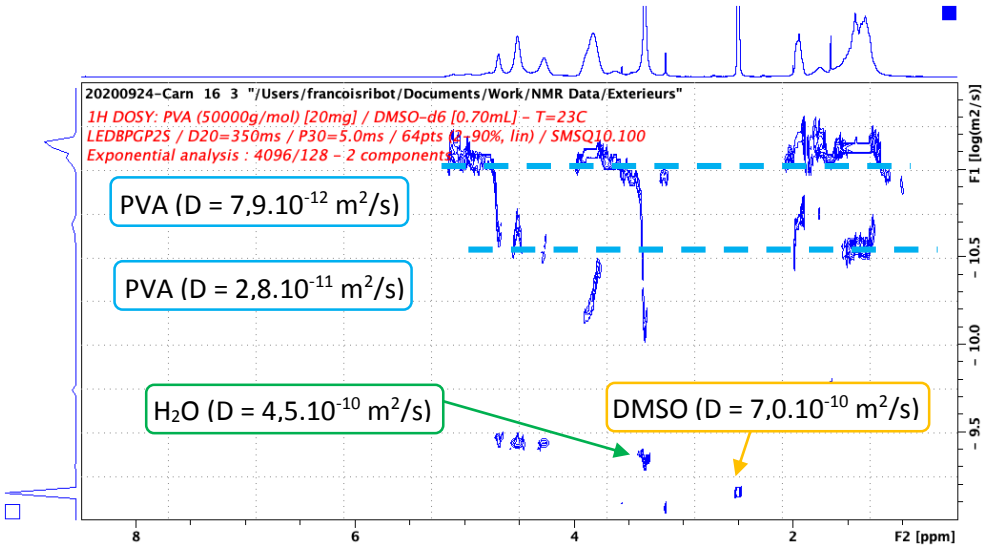


Figure A 2. Spectre RMN DOSY du PVA (40000 g/mol).

Spectre RMN 1H et DOSY du PSS (10000 g/mol) dans du DMSO-*d6*

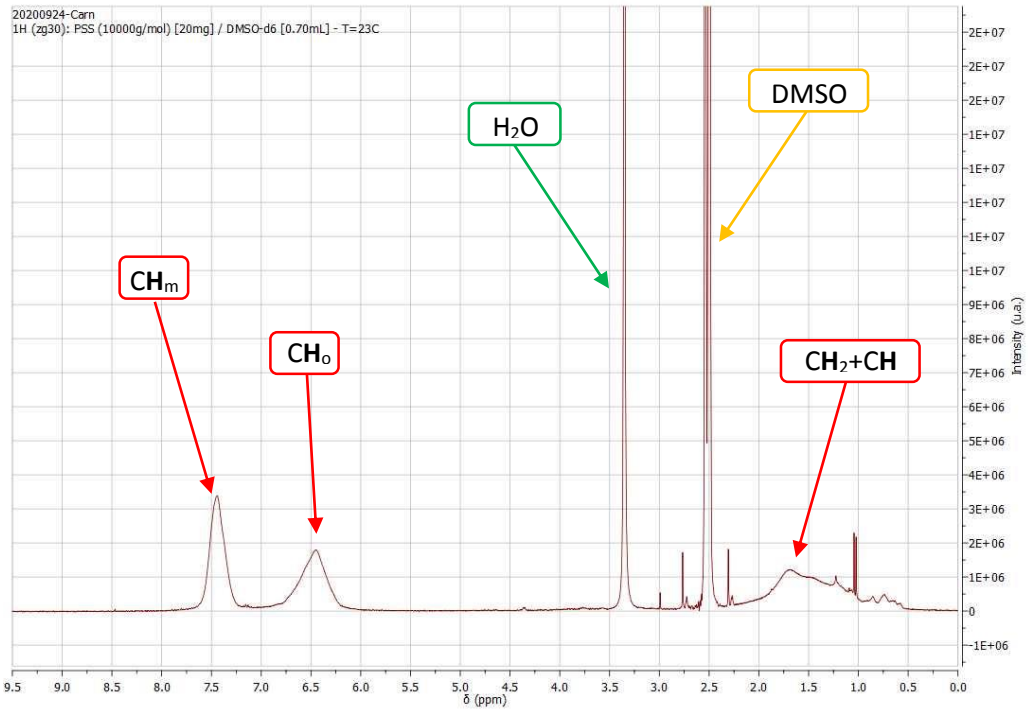


Figure A 3. Spectre RMN 1H du PSS (10000 g/mol)

