

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**École Nationale Supérieure de Chimie de
Montpellier (ENSCM)**

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences Chimiques Balard ED 459

et de l'unité de recherche
Institut Charles Gerhardt de Montpellier
Équipe Ingénierie et Architectures Macromoléculaires
(ICGM-IAM UMR 5253)

Spécialité : **Chimie et physico-chimie des matériaux**

Présentée par **Laëtitia KORCHIA**

**Auto-assemblage de copolymères
amphiphiles photo-stimulables à base de
polyoxazoline**

Soutenue le 7 octobre 2016 devant le jury composé de

M. Christophe CHASSENIEUX	Professeur, Université du Maine	Rapporteur
M. Patrice WOISEL	Professeur, ENS Chimie de Lille	Rapporteur
M. François GANACHAUD	Directeur de Recherches CNRS, INSA Lyon	Examineur
M. Jean-Jacques ROBIN	Professeur, Université Montpellier	Examineur
M. Vincent LAPINTE	Maître de Conférences HDR, Université Montpellier	Directeur de thèse
Mme. Cécile BOUILHAC	Chargée de Recherches CNRS, Université Montpellier	Co-encadrante

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**École Nationale Supérieure de Chimie de
Montpellier (ENSCM)**

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences Chimiques Balard ED 459

et de l'unité de recherche
Institut Charles Gerhardt de Montpellier
Équipe Ingénierie et Architectures Macromoléculaires
(ICGM-IAM UMR 5253)

Spécialité : **Chimie et physico-chimie des matériaux**

Présentée par **Laëtitia KORCHIA**

**Auto-assemblage de copolymères
amphiphiles photo-stimulables à base de
polyoxazoline**

Soutenue le 7 octobre 2016 devant le jury composé de

M. Christophe CHASSENIEUX	Professeur, Université du Maine	Rapporteur
M. Patrice WOISEL	Professeur, ENS Chimie de Lille	Rapporteur
M. François GANACHAUD	Directeur de Recherches CNRS, INSA Lyon	Examineur
M. Jean-Jacques ROBIN	Professeur, Université Montpellier	Examineur
M. Vincent LAPINTE	Maître de Conférences HDR, Université Montpellier	Directeur de thèse
Mme. Cécile BOUILHAC	Chargée de Recherches CNRS, Université Montpellier	Co-encadrante

Auto-assemblages de copolymères amphiphiles photo-stimulables à base de polyoxazoline

Résumé

Trois architectures de copolymères (dibloc, tribloc et hétérogreffé) amphiphiles photo-stimulables à base de polyoxazoline et de groupements photo-sensibles de type coumarine sont étudiées dans ce travail. Ces copolymères s'auto-assemblent en milieu aqueux sous forme de nanoparticules de morphologies sphériques, ovales mais également de nanofibres hélicoïdales de plusieurs micromètres de longueur. Selon les cas, les morphologies sont induites par de la cristallisation des motifs coumarine entre eux ou bien dues à des interactions polyoxazoline-coumarine. Par ailleurs, la photo-réponse des nanoparticules a été examinée après irradiation UV des groupements coumarine, capables de dimériser de manière réversible selon la longueur d'onde utilisée. Elle diffère selon l'architecture du copolymère qui constitue les nanoparticules et donne lieu à des phénomènes de (pré-)photo-dimérisation ou photo-réticulation du cœur de celles-ci avec des réversibilités sous UV variables et un maximum d'efficacité dans le cas des copolymères triblocs. La stabilité de ces auto-assemblages a également été examinée avant et après exposition sous UV. Dans tous les cas, l'irradiation des nanoparticules améliore leur stabilité en température et dans le temps avec un effet maximal dans le cas de la pré-photodimérisation (tribloc). Enfin, la réticulation et la cristallisation se sont révélées être des freins au piégeage de molécules hydrophobes, illustrées ici avec le Nile Red, alors que les copolymères diblocs se sont révélés être les systèmes les plus efficaces. En somme, les nanoparticules de copolymères triblocs présentent le meilleur compromis entre stabilité des nano-objets formés, efficacité de la photo-réaction et piégeage de molécules hydrophobes.

Mots clés : *Polyoxazoline – Coumarine – Auto-assemblage – Photo-sensible – Amphiphile*

Laboratoire: Equipe Ingénierie et Architectures Macromoléculaires ICGM UMR 5253

Self-assembly of photo-responsive amphiphilic copolymers based on polyoxazoline

Abstract

Three photo-responsive amphiphilic copolymer architectures (diblock, triblock and heterografted) based on polyoxazoline and coumarin photo-sensitive units are studied in this work. These copolymers self-assemble in water into spherical or ovalic nanoparticles and also supramicrometer helicoidal nanofibers. Depending on the macromolecular architectures, these morphologies are induced by crystallization of coumarin units or polyoxazoline-coumarin interactions. Moreover, the nanoparticle photo-response is examined after the UV-exposure of coumarin units, that are able to reversibly dimerize according to the wavelength used. This photo-response varies with the copolymer structure and leads to (previous) photo-dimerization or photo-crosslinking phenomena. These latter present various photo-reversibility behaviors under UV and a maximal efficiency for triblock copolymers. The nanoparticle stability was additionally studied before and after UV-irradiation. In both cases, the nanoparticle stability is improved towards time and temperature with a maximal impact for the previous photo-dimerization (triblock). Finally, the crosslinking and the crystallization appear as brakes for the hydrophobic molecule entrapment, illustrated here by Nile Red, whereas diblock copolymers seem to be the most efficient systems. To conclude, previously photo-dimerized nanoparticles (triblock) are the best way combining stability, UV-efficiency and hydrophobic molecules entrapment.

Key words: *Polyoxazoline – Coumarin – Self-assembly – Photo-responsive – Amphiphilic*

Affiliation: Equipe Ingénierie et Architectures Macromoléculaires ICGM UMR 5253

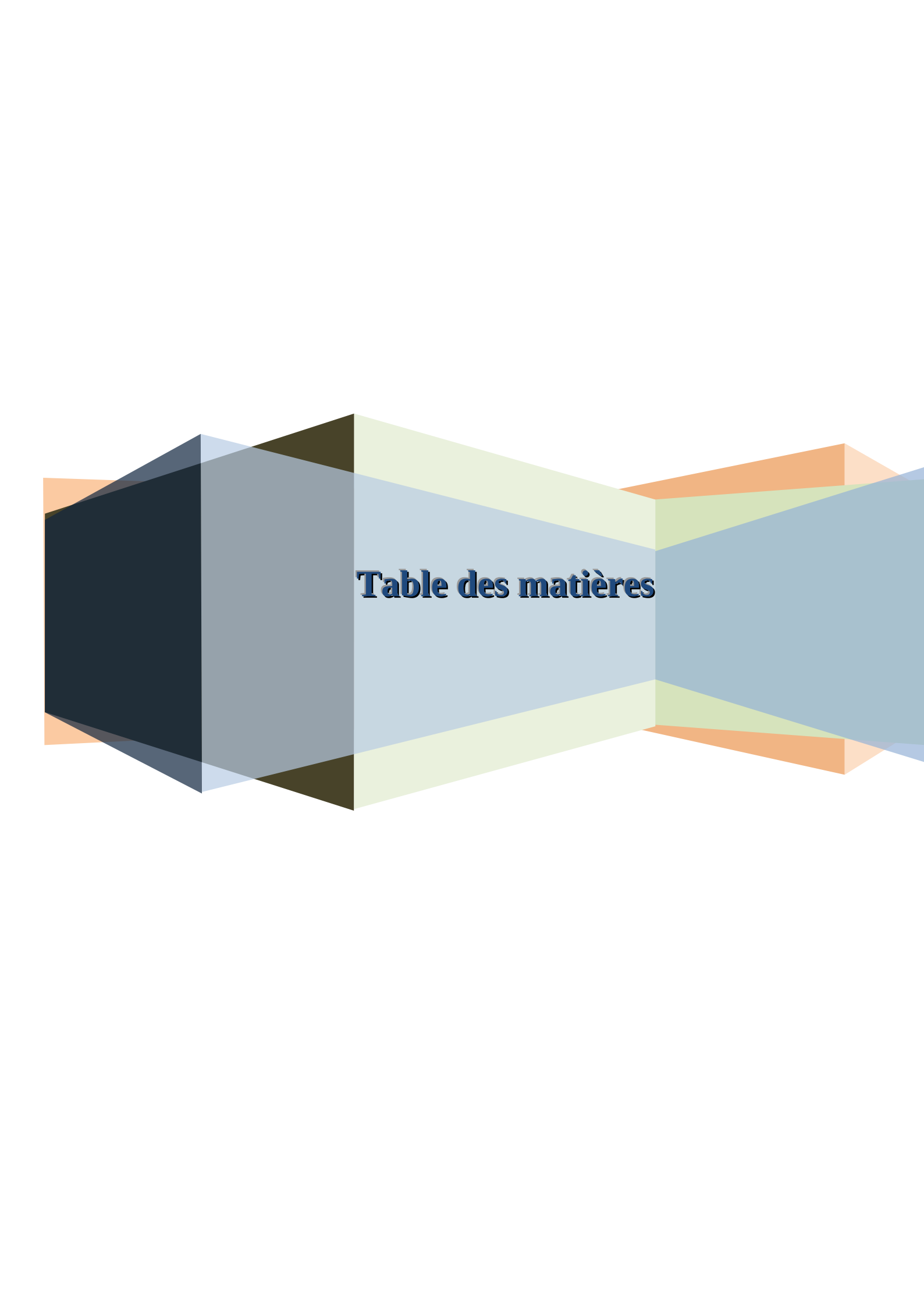


Table des matières

Table des matières

Abréviations et nomenclature

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre 1 : Généralités sur les polyoxazolines et leur photo-activation.....	5
--	----------

1. Introduction.....	5
2. Copolymères amphiphiles et auto-organisation en solution.....	5
2.1. Généralités sur les polymères amphiphiles	5
2.2. Auto-organisation des copolymères amphiphiles	8
2.3. Techniques de mise en solution et de caractérisation des auto-assemblages	9
3. Les polymères stimulables.....	12
3.1. Généralités	12
3.2. Photo-stimulation de polymères.....	18
3.2.a) Généralités sur les ultra-violets.....	18
3.2.b) Notion de photo-réactivité	20
3.2.c) Molécules photo-réactives et polymères	22
3.2.d) La photo-dimérisation	26
4. Focus sur le groupement photo-actif coumarine.....	29
4.1. Le motif et ses dérivés.....	29
4.2. Polymères porteurs d'unités coumarine : de la simple photo-dimérisation à la photo-réticulation	31
5. Vision détaillée des polyoxazolines (POx).....	34
5.1. De leurs structures chimiques à leurs propriétés physico-chimiques.....	34
5.2. Polymérisation cationique par ouverture de cycle des oxazolines (CROP)	36
5.3. Les points forts des polyoxazolines	42
5.4. Fonctionnalisation des POx.....	43
5.5. Suprastructuration des POx.....	44
5.6. Quelques rares exemples de polyoxazolines photo-sensibles	48
6. Conclusion	51
Références bibliographiques	53

Chapitre 2 : Auto-assemblage de polyoxazolines amphiphiles diblocs photo-stimulables	61
1. Introduction	61
2. Voies de synthèse des copolymères amphiphiles diblocs	62
3. Inventaire des polyoxazolines amphiphiles diblocs	64
4. Notre stratégie de synthèse des polyoxazolines à structure diblocs amphiphiles	64
5. Publication	66
6. Compléments sur l'étude UV	87
6.1. Méthodologie de suivi de l'activité UV	87
6.2. Agrégation de nanoparticules sous UV	88
7. Conclusion	91
 Chapitre 3 : Polyoxazolines amphiphiles triblocs photo-induites	 95
1. Introduction	95
2. Stratégies de synthèse des copolymères amphiphiles triblocs ABA	96
3. Auto-assemblage des copolymères amphiphiles triblocs ABA	97
4. Publication	98
5. Etude détaillée de la photo-dimérisation de l'amorceur CmTs	112
6. Conclusion	114
 Chapitre 4 : Copolymères hétérogreffés : assemblage photo-réticulable et nano-structuration complexe	 117
1. Introduction	117
2. Bibliographie sur les copolymères amphiphiles hétérogreffés	118
2.1. Généralités sur la synthèse de copolymères hétérogreffés	118
2.2. Etude de nanoparticules au cœur photo-stabilisé	121
3. Architecture des copolymères hétérogreffés amphiphiles photo-réticulables synthétisés	122
4. Publication	124
5. Polyoxazoline-coumarine : structuration à longue distance	149
5.1. Prélude sur les interactions polyoxazoline-coumarine	149
5.2. Publication	149
6. Conclusion	162

7.	Encapsulation du Nile Red.....	206
7.1.	<i>Identification des nanoparticules chargées.....</i>	206
7.2.	<i>Calibration du Nile Red</i>	207
7.3	<i>Dosage du Nile Red encapsulé.....</i>	208

Annexes.....	209
Annexes chapitre 3.....	209
Annexes chapitre 4.....	211
Annexes chapitre 5.....	216

Liste des abréviations

PO _x	Polyoxazoline
3-IC	Acide 3-indène carboxylique
A	Absorbance
A ²	Second coefficient du viriel
ACN (CH ₃ CN)	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique (atomic force microscopy)
AIBN	2,2'-Azobis(2-méthylpropionitrile)
Am (Am-X)	Agent d'amorçage
At (At-X)	Agent de terminaison
ATRP	Polymérisation radicalaire par transfert d'atome (atom transfert radical polymerization)
AZO	Azobenzène
C.A.C.	Concentration d'agrégation critique (critical aggregation concentration)
C.A.T.	Température critique d'agrégation (critical aggregation temperature)
C.G.C.	Concentration de gel critique (critical gel concentration)
CaH ₂	Hydruure de calcium
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CISA	Auto-assemblage induit par cristallisation (crystallization induced self-assembly)
CPDB	2-Cyano-2-propylbenzodithioate
CROP	Polymérisation cationique par ouverture de cycle (cationic ring-opening polymerization)
CTA	Agent de contrôle de transfert de chaîne (control chain transfert agent)
Cu(SO ₄)	Sulfate de cuivre
<i>D</i>	Coefficient de diffusion
<i>Đ</i>	Dispersité
D.L.C.	Capacité de piégeage (drug loading capacity)
D.L.E.	Efficacité de piégeage (drug loading efficiency)
D ₂ O	Eau deutérée (deuterium oxide)
D _G	Diamètre de giration
D _H	Diamètre hydrodynamique
DLS (DDL)	Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering)
DMAc	Diméthylacétamide
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNQ	2-Diazo-1,2-naphtoquinone
DOX	Doxorubicine
DP _n	Degré de polymérisation moyen en nombre