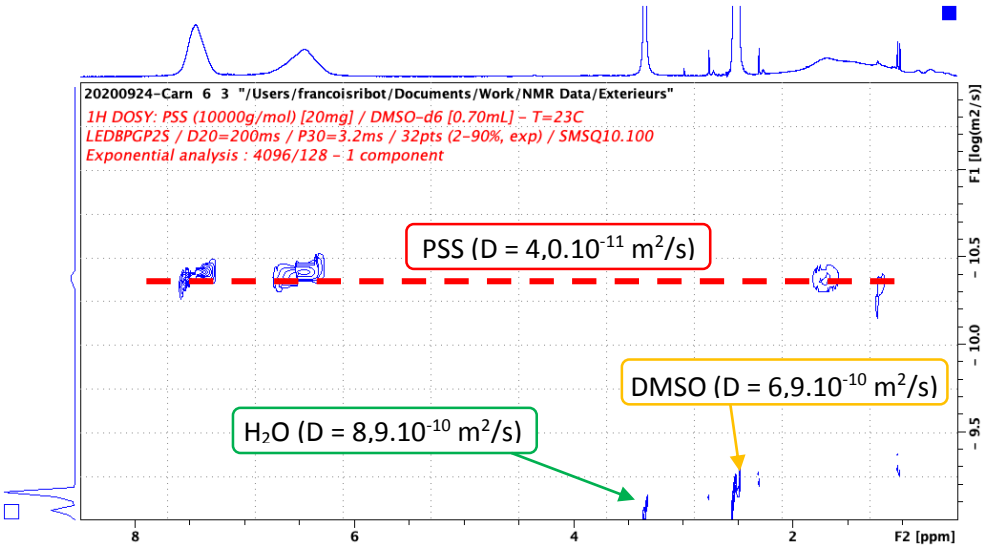


Figure A 4. Spectre RMN DOSY du PSS (10000 g/mol).

Spectre RMN 1H et DOSY du PSS (5000 g/mol) dans du DMSO-*d6*

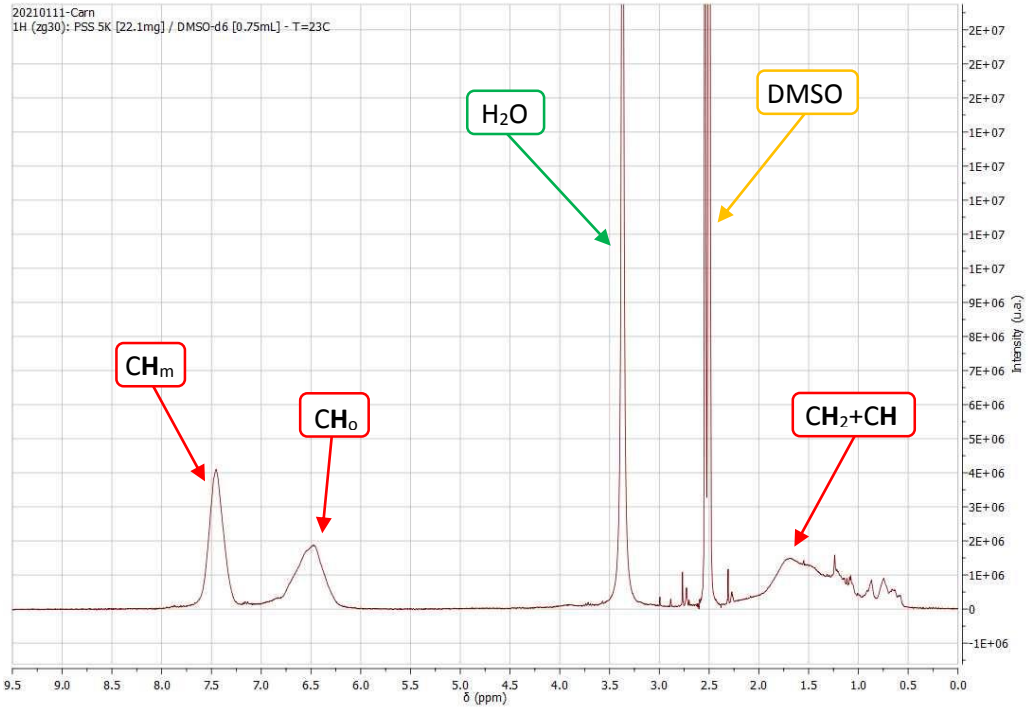


Figure A 5. Spectre RMN 1H du PSS (5000 g/mol).

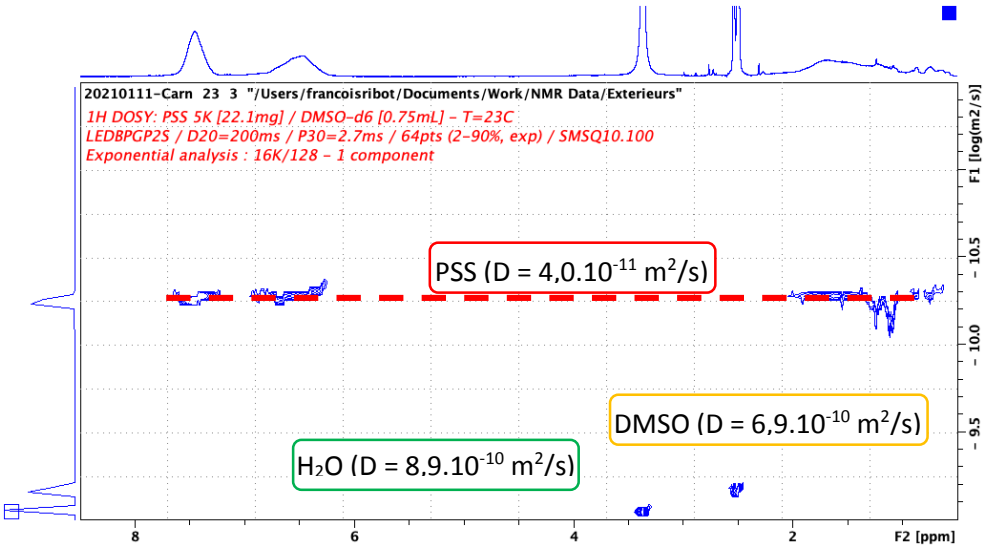
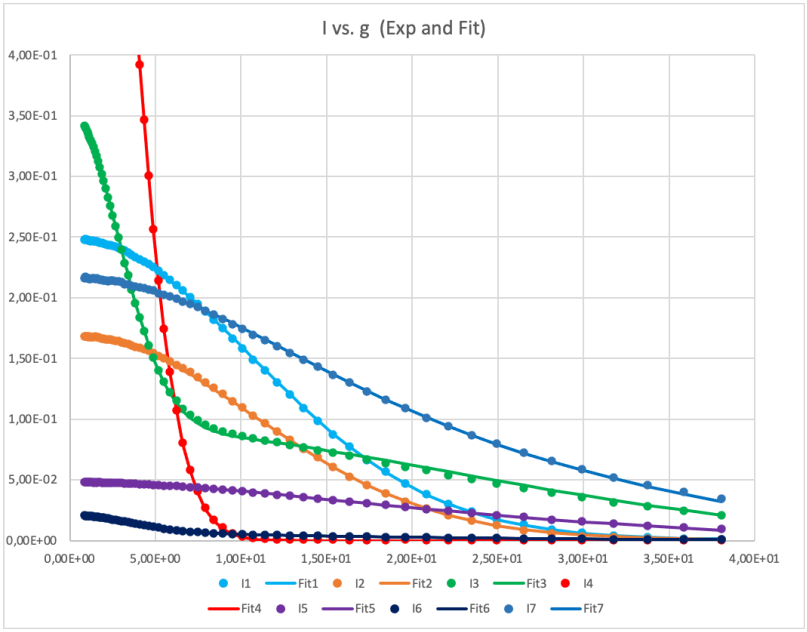
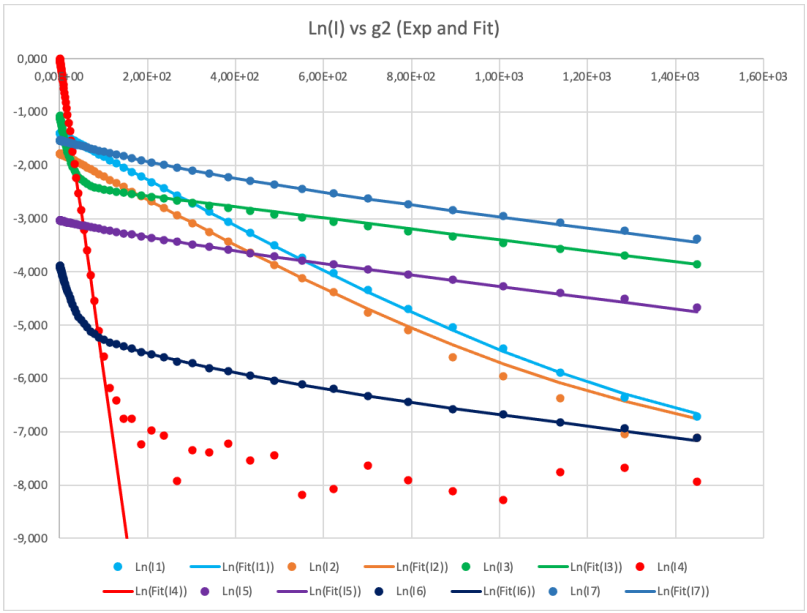