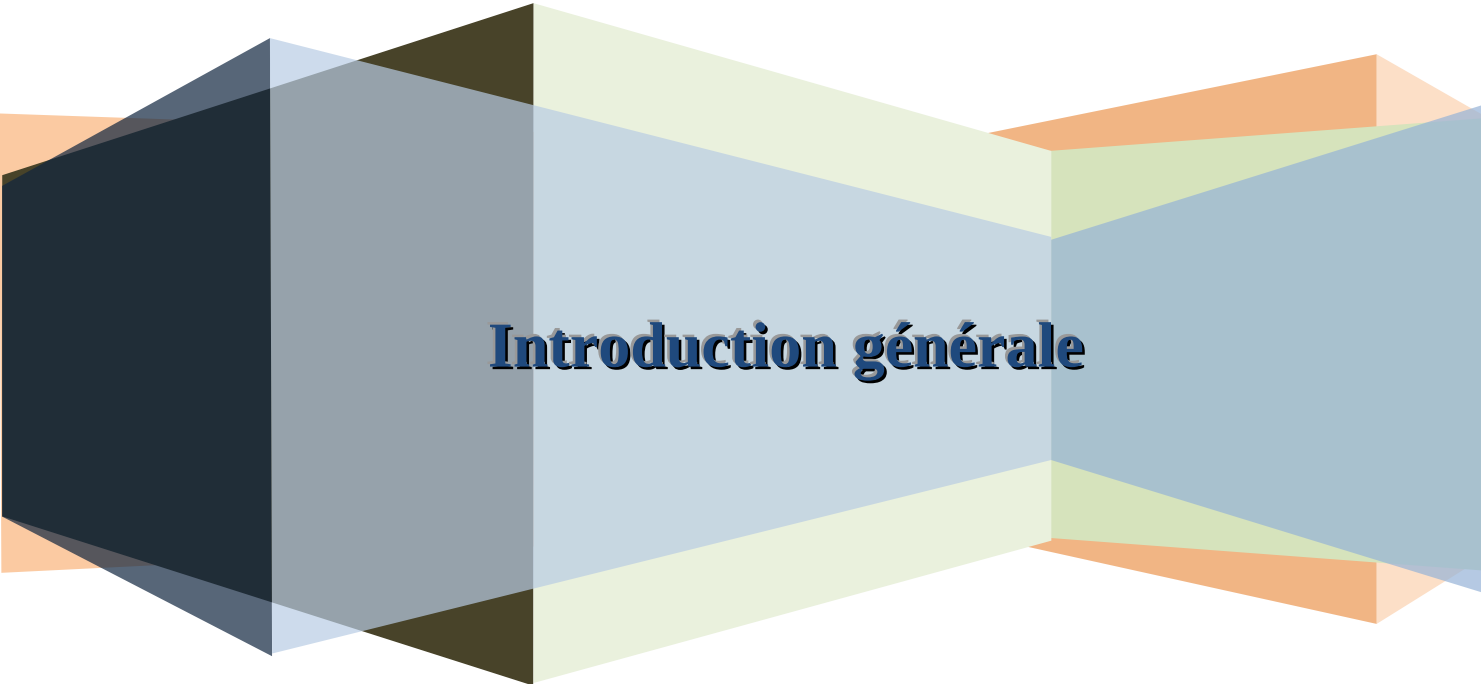
DRX (XRD)	Diffraction des rayons X (X-ray diffraction)
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage (differential scanning calorimetry)
DTE	Dithienyléthène
D _{TEM}	Diamètre évalué par image TEM
EtOx	2-Ethyl-2-oxazoline
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and drug administration)
FRP	Polymérisation radicalaire libre (free radical polymerization)
H _{AFM}	Hauteur mesurée par AFM
Hg	Mercure
HOMO	Plus haute orbitale moléculaire occupée (highest occupied molecular orbital)
HOMO*	Plus haute orbitale moléculaire occupée dans son état excité
h ν	Photon
I	Intensité
K ₂ CO ₃	Carbonate de potassium
k _B	Constante de Boltzmann
KOH	Hydroxyde de potassium
L	Epaisseur de la couronne
Lc	Longueur de contour (contour length)
LCP	Polymère cristal liquide (liquid crystalline polymer)
LCST	Température critique de solubilisation la plus basse (lower critical solution temperature)
lipoPOx	Polyoxazoline lipophile
l _p	Longueur de persistance (persistence length)
LUMO	Plus basse orbitale moléculaire inoccupée (lowest unoccupied molecular orbital)
LUMO*	Plus basse orbitale moléculaire inoccupée dans son état excité
MAA	Acide méthacrylique
MACl	Chlorure de méthacrylate
Me	Méthyle
MEB (SEM)	Microscopie électronique à balayage (scanning electron microscopy)
MeOH	Méthanol
MeOTs	Tosylate de méthyle
MET (TEM, HR-TEM)	Microscopie électronique à transmission (transmission electron microscopy)
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
MMAc	Méthacrylate de méthyle
M _n	Masse molaire moyenne en nombre
MOx	2-Méthyl-2-oxazoline
M _{PHILE}	Masse molaire hydrophile
M _{PHOBE}	Masse molaire hydrophobe
M _{TOT}	Masse molaire totale
M _w	Masse molaire moyenne en poids
MWCO	Masse molaire de sélection (molecular weight cut-off)

N _{ag}	Nombre d'agrégation
NB	<i>o</i> -Nitrobenzyle
N _{BIG}	Nombre de grosses nanoparticules
NEt ₃	Triéthylamine
NR	Nile Red
N _{SMALL}	Nombre de petites nanoparticules
O/W	Mélange huile dans eau (oil/water)
P	Pas de l'hélice
P(MOx) (POx)	Poly(2-méthyl-2-oxazoline)
PAA	Poly(acide acrylique)
PAEMA	Poly[2-(acétoacétoxy)éthylméthacrylate]
PBLG	poly(γ -benzyl-L-glutamate)
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PEG (PEO)	Polyéthylène glycol (polyoxyde d'éthylène)
PEtOx	Poly(2-éthyl-2-oxazoline)
PiPOx	Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)
PISA	Auto-assemblage induit par polymérisation (polymerization induced self-assembly)
PITSA	Auto-assemblage thermique induit par polymérisation (polymerization induced thermal self-assembly)
PLLA	Poly(L-acide lactique)
PMA	Poly(méthacrylate)
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
PnMOx	Poly(2-alkyl _n -2-oxazoline)
ppm	Parties par million
PPMC	Poly(<i>N</i> -1-phénéthyl- <i>N'</i> -méthylcarbodiimide)
PrPOx	Poly(2-propyl-2-oxazoline)
Pr	Propyle
PS	Polystyrène
PTFE	Poly(tétrafluoroéthylène) (téflon)
q ²	Module du facteur de forme
R ²	Coefficient de régression linéaire
RAFT	Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition/fragmentation (reversible addition fragmentation chain transfer)
Rc	Rayon de cœur
Rg	Rayon de giration
R _H	Rayon hydrodynamique
RI	Indice de réfraction
RITP	Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'iode (reverse iodine transfert polymerization)
RMN (NMR)	Résonance magnétique nucléaire (nuclear magnetic resonance)
rpm	Vitesse de rotation en tour par minute (rotation per minute)

S_0	Niveau d'énergie à l'état fondamental
SANS	Diffusion de neutrons aux petits angles (small angle neutron scattering)
SAXS	Diffraction des rayons X aux petits angles (small angle X-ray scattering)
SEC (GPC)	Chromatographie d'exclusion stérique (size exclusion chromatography or gel permeation chromatography)
SLS	Diffusion statique de la lumière (static light scattering)
S_n	Niveau d'énergie à l'état singulet supérieur n
SP	Spiropyrane
T°C	Température
TA (RT)	Température ambiante (room temperature)
TfO ⁻	Contre-ion triflate
Tg	Température de transition vitreuse (glass transition temperature)
T_n	Niveau d'énergie à l'état triplet n
TsCl ⁻	Chlorure de tosylate
TsO ⁻	Contre-ion tosylate
UV	Ultra-Violet
VOC	Composé organique volatil (volatil organic compound)
WAXS	Diffraction des rayons X aux grands angles (wide angle X-ray scattering)
X ⁻	Contre-ion halogéné
ΔH_m	Enthalpie de fusion (melting enthalpy)
τ	Temps de relaxation
χ_c	Taux de cristallinité

Nomenclature

	Dénominations			
	Chapitre 2	Chapitre 3	Chapitre 4	Chapitre 5
Composés étudiés	Molécules précurseurs			
	7-hydroxy-4-méthylcoumarine	Coumarine (Coum)	Coumarine (Cm)	Coumarine (Cm)
	11-bromoundécanol	C ₁₁	C ₁₁	C ₁₁
	7-(11-hydroxyundécyloxy)4-méthylcoumarine	CoumOH	CmOH	CmOH
	Amorceurs de CROP			
	7-(11-tosyloylundécyloxy)4-méthylcoumarine	CoumOTs	CmTs	CmTs
	7-(11-tosyloylundécyloxy)4-méthylcoumarine dimérisé		CmTs ₂	CmTs ₂
	Tosylate de méthyle		MeOTs	MeOTs
	Macromonomères			
	méthacrylate d'oligo(2-méthyl-2-oxazoline)		MOMox	MOMox
	7-(11-méthacryloylundécyloxy)4-méthylcoumarine		MCm	MCm
	Greffons			
	oligo(2-méthyl-2-oxazoline)		OMox	OMox
	oligo[7-(11-undécyloxy)4-méthylcoumarine]		Cm	Cm
	Copolymères amphiphiles photo-sensibles à base de polyoxazoline			
	Copolymère dibloc photo-sensible	CoumC ₁₁ -POx _n (CoumPOx)	CoumPOx (D _x)	D
	Nanoparticules de copolymères diblocs			ND
	Nanoparticules de copolymères diblocs au cœur photo-dimérisé			NDx
	Copolymère tribloc photo-induit		T _x ^x	T
	Nanoparticules de copolymères triblocs au cœur pré-photodimérisé			NT
	Copolymère hétérogreffé (Statistique)		Cm ^L -OMox ^k Cm-s-OMox	H
	(Dibloc)		Cm- <i>b</i> -OMox	
	Nanoparticules de copolymères hétérogreffés			NH
	Nanoparticules de copolymères hétérogreffés au cœur photo-réticulé			NHx



Introduction générale

Introduction générale

La Nature et les cellules vivantes qui la composent, sont basées sur des biopolymères (ADN, protéines...) jouant un rôle primordial dans la construction et le fonctionnement de mécanismes complexes. Ces biopolymères sont aptes à assurer de telles fonctions par leur structuration leur conférant des propriétés physico-chimiques remarquables et une capacité d'adaptation aux conditions extérieures. En s'inspirant de ces biopolymères, des **polymères adaptatifs** également qualifiés d'« intelligents », capables de moduler leurs propriétés en réponse à une stimulation extérieure sont actuellement en plein essor.

Dans ce contexte, les **polyoxazolines**, de par leur structure dite pseudo-peptidique, sont examinées. Aisément synthétisées, voire commerciales pour certaines, elles présentent une grande variété de fonctionnalisations par le biais du groupement R présent sur le monomère ou encore par les extrémités de chaîne. Selon la nature du groupement R, les polyoxazolines ont des propriétés physiques variables avec, entre autres, un caractère amorphe ou semi-cristallin, la présence d'une thermo-sensibilité ou non, etc. Au sein de cette famille de polymères, le monomère le plus étudié est la 2-méthyl-2-oxazoline (MOx) qui polymérise plus rapidement que les autres oxazolines. La PMOx a un caractère fortement hydrophile, elle est biocompatible et furtive vis-à-vis du système immunitaire. Aussi, il s'avère intéressant d'allier ces POx à des polymères hydrophobes, de manière à former des copolymères amphiphiles capables de s'auto-organiser en milieu aqueux et de conduire à des auto-assemblages au cœur hydrophobe et à la couronne polyoxazoline hydrophile.

Au cours de leur utilisation, ces auto-assemblages peuvent être confrontés à des sollicitations extérieures telles qu'un pH extrême, une température élevée, la présence d'enzymes ou encore à un effet de dilution pouvant conduire à leur déstabilisation. Néanmoins, en rendant ces copolymères amphiphiles adaptatifs, il est possible d'accroître la stabilité de ces nano-objets. L'une des approches communément employée consiste à connecter une fonction photo-sensible à l'entité hydrophobe du copolymère de manière à former des auto-assemblages au cœur photo-stimulable. Ainsi, leur photo-irradiation permet de stabiliser le cœur des nano-objets.

Parmi les chromophores généralement utilisés, la **coumarine** et ses nombreux dérivés, sont largement employés en médecine, cosmétique ou encore dans l'agroalimentaire. La

réversibilité de sa **photo-dimérisation** selon la longueur d'onde d'irradiation utilisée est un attrait important. Ainsi, située au cœur des nano-objets, ces derniers peuvent être stabilisés par photo-dimérisation des coumarines. La position et le nombre de chromophores par chaîne polymère peuvent avoir un impact sur le phénomène photo-induit ayant lieu au cœur de l'objet et visant à figer celui-ci de manière réversible.

De plus, par leur structure aromatique, ces composés cycliques sont d'excellents **agents structurants** pouvant mener à des nano-structurations singulières. Encore jamais étudiée, l'association de copolymères amphiphiles à base de polyoxazoline à ces chromophores pour former des auto-assemblages au cœur stabilisé laisse présager de propriétés particulièrement intéressantes. Aussi, ce travail de thèse investit pour la première fois des polyoxazolines amphiphiles intelligentes possédant des chromophores coumarine. Pour cela, trois architectures ont été élaborées à partir de trois éléments constitutifs communs : une chaîne polyoxazoline hydrophile, une chaîne aliphatique en C₁₁ hydrophobe et un groupement photo-sensible coumarine, 7-hydroxy-4-méthylcoumarine. L'association inédite de ces trois entités structurales conduisant à des architectures variées a pour but d'évaluer l'influence de l'architecture macromoléculaire de ces copolymères amphiphiles sur leurs propriétés d'auto-assemblage en terme de morphologie mais également de photo-réponse, de stabilité des nano-objets formés et de capacité à piéger des molécules spécifiques.