Figure A 6. Spectre RMN DOSY du PSS (5000 g/mol).

Analyse des profils d'atténuation du copolymère PVA-*g*-PSS(5000)





I1 : 7.60-7.28 ppm (PSS+PSSgPVA)

I2 : 6.80-6.30 ppm (PSS+PSSgPVA)

I3 : 3.95-3.66 ppm (H_2O+PSSgPVA)

I4 : 2.56-2.44 ppm (DMSO-d5)

I5 : 1.99-1.93 ppm (PSSgPVA+PSS)

I6 : 1.92-1.90 ppm (AcOH+PSSgPVA+PSS)

I7 : 1.60-1.26 ppm (PSSgPVA+PSS)

Figure A 7. Analyse des profils d'atténuations du copolymère PVA-g-PSS(5000).

$D(PSS) = 5.0\ 10^{-11}\ m^2s^{-1}$ (I1, I2, I5, I6, I7)
$D(PVA\text{-}g\text{-}PSS(5000)) = 1.1\ 10^{-11}\ m^2s^{-1}$ (I1, I2, I3, I5, I6, I7)
$D(H_2O) = 6.9\ 10^{-10}\ m^2s^{-1}$ (I3)
$D(DMSO\text{-}d5) = 6.5\ 10^{-10}\ m^2s^{-1}$ (I4)
$D(AcOH) = 4.8\ 10^{-10}\ m^2s^{-1}$ (I6)

II) Voie radicalaire

a) Etat de l'art

La voie de synthèse radicalaire est une méthode utilisée pour obtenir des copolymères de type peigne par voie « grafting from »[244–248]. Néanmoins, comme pour les autres voies de synthèses, il est difficile de trouver des systèmes basés sur un squelette de PVA.

Cependant, comme évoqué précédemment dans ce chapitre, les travaux de Liu et al.[235] qui ont réalisé la synthèse d'un copolymère de type « peigne » avec des greffons d'acide acrylique/lithiumacrylate/hydroxyethyl acrylate sont une très bonne piste de synthèse. C'est de ces travaux que seront inspirés les protocoles pour l'obtention d'un copolymère « peigne » de type polyélectrolyte par voie radicalaire.

b) Synthèses et caractérisations

La totalité des synthèses ont été réalisées au laboratoire ITODYS avec l'aide de Samia Zrig.

Le protocole consiste à synthétiser un PVA-*g*-PAA en polymérisant un monomère d'acide acrylique sur un squelette de PVA par voie RAFT (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfert). Ce protocole s'appuie donc sur les travaux de Liu et al.[235] en changeant tout de même la quantité de monomères introduite afin d'obtenir une taille de greffon de l'ordre de 66 unités par greffon (Figure A.8).