Après un **premier chapitre** bibliographique visant à rappeler les notions importantes abordées au cours de cette étude, notamment la photo-activité des coumarines et les polyoxazolines photo-sensibles, le **deuxième chapitre** s'intéressera aux copolymères amphiphiles linéaires diblocs possédant un seul groupement coumarine en extrémité de chaîne. Ces derniers sont capables de s'auto-organiser en milieu aqueux de façon à conduire à des assemblages au cœur photo-dimérisable par stimulation sous UV des unités coumarine. Le **troisième chapitre**, quant à lui, se focalisera sur la synthèse et l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles linéaires triblocs obtenus par pré-dimérisation des groupements coumarine. Dans le **quatrième chapitre**, des copolymères hétérogreffés où l'amphiphilie repose sur l'association de greffons hydrophiles polyoxazoline et de greffons hydrophobes aliphatiques porteurs d'unités terminales coumarine seront abordés. De par le nombre d'unités coumarine par chaîne polymère et leur position, leur auto-assemblage conduit à des nano-objets au cœur photo-réticulable. Enfin, le **cinquième chapitre** consiste à examiner le comportement des nano-objets obtenus à partir des précédents copolymères amphiphiles après insolation sous UV.

Cela est, à notre connaissance, la première étude comparative de copolymères amphiphiles diblocs, triblocs et hétérogreffés en terme de photo-stabilité des nanoparticules, de photo-réversibilité du cœur des nanoparticules et de piégeage de molécules modèles.

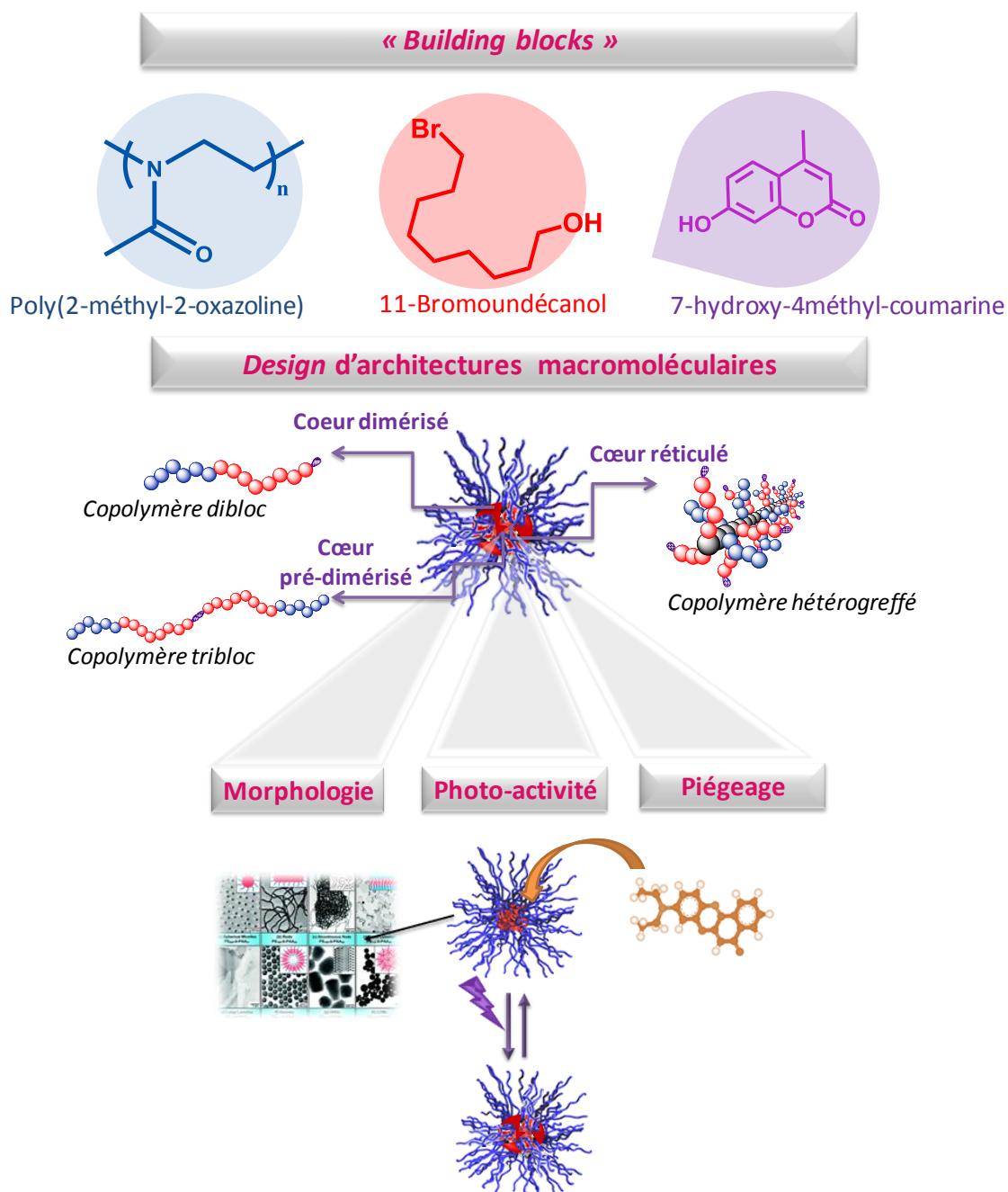
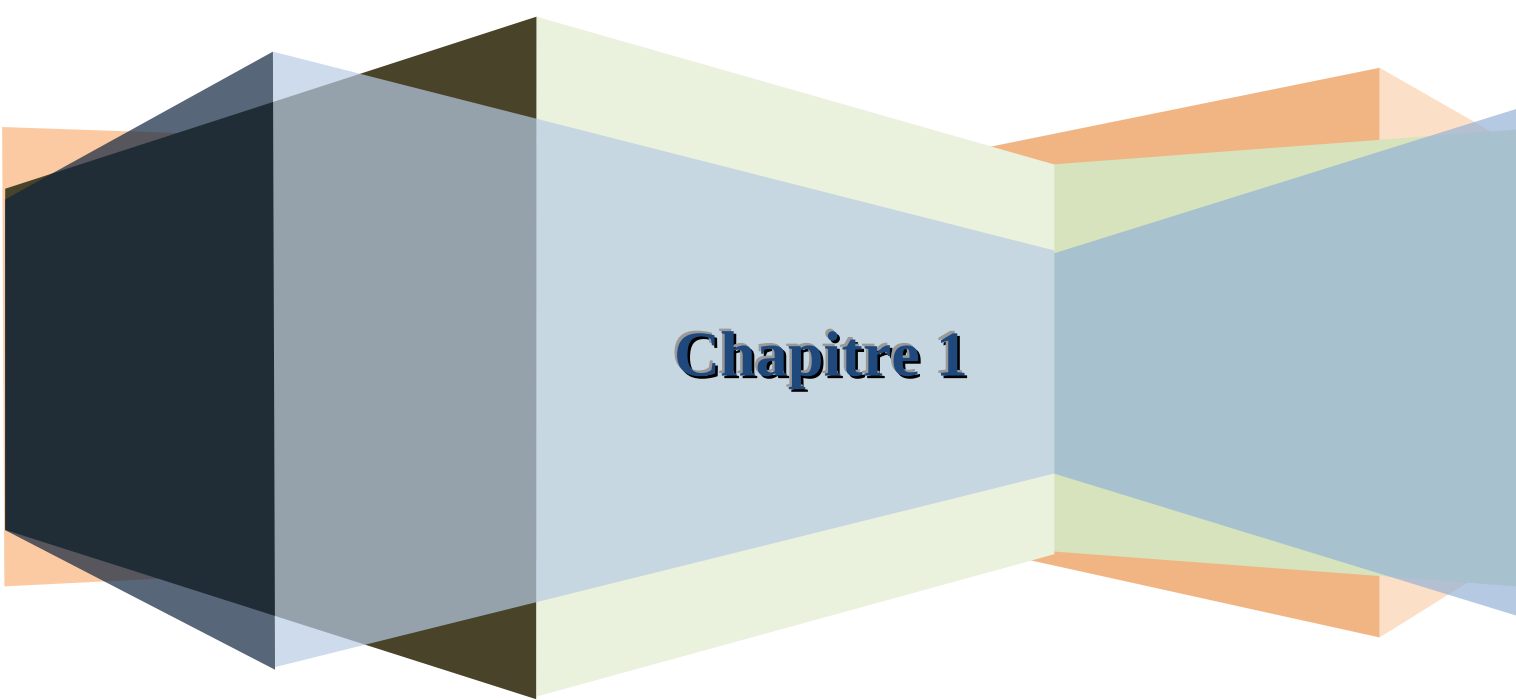


Figure 0-1 : Schéma récapitulatif de l'étude menée



Chapitre 1

Chapitre 1 : Généralités sur les polyoxazolines et leur photo-activation

1. Introduction

Les copolymères amphiphiles sont reconnus pour leur capacité à s'auto-assembler spontanément en solution (par exemple aqueuse) ce qui ouvre la voie à de nombreuses applications. Parmi les polymères hydrophiles employés dans ces copolymères amphiphiles, les polyoxazolines représentent des polymères particulièrement intéressants en raison de leurs multiples et faciles fonctionnalisations. Celles-ci permettent également d'accéder à des nano-objets de tailles et de morphologies variées parfaitement définies. Cependant, au cours de leur utilisation, ces nano-objets sont exposés à des conditions extérieures pouvant conduire à leur déstabilisation voire leur destruction. Afin de parer à cela, une nouvelle génération de matériaux a fait son apparition ces dernières années : les polymères stimulables. Cette nouvelle gamme de polymère dits « intelligents » présente de nombreux intérêts et ce chapitre permettra de mettre en avant leurs réels atouts, notamment ceux des polymères photo-intelligents. L'originalité que représente l'auto-assemblage de structures amphiphiles intelligentes à base de polyoxazoline associées à des chromophores photo-réactifs, coumarines, sera ainsi mise en évidence.

2. Copolymères amphiphiles et auto-organisation en solution

Le terme amphiphile, dont les racines étymologiques grecques du préfixe "*amphi*" et du suffixe "*phile*" signifient respectivement "double" et "qui aime", a été introduit il y a plus d'une cinquantaine d'années par Paul Winsor.¹ Les molécules amphiphiles peuvent être classées en *non ioniques* ou bien *ioniques* possédant alors une charge négative ou positive. La dernière catégorie correspond aux amphiphiles zwitterioniques pour lesquels deux charges opposées se compensent.

2.1. Généralités sur les polymères amphiphiles

De manière plus générale, un polymère est dit amphiphile lorsque sa structure comprend deux types de segments, l'un hydrophile et l'autre hydrophobe, liés entre eux de manière covalente. La coexistence de ces deux parties antagonistes au sein d'une même entité

lui confère des propriétés uniques en solution à savoir la possibilité de stabiliser des émulsions, de modifier une activité de surface, d'influer sur des phénomènes d'adsorption aux interfaces² ou encore la capacité à s'auto-assembler³ sous forme d'agrégats. L'engouement pour les copolymères amphiphiles a débuté dans les années 50 avec les premiers travaux réalisés par Strauss et *al.*^{4, 5} portant sur l'auto-assemblage de copolymères obtenus par quaternisation du poly(2-vinylpyridine) par des bromures d'alkyles. Ils ont permis de mieux comprendre les propriétés des tensio-actifs micellaires. Ils sont également les premiers à avoir démontré la capacité de ces copolymères à solubiliser des molécules hydrophobes. Depuis les années 90, l'intérêt des copolymères amphiphiles^{6, 7} n'a cessé de s'intensifier au vu des nombreuses applications dans l'industrie alimentaire, la cosmétique, la détergence, les peintures, les textiles, le biomédical, etc.⁸⁻¹⁴ Un facteur essentiel¹⁵ à leur utilisation dans de telles applications réside dans le contrôle de leur structure en terme d'architecture, de composition, de masse molaire et de balance hydrophile/hydrophobe (Figure 1-1).

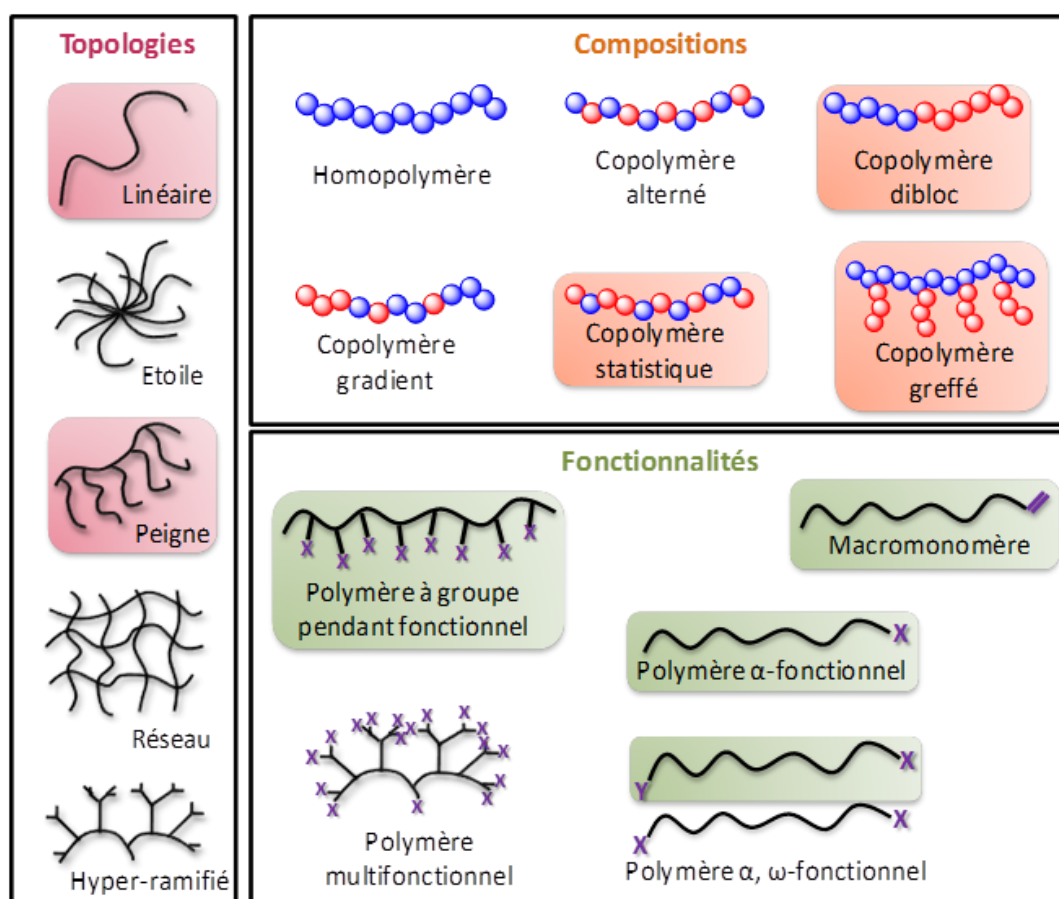


Figure 1-1 : Variété des architectures macromoléculaires.