Le PVA utilisé est le même que pour la voie estérification. L'acide acrylique (monomère), le persulfate de sodium/bisulfite de sodium (amorceur radicalaire redox) proviennent tous de chez Sigma-Aldrich.

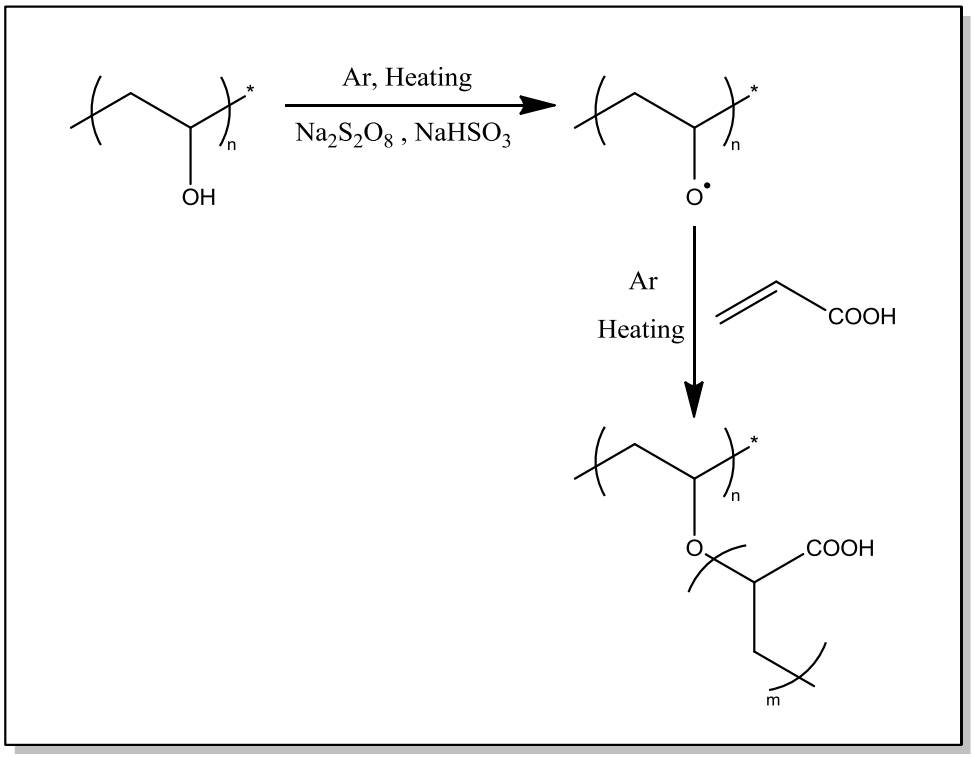


Figure A. 8. Schéma de synthèse du PVA-g-PAA par voie RAFT.

Dans un ballon bicol de 250 mL, dissoudre 2 g de PVA dans 100 mL à 80 °C à reflux sous agitation. Une fois le PVA dissous et la solution limpide, redescendre la solution à température ambiante et dégazer le système à l'argon (solution et ballon) pour travailler sous atmosphère inerte. Ajouter ensuite le persulfate de sodium et le bisulfite de sodium en agitant pendant 10 min puis dégazer à nouveau le système à l'argon. La température est ensuite montée à 60 °C puis l'acide acrylique est ajouté goutte à goutte à l'aide d'une seringue. Le système, qui prend une teinte jaunâtre, est laissé sous agitation à 60 °C à reflux pendant 24 h. La solution finale présente toujours cette couleur jaunâtre et l'immobilité du barreau aimanté laisse penser que la solution a gélifiée.

La solution est ensuite versée dans un excès d'éthanol afin de précipiter le PVA qui n'aurait pas réagi puis à nouveau versée dans un excès d'acétone pour précipiter le copolymère (Tableau A.1).

Taux de greffage visé	V_{Eau} *(mL)*	m_{PVA} *(g)*	$m_{Na2S2O8}$ *(g)*	m_{NaHSO3} *(g)*	m_{AA} *(g)*
10%	100	2	1,08	0,24	21,6

Tableau A 1. Quantité de réactif utilisé pour la synthèse du PVA-g-PAA.