Un copolymère amphiphile est synthétisé par copolymérisation d'au moins deux types de monomères, chimiquement différents, appelés co-monomères. Communément, comme

illustrée dans la Figure 1-1, la structuration des copolymères^{16, 17} donne accès à des topologies variées selon les voies de synthèse choisies. Ainsi, ces architectures vont de la **chaîne linéaire** à des architectures plus complexes telles que les **polymères ramifiés** ou **branchés**. Un point de ramification est un point d'une chaîne polymère sur lequel sont fixées une ou plusieurs chaînes latérales également appelées branches ou chaînes pendantes. Cette chaîne latérale est dite greffon lorsque sa composition diffère de celle de la chaîne principale, terme choisi en référence aux greffes botaniques. Lorsque ces greffons sont rattachés à une seule et même chaîne principale, les copolymères sont dits **greffés**. Parmi ces architectures branchées, se trouvent également les **copolymères en étoile** caractérisés par la présence d'un seul point de ramification, c'est-à-dire constitués de chaînes réunies en un cœur commun, le pseudo-centre. A cela s'ajoutent les **copolymères hyperbranchés** et **réseaux** qui sont des polymères tridimensionnels hautement ramifiés, constitués de chaînes reliées les unes aux autres par différents cœurs communs et ayant un grand nombre de groupements terminaux. En outre, ces extrémités de chaîne et de greffons peuvent être fonctionnalisées par des groupements réactionnels comme des fonctions polymérisables (macromonomères), des sites d'amorçage (macro-amorceurs), de couplage etc. multipliant ainsi les structures possibles et par la même leurs domaines d'applications. Cette variété de fonctionnalisations s'avère être particulièrement intéressante dans ce travail où des copolymères d'architectures variées ont été élaborés grâce à l'utilisation de macromonomères.

Par ailleurs, l'un des aspects attrayants des copolymères réside dans leurs propriétés physico-chimiques et mécaniques, modulables par rapport à celles des homopolymères correspondants. En effet, selon la répartition des co-monomères le long des chaînes macromoléculaires, les copolymères peuvent être classés en deux catégories : ceux à structure homogène et ceux à structure hétérogène. Les **copolymères homogènes** comportent une seule phase amorphe et ne forment pas de microstructures. Ils présentent le plus souvent une seule température de transition vitreuse (T_g), qui est intermédiaire à celles des homopolymères correspondants. Ce type de copolymère peut être **statistique**, c'est-à-dire constitué de macromolécules dans lesquelles la distribution des unités monomères obéit à des lois statistiques. Si ces lois sont connues et contrôlées, elles conduisent à des copolymères dits à **gradients** ou bien **alternés**. Dans le second cas, les copolymères sont **hétérogènes** et présentent en général au moins deux phases distinctes en formant donc des microstructures. Il est ainsi possible d'observer deux températures de transition vitreuse (dans la mesure où il y a une ségrégation de phases entre les parties hydrophile et hydrophobe), proches de celles des

homopolymères correspondants. Ces copolymères peuvent être à **blocs** (dibloc, tribloc ou multibloc) et ramifiés comme dans le cas des polymères en étoile. En revanche, lorsqu'au sein de ces structures hétérogènes, les blocs sont connectés latéralement à la chaîne principale, de composition différente, les copolymères sont dits à greffons si ces derniers sont identiques entre eux ou **hétérogreffés** s'ils sont de natures différentes. **Au cours de cette étude, les copolymères rencontrés arborent des architectures linéaires statistiques, à blocs** (diblocs ou triblocs) **et hétérogreffés** (statistiques et diblocs) comme encadrés sur la Figure 1-1.

2.2. Auto-organisation des copolymères amphiphiles

Selon leurs architectures, les copolymères amphiphiles sont capables en solution de s'auto-organiser en une grande variété de morphologies (Figure 1-2).¹⁸ Le principe d'auto-assemblage est basé sur le fait qu'en présence d'un solvant pouvant solvater uniquement l'un des deux blocs, l'entropie qui privilégie la solubilisation des blocs ne pourra plus compenser le coût énergétique répulsif entre les blocs insolubles et le solvant.¹⁹ Ainsi, ces blocs insolubles vont s'agréger de manière à minimiser leur interface avec le solvant et conduire à l'auto-association des chaînes amphiphiles. Cet auto-assemblage dépend de plusieurs paramètres²⁰ à savoir la concentration, la température et la taille des blocs. En effet, en-dessous d'une certaine concentration appelée **Concentration d'Agrégation Critique** (C.A.C.), le copolymère amphiphile est présent sous forme d'unimères correspondants à des entités libres dans la solution (Figure 1-2).²¹ Au-dessus de cette C.A.C., les chaînes de copolymère s'auto-associent en agrégats de copolymères qui sont des entités constituées de plusieurs unimères. Généralement, les valeurs de C.A.C. pour les agrégats de copolymères amphiphiles sont de l'ordre de 10^{-6} - 10^{-7} mol.L⁻¹, plus faibles que les C.A.C. obtenues pour des tensioactifs moléculaires²² qui sont de l'ordre de 10^{-3} - 10^{-4} mol.L⁻¹. Par rapport aux molécules de faible poids moléculaire, les agrégats micro-phasés formés par les copolymères amphiphiles comme les structures hétérogreffées sont thermodynamiquement et cinétiquement plus stables. Ces systèmes non dynamiques sont dits « *gelés* ». ²³ De plus, en augmentant la concentration en polymères au-delà d'une concentration appelée **Concentration Critique de Gel** (C.G.C.), les agrégats s'auto-organisent à leur tour, formant ainsi un réseau gélifié d'agrégats ordonnés tels que des systèmes lamellaires, cylindriques, sphériques ou encore gyroïdaux.

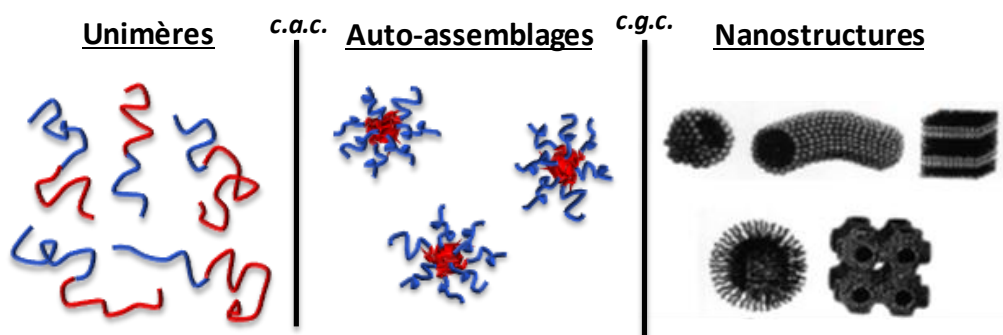


Figure 1-2 : Auto-assemblages en solution de copolymères amphiphiles.²⁴

La formation des agrégats en solution est dirigée par deux forces opposées. La première est une force d'attraction entre les blocs insolubles tandis que la seconde est une force répulsive entre les blocs solubles dans le solvant.²⁵ La balance entre ces deux forces dépend de trois paramètres : l'étirement des chaînes de polymère formant le cœur du nano-objet, la tension de surface à l'interface cœur/solvant et les interactions entre les chaînes de polymère composant la couronne. Dans les solvants polaires comme l'eau, la structure comporte un cœur insoluble formé par les blocs hydrophobes du copolymère et une couronne soluble constituée des blocs hydrophiles. L'équilibre entre ces deux forces dirige la taille et la morphologie des agrégats. Selon Israelachvili et *al.*,²⁶ il est possible de prédire la morphologie des agrégations en solution. En effet, le **paramètre d'empilement de l'agrégation p** permet, par des considérations géométriques, de déduire le type d'assemblage le plus compact c'est-à-dire le plus favorable. Ce paramètre dépend de l'aire optimale de la partie hydrophile a , de la longueur de la chaîne critique l_c et du volume occupé par la chaîne hydrophobe v . Il est défini par l'équation : $p = \frac{v}{alc}$. Si $p \leq 1/3$, les agrégats sont dits **sphériques**, si $1/3 \leq p \leq 1/2$ **cylindriques**, si $1/2 \leq p \leq 1$ **vésiculaires** ou **tubulaires** et enfin si $p \approx 1$, ils seront de type **lamellaire**.

2.3. Techniques de mise en solution et de caractérisation des auto-assemblages

De nombreuses méthodes de préparation des auto-assemblages en solution de copolymères amphiphiles ont déjà été développées et sont résumées dans la Figure 1-3. Il existe principalement deux grandes méthodes.³ La première, par **ajout direct**, est généralement utilisée dans le cas de copolymères solubles dans l'eau tandis que la seconde, appropriée pour des copolymères insolubles dans l'eau, nécessite l'utilisation d'un deuxième solvant de type organique nommé **co-solvant** (DMF, DMSO, acétone...). La méthode d'ajout

direct regroupe deux procédés qui sont la **dissolution directe d'un copolymère**²⁷ et la **réhydratation d'un film de polymère**. Le choix se fait en fonction de l'affinité avec l'eau.

Pour des copolymères faiblement hydrosolubles, présentant une faible affinité avec l'eau, la réhydratation d'un film polymère sera plus adéquate. Celle-ci consiste à dissoudre un film polymère, préalablement obtenu par évaporation d'une solution de polymère dans un solvant organique volatil (chloroforme, acétone...), par l'ajout goutte-à-goutte d'eau sous agitation. Dans le cas de copolymères présentant une grande affinité avec l'eau, ces derniers sont directement solubilisés dans une solution aqueuse et laissés sous agitation jusqu'à atteindre l'équilibre thermodynamique et donc la formation des agrégats. Parmi les différentes structures étudiées par la suite, **les copolymères élaborés aux chapitres 2 et 3 ont été auto-assemblés grâce à ce procédé**.

La seconde méthode de préparation, dite des co-solvants, employée pour des copolymères insolubles dans l'eau comprend trois procédés selon le co-solvant utilisé. En effet, selon la solubilité du copolymère dans les solvants organiques, le co-solvant sera plus ou moins miscible dans l'eau, ce qui dicte le choix de la méthode. Ainsi, pour des co-solvants volatils et immiscibles à l'eau, le procédé par **émulsion huile dans eau (O/W)** est le plus indiqué. Dans ce cas, le copolymère est dissout dans le solvant organique avant d'être ajouté à de l'eau sous forte agitation pour enfin obtenir des agrégats en milieu aqueux après évaporation du solvant organique. Si en revanche le co-solvant utilisé est miscible à l'eau, deux approches peuvent être utilisées:

- La première, par **nano-précipitation**, convient à des solvants organiques volatils. Elle consiste, dans un premier temps, à dissoudre le copolymère dans le co-solvant organique puis à ajouter cette solution organique goutte-à-goutte dans l'eau sous agitation pour enfin obtenir une solution aqueuse contenant les agrégats après évaporation du solvant organique. **Dans le chapitre 4, les copolymères hétérogreffés ont été auto-assemblés par nano-précipitation normale**. Une alternative à cette nano-précipitation dite normale, ou directe, consiste à faire l'inverse, c'est-à-dire ajouter goutte-à-goutte l'eau à la solution organique avant de laisser celle-ci s'évaporer, on parle alors de **nano-précipitation inverse**,
- La seconde méthode, utilisant un co-solvant miscible à l'eau mais qui n'est pas ou peu volatil, est le procédé dit de **dialyse** et se fait en deux étapes. Dans ce cas, le co-solvant ne peut être éliminé par simple évaporation comme précédemment. De ce fait, après dissolution

dans le solvant organique, ce dernier est lentement remplacé par l'eau *via* un procédé de dialyse afin d'obtenir des agrégats en milieux aqueux.

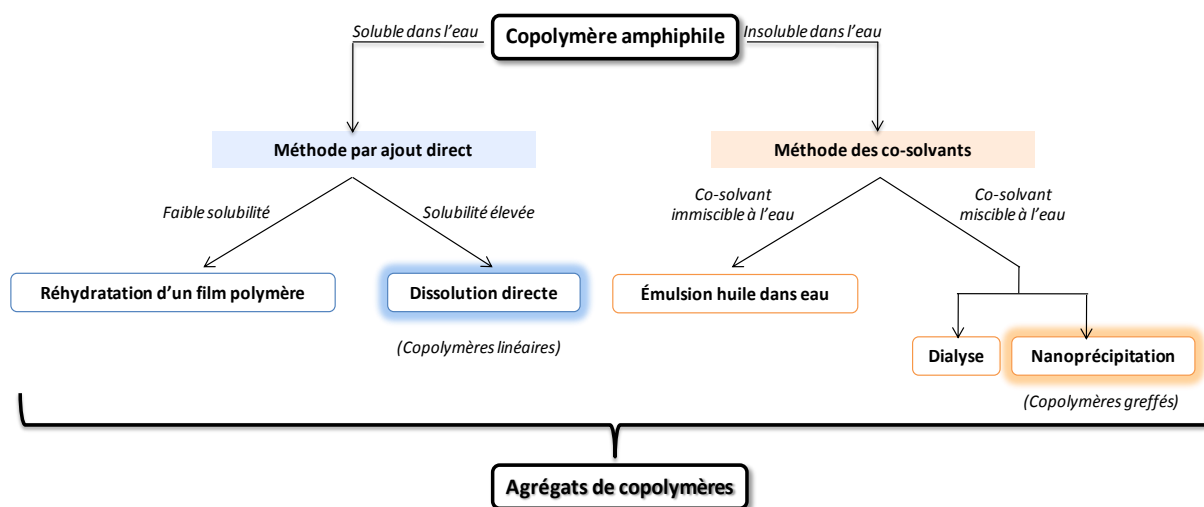


Figure 1-3 : Techniques de mise en solution des copolymères amphiphiles.

Les agrégats de copolymères amphiphiles obtenus par les différentes techniques de mise en solution précédemment décrites, sont caractérisés par des paramètres structuraux appelés **paramètres d'agrégation**. Parmi ceux-ci, se trouvent le **nombre d'agrégation** (N_{ag}), le **rayon hydrodynamique** (R_H), le **rayon de giration** (R_g), le **rayon de cœur** (R_c) de l'agrégat ainsi que l'**épaisseur de la couronne** (L) qui sont représentés sur la Figure 1-4. N_{ag} correspond au nombre de chaînes polymères présentes dans l'agrégat. R_H se réfère à la taille effective de cet agrégat, détectée par son mouvement brownien et R_g à la moyenne quadratique de la distance des unimères par rapport au centre de gravité de chacun des agrégats. R_c est le rayon de la sphère occupée par les chaînes hydrophobes constituant le cœur de l'agrégat tandis que L est associé à l'épaisseur de la couronne composée des chaînes hydrophiles. La somme de R_c et L donne la valeur du rayon de l'agrégat R_H . D'autres paramètres caractéristiques sont la **concentration** et la **température d'agrégation critique** (**C.A.C.** et **C.A.T.**). Ils correspondent à la concentration et la température auxquelles les agrégats se forment. La **masse molaire moyenne en poids** de l'agrégat (M_w), la morphologie de l'agrégat qui peut être, comme décrit plus haut, sphérique, cylindrique ou lamellaire, le **second coefficient du viriel** (A_2) traduisant les interactions macromolécule-solvant, la polydispersité en taille ainsi que la viscosité intrinsèque permettent également de caractériser les auto-assemblages des copolymères amphiphiles.

La détermination de ces paramètres fait appel à différentes techniques d'analyse : la microscopie, la spectroscopie, la diffusion de la lumière, la chromatographie, la viscosimétrie et la tensiométrie. La Figure 1-4 regroupe les techniques d'analyse et les paramètres qu'elles permettent de déterminer.²⁸

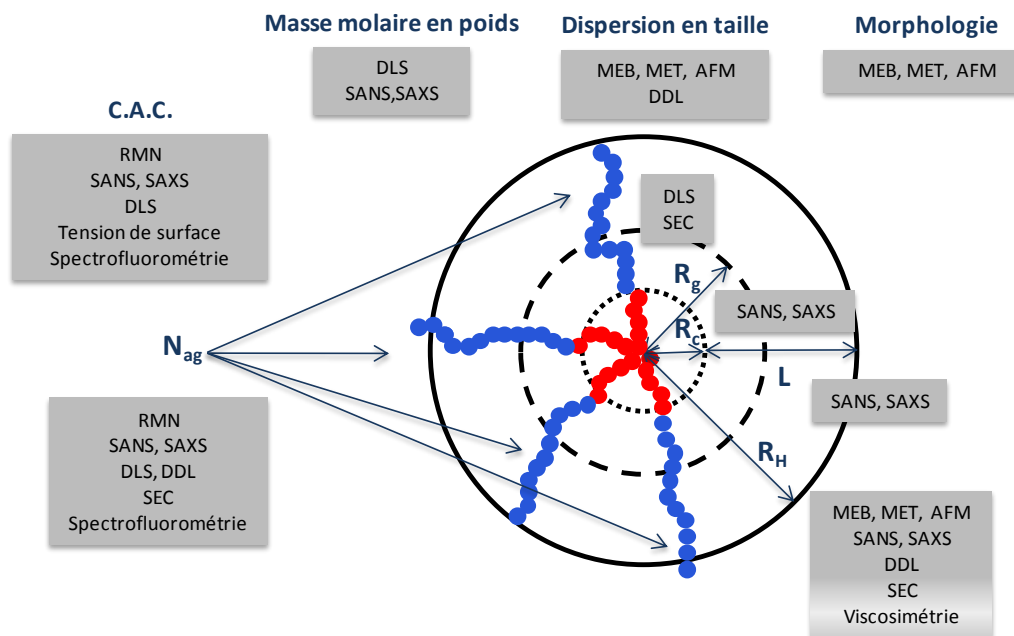


Figure 1-4 : Paramètres caractéristiques des agrégats et techniques de caractérisation associées.

Cette structuration à l'échelle nanométrique fait des copolymères amphiphiles des outils de choix dans de nombreux domaines d'application. Cependant, dans la plupart de ces utilisations, ces nanostructures sont soumises à des changements environnementaux pouvant altérer ces organisations et influencer sur leurs propriétés. Pour parer à cela, il est possible de rendre ces **polymères adaptatifs**, c'est-à-dire capables de s'adapter à l'environnement auquel ils seront exposés au cours de leur application. De tels polymères sont alors qualifiés d'**intelligents**.

3. Les polymères stimulables

3.1. Généralités

Le monde vivant qui nous entoure repose en partie sur des systèmes polymères.²⁹ En effet, en prenant l'exemple des cellules vivantes, unités biologiques structurales et fonctionnelles fondamentales de tous les êtres vivants, celles-ci sont essentiellement constituées de polymères de type protéine, carbohydrate et acide nucléique. La nature les fait intervenir dans des mécanismes cellulaires hautement complexes.³⁰ L'intérêt de ces

biopolymères réside dans leur capacité à répondre à des stimuli externes (pH, force ionique...). En s'inspirant de ces phénomènes naturels, les scientifiques ont appliqué aux polymères cette capacité adaptative, on parle de **biomimétisme**. Une nouvelle génération de matériaux dits « intelligents » a ainsi été développée. Ces polymères, à l'origine appelés « **stimuli-sensibles** » portent le nom « d'intelligents » par analogie aux bio-polymères.³¹ Les matériaux intelligents ont la capacité de répondre de façon rapide et réversible à une faible sollicitation extérieure en modifiant considérablement leurs propriétés physiques. Cette réponse, causée par un changement configurationnel de leur structure et par une transformation chimique, est due aux interactions fortement coopératives. Malgré la faiblesse des interactions ayant lieu au sein de chaque unité monomère, telles que des liaisons hydrogène ou des forces ioniques, la somme de celles-ci sur des dizaines voire des centaines d'unités de répétition fournit des forces motrices suffisantes pour conduire à un changement configurationnel du système entier. Ainsi, des changements nanométriques se répercutent à l'échelle microscopique en déclenchant des modifications de phase rapides telles que le passage d'un état hydrophile à hydrophobe mais également à l'échelle macroscopique telles que la formation d'un précipité à partir d'une solution. Un point important de ces polymères intelligents est le caractère réversible des changements macroscopiques qu'ils peuvent subir avec un retour à leur état initial.³⁰

La variation de l'environnement extérieur pouvant être de différentes natures, les polymères stimulables peuvent être classés en fonction du stimulus auquel ils sont sensibles. Certains d'entre eux répondant à deux ou plusieurs stimuli, une autre approche consiste à les catégoriser en fonction de leur forme physique : les chaînes libres en solution, les chaînes greffées sur une surface, les gels réticulés de manière covalente ou réversible.

Comme l'illustre la Figure 1-5, trois grands groupes de stimuli externes peuvent être dénombrés : ceux d'origine **physique** avec une variation de température, une exposition à un champ électrique, magnétique ou encore un rayonnement lumineux ; **chimique** tel un changement de pH, de composition, de concentration ou l'utilisation d'ions spécifiques ; et enfin **biochimique** par la mise en présence d'enzyme, d'antigène, de glucose, etc.³²⁻³⁸

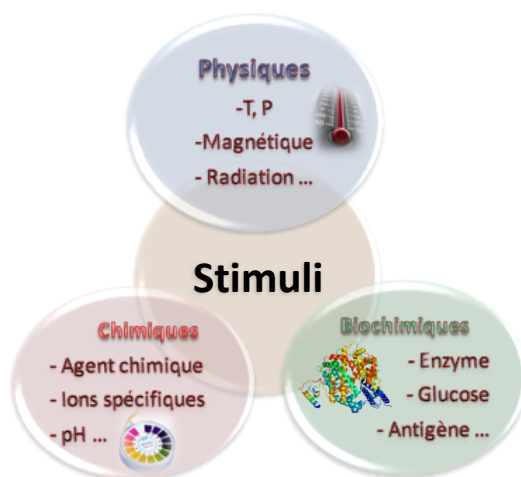


Figure 1-5 : Familles de stimuli externes applicables aux polymères.

Les polymères stimulables peuvent être utilisés sous différentes formes telles que les hydrogels, les micelles, les dendrimères ou les interfaces modifiées ce qui donne accès à un vaste champ d'applications.³⁹⁻⁴⁷ Ces matériaux intelligents sont utilisés en bio-interfaces (imitation de surface naturelle, mouillabilité ou adhésion), pour le transport de molécules et d'ions, pour des systèmes de relargage et de libération contrôlée de principes actifs, pour des revêtements intelligents, en *tissue engineering*, pour le diagnostic, pour des systèmes optiques et microélectroniques intelligents, etc.^{30, 48-52}

L'étude présentée par la suite porte sur l'auto-assemblage de copolymères en solution, l'approche développée ici se focalise sur les **nanoparticules stimulables**. Ces particules colloïdales dites intelligentes représentent une classe de matériaux stimulables en plein essor. L'atout majeur de ces systèmes réside dans leur capacité à stabiliser, déstabiliser ou encore inverser des dispersions colloïdales (émulsions, mousses et suspensions), ce qui s'avère particulièrement utile en catalyse, *drug delivery* et bioséparation comme illustré sur la Figure 1-6.

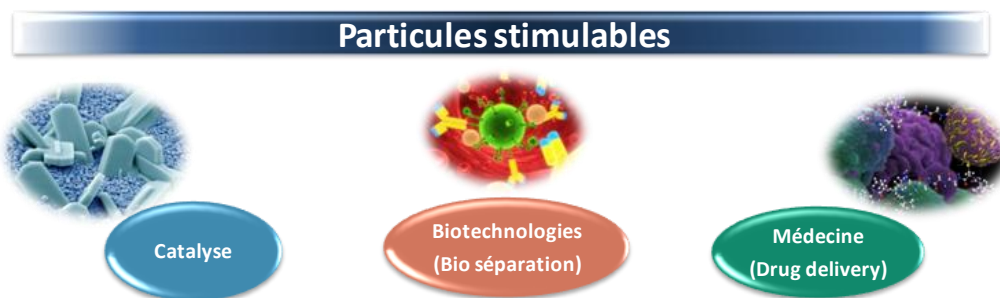


Figure 1-6 : Domaines d'utilisation des particules stimulables.

Ces particules stimulables ouvrent de nouvelles voies en **catalyse** chimique ou biochimique puisqu'elles donnent accès à une catalyse contrôlée et modulable en offrant la possibilité d'exposer ou de dissimuler des fonctions ou des nanoparticules fonctionnelles sur des surfaces restructurables. Par exemple, Ballauff et *al.*, ont décrit des systèmes catalytiques commutables obtenus à partir de nanoparticules métalliques enrobées dans un polymère thermosensible, lui-même greffé à la surface d'une plus grande particule colloïdale. Ce caractère thermo-dépendant engendrant un gonflement ou un rétrécissement de la couronne, a permis d'exposer et dissimuler alternativement les particules d'argent sur la surface colloïdale, modulant ainsi l'activité catalytique de la particule composite.^{53, 54}

Ces nanoparticules stimulables représentent également un grand intérêt en **bio-séparation**. En effet, tous les procédés de bio-séparation incluent trois étapes : la séparation préférentielle de la substance cible (impuretés entre deux phases), la séparation mécanique des phases et la récupération de la substance cible de la phase enrichie. Depuis les années 1980, à l'initiative d'Hoffman⁵⁵ et Cussler,⁵⁶ les polymères intelligents ont été utilisés en bio-séparation. L'un des procédés majeurs de bio-séparation est la précipitation par affinité.⁵⁷ Elle est basée sur l'utilisation de copolymères intelligents possédant des ligands spécifiques au ciblage de protéines. Les ligands forment tout d'abord un complexe conjugué avec la protéine cible, déclenchant ainsi une séparation de phase en rendant le squelette du polymère insoluble et entraînant, de ce fait, sa précipitation. L'étape cruciale réside en la récupération de la protéine cible. Grâce au caractère intelligent, celle-ci peut être dissociée du macro-ligand et celui-ci régénéré en son état initial. En effet, en utilisant par exemple, un polymère thermosensible tel que le poly(oxyde d'éthylène-co-oxyde de propylène), chauffer la phase contenant la cible permet de précipiter le macro-ligand laissant ainsi la protéine cible purifiée dans le surnageant.

Enfin, le domaine majeur et en pleine expansion d'utilisation de ces particules intelligentes est le **drug delivery**. Un système polymère de *drug delivery* intelligent est capable de « survivre » *in vivo*, de délivrer le principe actif qu'il transporte et de le relarguer efficacement au niveau des cellules cibles selon les cinétiques de libération souhaitées. Parmi les différentes approches utilisées pour améliorer l'efficacité des chimiothérapies, la plus porteuse repose sur ces systèmes de relargage intelligents qui peuvent répondre à des stimuli présents dans des organismes cellulaires tels qu'un pH acide, une concentration en glutathionne ou la présence d'enzymes spécifiques. Par ailleurs, à titre d'exemple, Skirtach et *al.* ont démontré le ciblage sélectif intracellulaire de microcapsules à couronne assemblée couche par couche (*Layer-by-*

Layer, LbL) à l'aide de lumière laser. Kreft et *al.* ont démontré le suivi de microcapsules LbL internalisées au sein de cellules cibles grâce à l'encapsulation de colorants sensibles au pH. Nagasaki et *al.* ont montré que la stabilité (chimique et mécanique) des nanoparticules pouvait être régulée par des systèmes intelligents prolongeant ainsi le temps de circulation *in vivo* et améliorant l'efficacité de relargage.⁵⁸⁻⁶⁴

Pour de telles applications, les nanoparticules nécessitent d'être stabilisées. Cette stabilisation peut être induite par un changement configurationnel. Cette modification configurationnelle et cette capacité à stabiliser des nano-objets, toutes deux de manières contrôlées, sont les atouts majeurs intrinsèques aux particules stimulables. Les nanoparticules intelligentes peuvent être typiquement représentées par une organisation cœur/couronne (micelles, vésicules) obtenue par auto-assemblage de copolymères amphiphiles fonctionnels ou non, organiques ou inorganiques. Le **changement configurationnel** s'appuie sur leur caractère intelligent permettant de modifier leurs architectures en fonction de la stimulation à laquelle elles sont soumises. La Figure 1-7 regroupe les différents changements structuraux pouvant avoir lieu pour des particules stimulables lorsqu'elles sont exposées à une sollicitation extérieure.⁶⁵⁻⁶⁹ Cette stimulation extérieure des structures auto-assemblées peut induire leur réversible ou irréversible formation/désintégration (Figure 1-7 a), coalescence (Figure 1-7 b), agrégation/adsorption (Figure 1-7 c) ou encore former des cœurs (Figure 1-7 d) ou des couronnes (Figure 1-7 e) réticulés voire les deux. L'application d'un stimulus externe peut également entraîner un changement de taille des agrégats et/ou d'architecture, de structure et de morphologie. Par exemple, il est possible de transformer une micelle en polymersome en milieu aqueux, d'inter-changer les blocs constitutifs respectivement le cœur et la couronne (Figure 1-7 f), d'obtenir des morphologies caractéristiques type micelle de Janus ou encore d'influer sur la perméabilité de la membrane d'une vésicule grâce à une sensibilité au pH permettant de réguler le transport de molécules hydrophiles.