Au bout de 24 h, la solution est devenue un gel jaunâtre. Ni l'ajout d'éthanol ou d'acétone ne permet de précipiter le PVA non greffé ou le copolymère souhaité tel qu'attendu dans les travaux de Liu et al.[235]. Par ailleurs, les auteurs ne discutent pas de l'aspect final du polymère, cependant les tests de tension sur leur produit final laissent penser que le polymère a un

aspect solide, élastique et manipulable. Bien que basé sur une observation visuelle, la différence observée avec la littérature laisse imaginer que le produit obtenu n'est pas celui souhaité. Il serait cependant intéressant de caractériser le produit obtenu mais aussi de voir si ce gel peut être dispersé en le diluant dans un excès d'eau ou par ajout de sel.

Suite à cette première synthèse, un nouveau protocole a été réalisé en changeant le taux de greffage visé, donc une quantité d'acide acrylique moindre et un temps d'agitation du milieu réactionnel passant de 24 h à 2 h 30. Ce nouveau protocole est inspiré des travaux de He et al.[249] qui, dans le même but que Liu et al.[235] d'améliorer les propriétés d'anodes de silicium, ont synthétisé un copolymère PVA-*g*-PAA. Le protocole est le même que précédemment à la différence près que le temps de réaction est de 2 h 30 (tableau A.2).

Taux de greffage visé	V_{Eau} *(mL)*	m_{PVA} *(g)*	$m_{Na2S2O8}$ *(g)*	m_{NaHSO3} *(g)*	m_{AA} *(g)*
5%	100	2	0,60	0,18	10

Tableau A 2. Quantité de réactif utilisé pour la synthèse du PVA-g-PAA.

Contrairement à la synthèse précédente, celle-ci donne un polymère blanc très collant, très difficile à manipuler contrairement à He et al.[249] qui expliquent avoir un solide blanc très clair. L'odeur et la texture du produit final sont très proches de ce que l'on pourrait observer avec une colle acrylique. Il n'est pas possible de conclure sur le produit obtenu, mais les observations visuelles mettent en évidence une différence avec les résultats de la littérature.

Un troisième protocole a été étudié en changeant la voie de polymérisation pour observer si cette dernière a un impact sur le produit final. Ce protocole a suivi exactement celui des travaux réalisés par Wang et al.[207] qui consiste à synthétiser un PVA-*g*-PAA par polymérisation radicalaire catalytique pour ensuite obtenir un hydrogel par utilisation de chlorure de potassium et de borax. Dans notre cas, nous nous arrêterons à l'étape de polymérisation de l'acide acrylique.

Dans un ballon bicol de 100 mL, dissoudre le PVA dans 25 mL d'eau à 80 °C à reflux sous agitation. La solution est ensuite amenée à température ambiante puis dégazée à l'argon (solution et ballon) avant d'ajouter l'acide acrylique, l'acide sulfurique à 98 % et la solution de nitrate de cerium et d'ammonium (23 mg dans 5 mL d'eau milliQ). La température est ensuite augmentée à 45 °C et la solution est laissée sous agitation pendant 4 h. Le produit final présente à nouveau l'aspect d'un gel jaunâtre comme pour la première synthèse.

Le polymère est récupéré par précipitation dans l'acétone et par filtration (Tableau A.3).

V_{Eau} (mL)	m_{PVA} (g)	m_{AA} (g)	V_{H2SO4} (mL)	CAN solution	
100	0,875	0,720	1,8	CAN 23 mg	Eau milliQ 5 mL

Tableau A 3. Quantité de réactif utilisé pour la synthèse du PVA-g-PAA.

Comme pour la synthèse réalisée par voie RAFT, le produit obtenu présente l'aspect d'un gel jaunâtre difficilement manipulable. Par ailleurs, aucune précipitation est observée après ajout d'un excès d'acétone ou d'éthanol. D'après Wang et al.[207], le polymère présente un aspect de solide blanc. Si l'aspect gélatineux de notre produit est difficilement explicable, la couleur elle, peut provenir de catalyseur de cérium qui présente initialement une couleur orange.