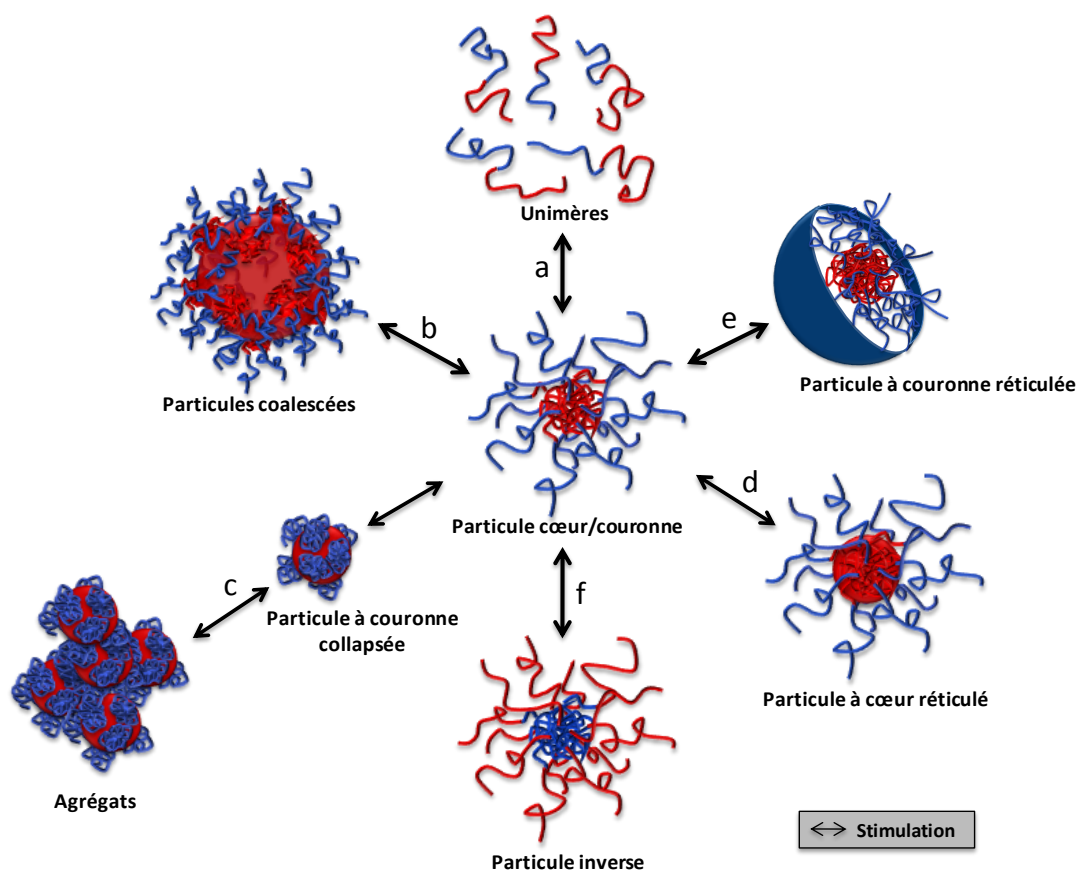


Figure 1-7 : Modifications et changements de phase des particules stimulables entraînés par une sollicitation extérieure.⁴⁹

Notre étude se focalisera sur les particules stimulables dont le cœur est capable de photo-réticuler lorsqu'il est irradié sous rayonnements UV. L'intérêt d'une telle réticulation rejoint le second grand domaine d'utilisation des particules stimulables à savoir **la stabilisation de suspensions colloïdales**. En effet, grâce à la formation d'une barrière mécanique au niveau de l'interface particule/phase liquide, la coalescence des phases dispersées est empêchée. Cela évite leur perturbation et stabilise des émulsions ou des dispersions. Ainsi, les systèmes amphiphiles développés au cours de ces travaux ont été rendus intelligents afin d'influer sur la stabilité des auto-assemblages formés en réticulant de manière réversible le cœur de ces nanoparticules, ce qui est utile pour une éventuelle application en *drug delivery*. Parmi les nombreux stimuli disponibles répertoriés précédemment, la photo-stimulation, stimulus d'origine physique, s'est avérée être le plus intéressant.

3.2. Photo-stimulation de polymères

La photo-stimulation repose sur l'exposition d'un polymère photo-sensible à une irradiation lumineuse extérieure. L'utilisation de la lumière afin de contrôler la formation, la structuration et les propriétés bio-chimio-mécaniques des matériaux polymères représente une des méthodes les plus efficaces, les plus rapides et les plus simples d'utilisation. L'emploi de la lumière est fréquent dans de nombreux domaines d'application allant de la photo-lithographie à des utilisations *in vivo* et ce, aussi bien pour l'évaluation fondamentale des relations formation-structure-propriétés que pour la dégradation, la fonctionnalisation et la réticulation de polymères.⁷⁰

3.2.a) Généralités sur les ultra-violets

L'irradiation lumineuse employée en photo-stimulation appartient au domaine des ultra-violets (UV). Comme son nom l'indique, du latin « *ultra* » signifiant « *au-delà* », le rayonnement UV est un rayonnement électromagnétique caractérisé par une longueur d'onde comprise entre le domaine du visible (longueurs d'onde élevées où le violet correspond à la plus courte) et celui des rayons X (faibles longueurs d'onde), s'étalant de 400 à 40 nm comme le montre la Figure 1-8.

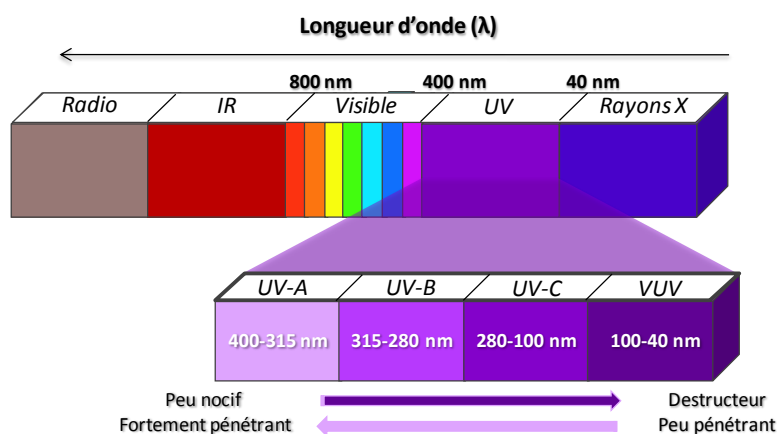


Figure 1-8 : Spectre RX-UV-visible-IR et gamme λ .

Les UV peuvent être subdivisés en quatre domaines : les UV-A dits proches, les UV-B et UV-C dits lointains et les UV-V dits extrêmes. Les UV-A possèdent une longueur d'onde proche de celle du visible. Ils sont peu nocifs mais fortement pénétrants alors que les UV-B et C ayant une courte longueur d'onde, sont peu pénétrants mais très nocifs. C'est pourquoi, sachant que 5% de l'énergie solaire est émise sous forme d'UV, leur longueur d'onde étant

suffisamment pénétrante pour traverser la couche d'ozone, 95% des UV reçus à la surface de la Terre sont des UV-A. Généralement connus pour être la cause du bronzage mais classés cancérigènes de classe 1, à haute dose, les UV sont nocifs pour la santé et peuvent : i) engendrer des tumeurs ou cancers cutanés (phénomène appelé photo-carcinogénèse) tel que le mélanome, ii) provoquer un vieillissement prématuré de la peau (rides), iii) des brûlures (coups de soleil) ou encore iv) des cataractes. En effet, les photons émis par le rayonnement sont absorbés par les bases nucléiques constituant l'ADN ce qui provoque la dimérisation de certaines d'entre elles, telles que la thymine induisant alors une potentielle rupture de la chaîne nucléique de telle sorte que sa réplication ultérieure est altérée voire inhibée. Néanmoins, les UV sont nécessaires à de faibles doses régulières notamment pour la synthèse de la vitamine D. Ils sont également capables de dégrader de nombreuses molécules organiques en suspension dans l'air ou dans les eaux superficielles, participant ainsi à la destruction (photo-dégradation) de certains polluants ou molécules odorantes mais aussi à la dépollution photochimique (ozone troposphérique). Les UV servent par ailleurs à traiter plusieurs maladies, dont le rachitisme, le psoriasis ou encore l'eczéma.

Parmi les nombreux stimuli disponibles, la photo-stimulation représente une option particulièrement intéressante pour un large champ d'application grâce aux multiples avantages qu'elle offre. En effet, les photo-procédés sont capables d'apporter l'énergie nécessaire au système à stimuler en des temps relativement courts mais surtout à température ambiante puisque l'énergie d'une mole de photons à 365 nm est 130 fois supérieure à l'énergie nécessaire pour activer une réaction à 25 °C. A 254 nm, celle-ci est 190 fois supérieure. Ainsi, l'absorption de photons à température ambiante est suffisante pour franchir la barrière d'activation de nombreux systèmes et donne de ce fait accès à une large gamme de photo-réactions. De plus, à la différence des autres procédés de stimulation, l'irradiation peut être déclenchée à l'extérieur du système et facilement localisée à la fois dans le temps et dans l'espace de manière contrôlée, ce qui fait d'elle un système de sollicitation 4D. Par ce biais, la photo-réaction peut, en effet, être amorcée ou arrêtée en commutant simplement l'interrupteur du photo-procédé (photo-réacteur, lampe UV...) de manière à déclencher ou stopper l'irradiation. Cette photo-stimulation ne requiert aucun additif et limite la formation de sous-produits. De plus, de nombreux paramètres tels que la longueur d'onde utilisée ou encore l'intensité lumineuse peuvent être modulés et ajustés durant le procédé de photo-réaction afin de contrôler intelligemment les propriétés des polymères photo-stimulés. Ainsi, la photo-stimulation est un procédé propre dit « vert », simple, 4D, contrôlable, adaptable et très

efficace qui fait d'elle une option intéressante pour de nombreuses applications.⁷¹⁻⁷³ En effet, alors que dans l'Antiquité et au cours de l'Histoire, les applications des procédés photo-chimiques appliqués aux polymères comptaient déjà parmi elles la momification, le calfatage des coques pour bateau ou encore la photographie, l'histoire moderne de ces systèmes photo-induits a commencé dans les années 1940 quand les premiers brevets portant sur le photo-séchage d'encre basées sur des polyesters insaturés furent publiés. D'un point de vue applicatif, les procédés photo-chimiques sont de nos jours employés dans des domaines allant de la microélectronique à la stéréo-lithographie, la biotechnologie, la biomédecine, l'énergie, l'optique, les revêtements, les adhésifs et enfin, les matériaux intelligents.^{70, 72, 74-78}

3.2.b) Notion de photo-réactivité

Pour que dans un système photo-stimulable, une réaction chimique ait lieu, un photon doit être absorbé par la fonction photo-sensible. Plusieurs conditions sont alors nécessaires : i) il doit y avoir chevauchement entre l'émission spectrale de la source lumineuse et le spectre d'absorption du chromophore irradié, ii) le photon absorbé doit posséder une énergie suffisante pour engendrer la réaction souhaitée et iii) l'énergie doit mener à des transitions orbitales appropriées au sein de la molécule cible afin de favoriser la réaction désirée. Les structures de ces systèmes photo-stimulables doivent donc posséder une fonction photo-sensible absorbant dans la gamme de longueurs d'onde à laquelle le processus est irradié. Une photo-réaction efficace survient alors lorsque le photon est directement absorbé par une molécule contenant le groupement fonctionnel réactif visé (photo-isomérisation, réaction de photo-couplage), par une molécule générant en réponse des intermédiaires réactifs (espèces radicalaires ou ioniques pour des réactions de polymérisation, de réticulation) ou encore par des molécules photo-sensibilisantes c'est-à-dire qui, dans leur état excité, vont interagir avec d'autres molécules contenues dans le système afin de les rendre à leur tour photo-sensibles.⁷⁰

L'**absorption lumineuse** d'une molécule est décrite par la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon cd = -\log(I/I_0)$, où A représente l'absorbance au sein du système, ϵ et c sont respectivement le coefficient d'extinction et la concentration en espèces absorbantes, d la distance optique, I_0 l'intensité de la lumière incidente et I l'intensité de la lumière d'excitation. L'intensité totale absorbée, I_A est alors donnée par la différence des intensités incidente et excitante : $I_A = (I_0 - I)$. Pour chaque procédé photo-chimique, il existe un **rendement quantique**, ϕ , dépendant de la longueur d'onde et qui représente la fraction de photons absorbés permettant de mener à la

transformation moléculaire souhaitée. Pour une simple espèce absorbante, le pourcentage global d'amorçage de la réaction photochimique désirée est donné par : $R_i = \phi I_A$.

Cette absorption de photons, entraînée par l'irradiation UV de polymères photo-stimulables, donne lieu à un phénomène de photo-luminescence, phénomène radiatif consécutif à une excitation lumineuse. Cette photo-luminescence se traduit par l'émission de photons par la molécule irradiée et englobe généralement deux processus : la fluorescence et la phosphorescence qui dépendent de la nature des états fondamentaux et excités de la molécule considérée. La Figure 1-9 représente le **diagramme de Jablonski** très simplifié qui schématise les différents niveaux d'énergie d'une molécule et les différents phénomènes liés à la photo-luminescence.⁷⁹

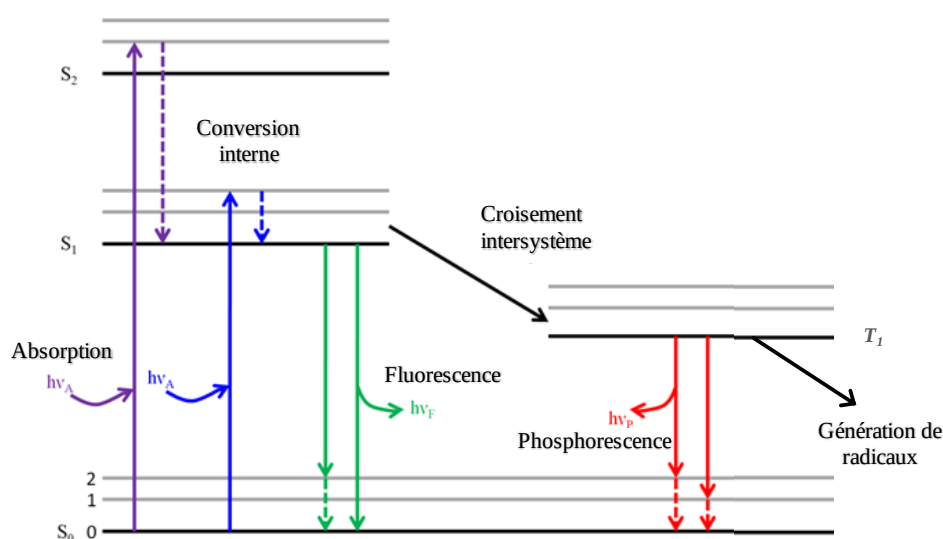


Figure 1-9 : Diagramme de Jablonski.