Les trois voies de synthèses par polymérisation d'un monomère n'ont pas mené, sur le plan visuel, au copolymère souhaité. On peut noter une grande différence de l'aspect de nos produits finaux en comparaison de ceux obtenus par Liu et al., He et al. et Wang et al. Si dans certains cas, il est possible d'expliquer des causes probables, la dernière synthèse qui a suivi de manière identique le protocole de Wang et al. soulève des questions.

Si les résultats ne sont pas ceux attendus, cette voie de greffage reste tout de même à explorer en changeant, par exemple, de nouveau les quantités du monomère pour, dans un premier temps, voir s'il est possible d'obtenir le copolymère PVA-*g*-PAA avec des greffons de très petite taille. Comme expliqué précédemment, il serait intéressant de caractériser de manière plus précise les produits obtenus mais aussi d'essayer de disperser les gels dans un excès d'eau ou par ajout de sel. En effet, ces gels peuvent être le résultat d'une forte concentration en polyélectrolytes, l'ajout de sel permettrait d'écranter les charges de ces derniers.

Titre : Assemblages de nanoparticules d'or avec de longues chaînes polyélectrolyte pour la formation d'oligomères plasmoniques

Résumé :

Ce travail de thèse concerne le développement de méthodes permettant l'assemblage d'un nombre limité de nanoparticules d'or dans l'eau par complexation électrostatique avec des longues chaînes polyélectrolytes de différentes natures. Dans une première partie, nous avons étudié la complexation de nanoparticules d'or recouvertes de citrate avec des polyélectrolytes linéaires d'origine biologique. Nous montrons que les assemblages globalement neutres formés au voisinage de la stœchiométrie de charge présentent une faible stabilité colloïdale mais permettent de maximiser l'absorption optique dans le proche infrarouge. Nous montrons comment la dynamique rapide d'agrégation peut être arrêtée à différents stades par l'ajout de polyélectrolyte en conservant la structure et les propriétés optiques du complexe initial. Le signe de la charge globale de ces assemblages est contrôlé par celui du polyélectrolyte ajouté dans la seconde étape. L'utilisation d'un dispositif microfluidique de mélange rapide nous a permis de stabiliser des structures nanométriques avec un contrôle du nombre d'agrégation moyen. Nous étudions ensuite le potentiel de ces assemblages comme sonde pour la quantification de molécules à visée thérapeutique dans des milieux de différentes complexités par spectroscopie Raman exaltée de surface. Dans une seconde partie, nous avons amorcé un travail exploratoire concernant la synthèse de copolymères greffés composés d'un squelette polaire non-ionique et de bras latéraux polyélectrolytes. Le développement de ces poly électrolytes de type peigne vise à accroitre les possibilités de contrôle structural de complexes électrostatiques dans des milieux complexes où les conditions physico-chimiques sont imposées.

Mot clefs : nanoparticules d'or, polyélectrolytes, assemblage, complexation électrostatique, copolymère « peigne ».

Title : Gold nanoparticles assembly with long polyelectrolyte chains for the formation of plasmonic oligomers

Abstract

The purpose of this thesis is to develop methods allowing the assembly of a limited number of gold nanoparticles in water by electrostatic complexation with long-chain polyelectrolytes of different natures. In a first part, we studied the complexation of citrate-coated gold nanoparticles with linear polyelectrolytes of biological origin. We show that the globally neutral assemblies formed in the vicinity of the charge stoichiometry exhibit low colloidal stability but allow maximizing the optical absorption in the near infrared. We show how the rapid dynamics of aggregation can be arrested at different stages by the addition of polyelectrolyte while maintaining the structure and optical properties of the initial complex. The sign of the overall charge of these assemblies is controlled by that of the polyelectrolyte added in the second step. The use of a fast mixing microfluidic device allowed us to stabilise nanoscale structures with a controlled average aggregation number. We then investigate the potential of these assemblies as a probe for the quantification of therapeutically relevant molecules in media of different complexities by surface enhanced Raman spectroscopy. In a second part, we have initiated exploratory work on the synthesis of graft copolymers composed of a non-ionic polar backbone and polyelectrolyte side arms. The development of these comb-type polyelectrolytes aims to increase the possibilities of structural control of electrostatic complexes in complex media where physicochemical conditions are imposed.

Keywords : gold nanoparticles, polyelectrolytes, assembly, electrostatic complexation, comb-like copolymer.