Dans des conditions normales, le niveau d'énergie des électrons d'une molécule possède une valeur minimale, c'est le niveau fondamental S_0 . Lorsqu'une quantité appropriée d'énergie électromagnétique est fournie à une molécule, telle que l'absorption de photon, celle-ci peut passer de l'état stable S_0 à un état excité supérieur S_1 ou S_2 , chacun de ces états ayant encore divers niveaux d'énergie vibrationnelle, rotationnelle, etc. Après un certain temps, avec d'abord des réorganisations concernant les faibles énergies telles que celles qui sont vibrationnelles, l'électron quitte son état excité pour retrouver son état fondamental. Ce retour peut alors se produire suivant différentes voies. L'émission d'un photon de fluorescence se produit si ce retour se fait directement vers l'état initial. La molécule peut également revenir dans son état initial sans émission de photon. Ces transitions non radiatives sont plus ou

moins fréquentes en fonction de divers paramètres liés à l'environnement direct de la molécule. Enfin, ce retour peut se faire par étapes successives avec le passage à différents niveaux d'énergie intermédiaires. Ainsi, une molécule excitée à un niveau élevé (état S_2 ou supérieur) est rapidement désexcitée en suivant un processus non radiatif (convection interne) et atteint l'état excité métastable S_1 . Une conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$ peut se produire rapidement. Cependant, dans le cas des molécules fluorescentes, cette vitesse est suffisamment lente pour que la désexcitation par émission de lumière puisse avoir lieu. Cette fluorescence est aussi en compétition avec le passage inter-système : état singulet $S_1 \rightarrow$ état triplet T_1 . L'émission de lumière qui accompagne le passage $T_1 \rightarrow S_0$ est appelée **phosphorescence**. Tous ces procédés sont des phénomènes photo-physiques en concurrence avec les procédés photo-chimiques. Ce sont ces derniers qui sont à l'origine des photo-réactions survenant dans les systèmes polymères photo-stimulables qui, comme la Figure 1-9 l'indique, proviennent de la formation de radicaux générés à partir l'état triplet T_1 issu du croisement inter-système. C'est cette dernière transition énergétique survenant en réponse à la photo-stimulation qui va donner lieu à différentes réactions photo-chimiques.

3.2.c) Molécules photo-réactives et polymères

L'étude portera uniquement sur les réactions intervenant dans le cas des nanoparticules polymères photo-sensibles. Ces dernières sont typiquement formées par l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles portant une fonction photo-sensible ou un chromophore. L'irradiation est d'abord captée par les molécules photo-chromiques qui la convertissent ensuite en signal chimique à travers une réaction photo-chimique modifiant leurs propriétés. La réponse du chromophore sous irradiation dépend fortement de sa structure et de la source lumineuse. Ces réactions peuvent être classées en différentes catégories selon leurs caractéristiques. Zhao *et al.*⁸⁰ ont classifié les micelles polymères photo-stimulables selon le changement structural photo-induit et leur caractère réversible. Ici, en se basant sur les travaux de Yan *et al.*,⁸¹ la classification a été établie selon le mécanisme de photo-réaction et l'impact de l'irradiation sur chaque groupement photo-sensible.^{72, 75, 82}

Comme l'illustre la Figure 1-10, quatre groupes de photo-réactions existent : les photo-isomérisations, les réarrangements photo-induits, les photo-clivages et les réticulations photo-induites. Pour chacune de ces catégories, les principaux chromophores ou fonctions photo-sensibles sont répertoriés dans le Tableau 1-1.^{71, 72, 79}

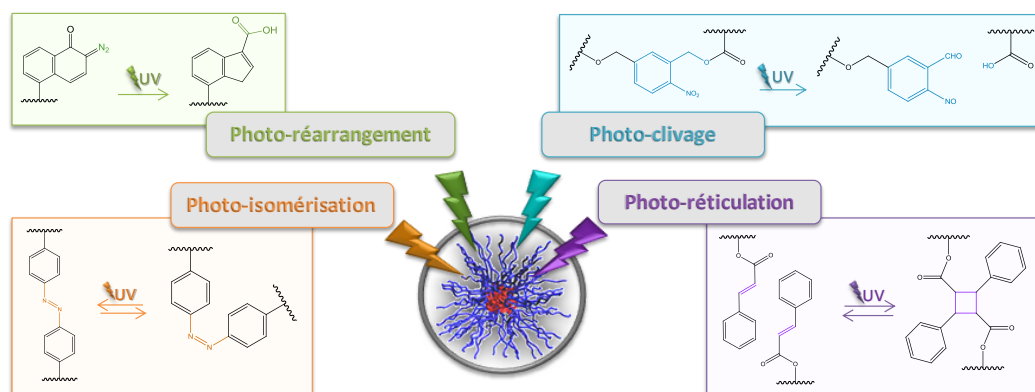


Figure 1-10 : Les groupes de photo-réactions intervenant sur des particules stimulables.

Tableau 1-1 : Récapitulatif des principales réactions photo-chimiques intervenant lors de la sollicitation de particules photo-stimulables et leurs fonctions photo-sensibles associées.

Chromophores et Fonctionnalités photo-sensibles	Réaction	Réversibilité
Photo-isomérisation		
Azobenzène	Trans/Cis	Oui
Spiropyrane	Fermé/ouvert	Oui
Dithiényléthène	Fermé/ouvert	Oui
Photo-réarrangement		
2-Diazo-1,2-naphthoquinone	Réarrangement de Wolf	Non
Photo-clivage		
Ester o-nitrobenzyle	Clivage	Non
Ester coumarinyle	Clivage	Non
Ester pyrènylméthyle	Clivage	Non
Photo-réticulation		
Inconvénients		
Acide cinnamique	Dimérisation	Oui
Ester cinnamique	Dimérisation	Non
Anthracène	Dimérisation	Oui
Stilbène	Dimérisation	Oui
Thymine	Dimérisation	Oui
Coumarine	Dimérisation	Oui
Acrylate	Polymérisation	Non
	Thiol-ène	Non

L'une des transformations photo-induites les plus simples, mise en œuvre dans les systèmes polymères photo-sensibles, est la **photo-isomérisation**, comportement moléculaire au sein duquel la photo-excitation entraîne des changements structuraux. Ce procédé est souvent réversible et répétable, faisant des groupements photo-isomérisables des candidats attractifs pour fonctionnaliser des polymères sous des formes variées et dans une large gamme d'applications. Diverses molécules typiques de la photo-isomérisation ont été utilisées dans le *design* de micelles polymères notamment l'azobenzène (AZO), le spiropyrane (SP) et le dithiényléthène (DTE) aussi bien positionnées en motifs pendants que sur la chaîne principale. Pour illustration, la conformation de l'AZO et ses dérivés varie de la forme apolaire *trans* à polaire *cis* sous irradiation UV (340-380 nm). Ce processus est capable de revenir à son état initial en modifiant la longueur d'onde de l'irradiation (420-490 nm) ou en plongeant le système dans le noir. Ce changement de polarité peut induire l'assemblage ou la déstabilisation de micelles polymères et ceci de manière réversible. Parmi les nombreux exemples, Zhao *et al.* ont observé ce processus en se basant sur un copolymère amphiphile dibloc composé d'un bloc hydrophile de poly(*t*-butyle acrylate-co-acide acrylique) et d'un bloc hydrophobe de polyméthacrylate porteur de groupements AZO en chaînes pendantes.^{77,}

83-87

Le second groupe concerne les **réarrangements photo-induits** de polymères photo-sensibles. Le plus fréquemment, ces photo-réponses se font selon le réarrangement de Wolff, dont le groupement photo-déclencheur typique est la molécule hydrophobe 2-diazo-1,2-naphtoquinone (DNQ). Cette dernière, après photo-réarrangement, est modifiée en molécule hydrophile, l'acide 3-indène carboxylique. De nombreux travaux ont fait appel à ce réarrangement, en particulier en *drug delivery* avec les études de Fréchet sur des PEG lipidiques fonctionnalisés par le groupement DNQ capables de libérer efficacement une charge utile hydrophobe en transformant la fonction DNQ hydrophobe en une entité hydrophile par déclenchement infrarouge. Plus récemment, Ji *et al.*, ont fonctionnalisé un copolymère amphiphile de polysaccharide porteur de groupes DNQ afin d'améliorer la libération intracellulaire de doxorubicine grâce à la dissociation des micelles induite par réaction de réarrangement.⁸⁸⁻⁹²

Une autre classe de réaction photo-induite est le **photo-clivage**. Parmi les fonctions photo-chromiques clivables, les plus utilisées sont le *o*-nitrobenzyle et les coumarines. Les fonctions photo-clivables peuvent être localisées, au sein du copolymère, au niveau des chaînes latérales, de la chaîne principale ou à la jonction de deux blocs de natures différentes. Selon le

positionnement des entités photo-chromiques au sein du copolymère, le photo-clivage mène à des assemblages micellaires photo-sensibles aux caractéristiques différentes résultant ou aboutissant à des modes de désassemblage et de relargage variés. En chaîne latérale, les blocs hydrophobes photo-sensibles sont capables de devenir hydrophiles après irradiation, menant ainsi à des désassemblages. Situés sur la chaîne principale, l'irradiation des chromophores conduit à la rupture de la chaîne polymère en oligomères ou en petites molécules menant à une dégradation rapide et un total désassemblage des micelles. Les chromophores insérés à la jonction de deux blocs entraînent, quant à eux, la formation de deux polymères distincts engendrant la réorganisation des assemblages ou un changement de morphologie.^{83, 84, 93, 94}

Enfin, le quatrième groupe de photo-réaction intervenant sur les nanoparticules photo-stimulables concerne les réactions de **photo-réticulation**. Le principal inconvénient des assemblages de type micellaire réside dans leur nature dynamique conduisant à des instabilités à température élevée, à trop faibles concentrations ou lors de changements de solvant d'où l'intérêt de les stabiliser. La réticulation est une approche simple et efficace, utilisée pour la suite de l'étude. Comme vu précédemment (Figure 1-7), la stabilisation de nano-objets peut se faire en réticulant le cœur et/ou la couronne. Les travaux réalisés sont axés sur la réticulation du cœur des nano-objets car elle présente l'avantage de laisser la couronne disponible et adaptable.⁹⁵⁻⁹⁹

Tel que le montre la Figure 1-11, la **photo-réticulation du cœur** peut se faire par la photopolymérisation ou le photo-couplage (réactions de chimie click : tétrazole-ène, thiol-ène) qui toutes deux utilisent la photo-réactivité des doubles liaisons de la fonction acrylate. Cependant, ces réactions photopolymérisation et de photo-couplage ne sont généralement pas réversibles. De plus, elles requièrent l'utilisation d'additifs (photo-amorceur ou agent de couplage) ce qui représente un inconvénient pour des systèmes photo-sensibles intelligents. Néanmoins, parmi les différentes méthodes de réticulation, la photo-dimérisation apparaît comme un outil précieux puisqu'elle permet d'éviter la formation de sous-produits et ne requiert pas l'utilisation d'additifs.¹⁰⁰

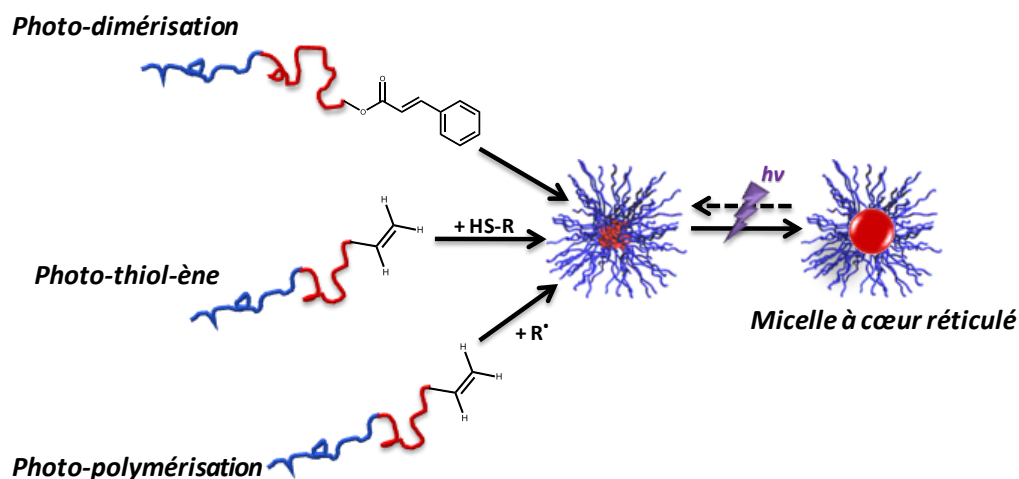


Figure 1-11 : Les réactions de photo-réticulation du cœur de nanoparticules.

3.2.d) La photo-dimérisation

Au cours des dix dernières années, des avancées prometteuses ont été réalisées dans le développement d'architectures photo-sensibles employant la photo-dimérisation en raison de sa simplicité d'utilisation et de sa réversibilité. Ces systèmes polymères sont utilisés en solution, pour élaborer des films ou même des dépôts sur des substrats et ceci pour des applications telles que les matrices photo-résistantes, les films auto-réparants ou encore pour élaborer des nano-vecteurs (Figure 1-12).¹⁰¹ Le succès des technologies des semi-conducteurs a clairement montré l'importance des polymères photo-résistants dans ces dispositifs grâce, notamment, à l'immobilisation sélective de couche polymère par photo-réticulation.¹⁰² Des films dits « auto-réparants » ont également récemment été mis au point. Ils sont capables de résorber sous UV des fissurations avant qu'elles se propagent et n'entraînent la détérioration irréversible du matériau. Des applications évidentes existent comme dans le domaine aérospatial où en mission dans l'espace toutes interventions humaines restent difficiles lors de la réparation de pièces externes de la carlingue. Bien que la réaction thermique et réversible de Diels-Alder soit la méthode la plus utilisée pour synthétiser de tels matériaux, de nombreuses études se sont focalisées sur les réactions de photo-réticulation à base de coumarine, de cinnamoyle et d'anthracène.^{103, 104} En outre, la **photo-réticulation par photo-dimérisation** est principalement utilisée en solution afin de stabiliser des auto-assemblages de polymères photo-sensibles. Elle présente également l'avantage d'être économique, réversible et de conserver la taille et la morphologie des nano-objets. Cette réticulation par photo-

dimérisation de micelles photo-induites a, pour la première fois, été reportée par Liu et *al.* en réticulant de manière réversible des assemblages comportant des esters cinnamiques.^{3, 105-107}

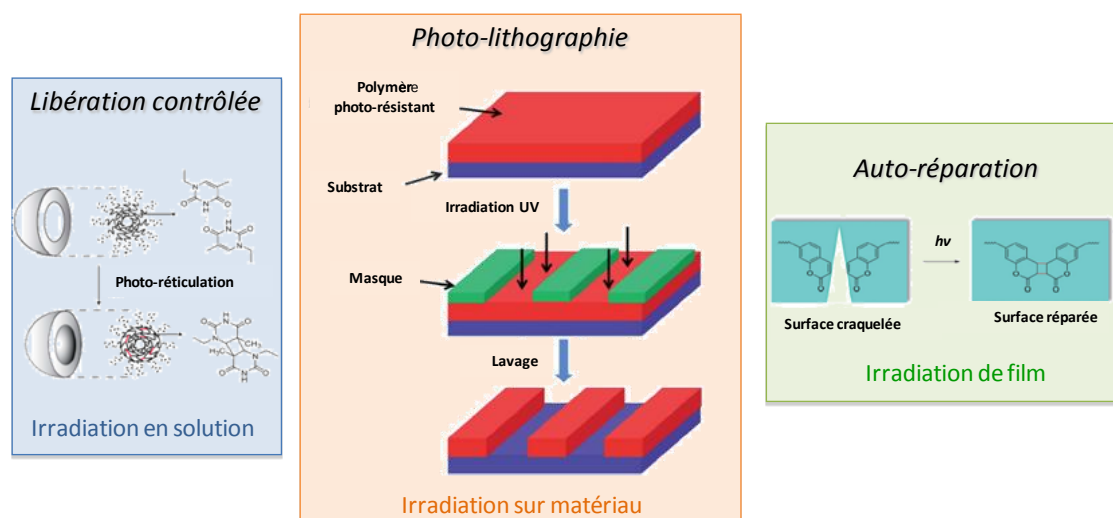


Figure 1-12 : Exemples d'application de la photo-dimérisation.

Les principales fonctions capables de subir une photo-dimérisation réversible et couramment utilisées dans le domaine des polymères sont regroupées dans le Tableau 1-1. Les réactions de **dimérisation** s'effectuent par une cyclo-addition $[4\pi+4\pi]$ ou $[2\pi+2\pi]$. Dans le cas de la réaction de cyclo-addition $[2\pi+2\pi]$, la photo-dimérisation se produit entre deux alcènes afin de former un dimère cyclobutane. C'est un procédé photo-chimiquement induit dont le résultat est un cycle à 4 chaînons par formation de deux nouvelles liaisons σ à partir de deux liaisons π . Cependant, tous les alcènes ne peuvent générer de telles réactions. Comme montré dans le Tableau 1-1, un système de conjugaison étendu au sein de la molécule est nécessaire. Le mécanisme général de cette **cyclo-addition** $[2\pi+2\pi]$ est exposé dans la Figure 1-13 et se base sur les travaux de Woodward, Hoffmann et Fukui.¹⁰⁸ Ces derniers ont développé un modèle prédisant la stéréochimie des produits formés en prenant en compte l'énergie et la symétrie des orbitales moléculaires impliquées. Pour cette étude, Hoffmann et Fukui reçurent le prix Nobel de chimie en 1981.¹⁰⁹

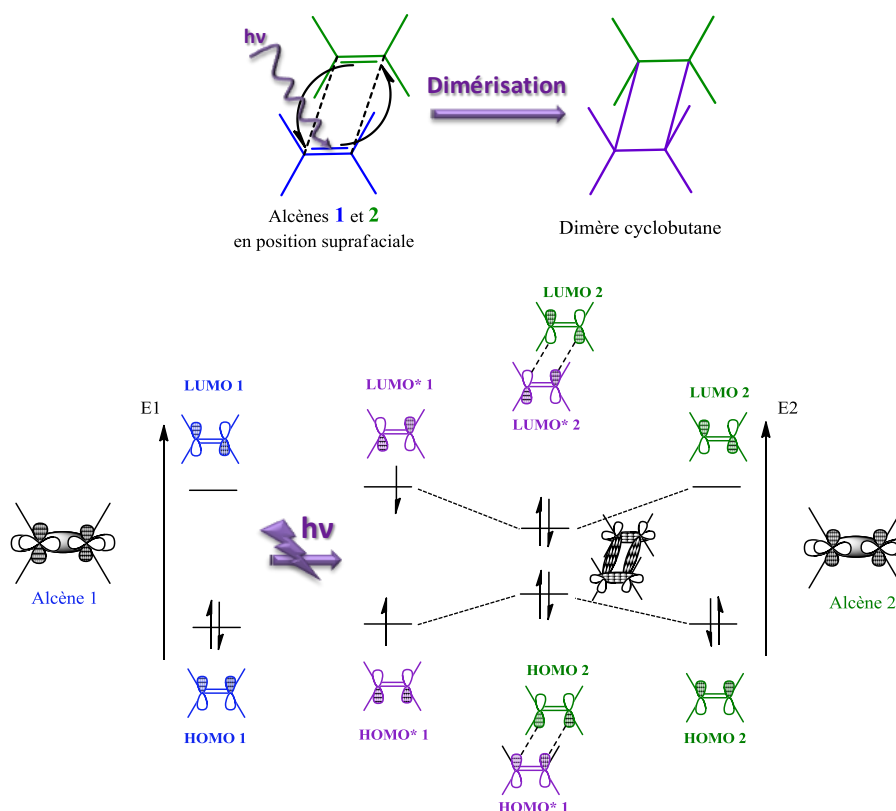


Figure 1-13 : Schéma orbitalaire et mécanisme de la photo-dimérisation.

Selon les **règles de Woodward Hoffmann**, la réaction se produit entre la plus haute orbitale moléculaire occupée (HOMO) d'un premier alcène (bleu) et la plus faible orbitale moléculaire inoccupée (LUMO) d'un second alcène (vert). Cependant, une certaine restriction est à noter pour l'établissement d'interactions liantes, il faut que la symétrie le permette c'est-à-dire que les ellipsoïdes des orbitales rapprochées soient de même signe. Si l'interaction entre la HOMO et la LUMO est symétriquement interdite alors la cyclo-addition sera thermiquement induite. Une approche *supra*-faciale des alcènes, c'est-à-dire de façon à ce que les lobes des orbitales des liaisons π soient du même côté, est donc nécessaire. Une approche *antara*-faciale pourra conduire à des interactions non liantes mais la formation de liaisons covalentes σ sera géométriquement impossible.¹¹⁰ Ainsi, si lors de la photo-irradiation, un alcène est capable d'absorber un photon possédant une énergie équivalente au gap entre sa HOMO et sa LUMO à l'état fondamental, un électron de la HOMO pourra être promu à la LUMO, formant de ce fait un alcène dans un état excité possédant deux orbitales moléculaires mono-occupées (LUMO* et HOMO*). Deux interactions liantes sont alors possibles entre ce nouvel alcène (violet) en état excité et un alcène à l'état fondamental (vert). En effet, la HOMO et la LUMO de l'alcène à l'état fondamental peuvent interagir respectivement avec la HOMO* et la LUMO* de l'alcène excité de manière à former deux nouvelles liaisons covalentes σ et donc

le dimère cyclobutane.¹¹¹⁻¹¹⁴ Néanmoins, selon les conditions d'irradiation, la photo-dimérisation peut entraîner la formation d'un ou plusieurs stéréoisomères du cyclobutane. Dans la plupart des cas, 4 stéréoisomères sont possibles. Cette non-stéréo-sélectivité s'explique par la formation d'un état excité triplet intermédiaire bi-radicalaire.^{109, 115, 116}

Bien que les stéréoisomères cyclobutane soient souvent les principaux **sous-produits** issus de la photo-dimérisation, d'autres réactions secondaires sont possibles selon le chromophore utilisé. Comme indiqué dans le Tableau 1-1, les dérivés d'acide cinnamique¹¹⁷ et de stilbène¹¹⁸ par exemple, sont sujets à la photo-isomérisation *E-Z* alors que l'irradiation de la thymine¹¹⁹ peut conduire à la formation de photo-adduits secondaires. Les chromophores anthracène et coumarine présentent uniquement la formation des stéréoisomères issus de leur photo-dimérisation. En revanche, la dimérisation de l'anthracène¹²⁰ par irradiation UV est un procédé long, environ 7 heures. La dimérisation de l'ester cinnamique, quant à elle, n'étant pas réversible, parmi les principaux chromophores photo-dimérisables, seule la coumarine¹²¹ se présente comme étant l'option adéquate afin de stabiliser des nano-objets photo-sensibles en réticulant leurs cœurs par réaction de photo-dimérisation.

4. Focus sur le groupement photo-actif coumarine

4.1. Le motif et ses dérivés

Le nom de coumarine vient de « *cumaru* » qui est le nom, dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine (Figure 1-14). Elle est présente en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme la lavande, le miel, le thé vert, la cannelle, etc. La coumarine est stockée dans la plante sous la forme de glucoside de l'acide coumarinique qui se transforme en coumarine sous l'action d'enzymes ou du soleil. Le composé a été isolé par A. Vogel, en 1820. Il a été synthétisé en 1868 par W.H. Perkin selon la réaction qui porte son nom à partir d'aldéhyde salicylique et d'anhydride acétique.

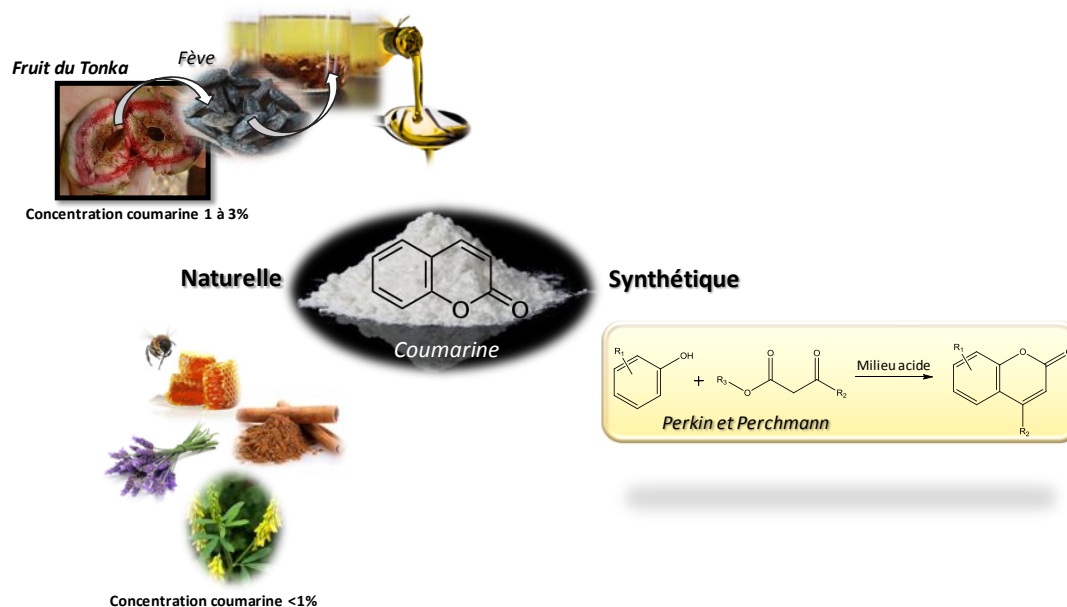


Figure 1-14 : Origines naturelle et synthétique de la coumarine.

Les coumarines sont utilisées en biologie, en médecine et en science des polymères et notamment dans les parfums, les cosmétiques, les additifs alimentaires, la phytothérapie, les cigarettes, les boissons alcoolisées et en tant que capteurs fluorescents. La coumarine fut tout d'abord utilisée en tant qu'agent thérapeutique dans l'ancienne Egypte et dans les communautés Aborigènes. Une récente revue de Yu et *al.* présente l'étude de près de 150 dérivés coumarine et leur efficacité en tant qu'agents anti-HIV. La capacité des coumarines à photo-dimériser de manière réversible les rend intéressant pour élaborer des systèmes de relargage contrôlé de principes actifs. Même si la coumarine n'est pas cancérigène aux doses habituelles dans les aliments, une toxicité hépatique a été mise en évidence par la présence de tumeurs chez la souris à 200 mg/kg/jour ainsi qu'une toxicité pulmonaire ce qui a entraîné son interdiction dans l'industrie agroalimentaire.

La dimérisation de la coumarine par cyclo-addition $[2\pi+2\pi]$ est connue depuis 1902. L'excitation photo-chimique des coumarines est obtenue par irradiation UV à une longueur d'onde supérieure à 300 nm. Le retour aux coumarines de départ a lieu par irradiation à une longueur d'onde inférieure à 300 nm. Comme illustré dans la Figure 1-15, cette dimérisation peut donner lieu à 4 stéréoisomères du cyclobutane : la configuration *trans* tête à tête et tête à queue et la configuration *cis* tête à tête et tête à queue. Parmi les nombreuses coumarines, l'une d'entre elles s'avère être particulièrement intéressante et largement employée en photo-dimérisation. Il s'agit de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine appartenant à la famille des ombelliférones (7-hydroxycoumarine) (Figure 1-15). La dimérisation de cette dernière se

produit à une longueur d'onde supérieure à 310 nm alors que la dé-dimérisation a lieu de façon réversible à une longueur d'onde inférieure à 260 nm. En raison de la gêne stérique causée par la présence du substituant méthyle, la formation de l'isomère *trans* tête à tête est favorisée. Cette sélectivité peut, selon le dérivé, être dépendante comme ici des effets électroniques et stériques du substituant mais également de la polarité du solvant. De plus, la photo-dimérisation de ce dérivé est relativement rapide comparée aux chromophores présentés précédemment puisqu'elle est de l'ordre de 1 heure contrairement notamment à l'anthracène (7 heures).^{122, 123}

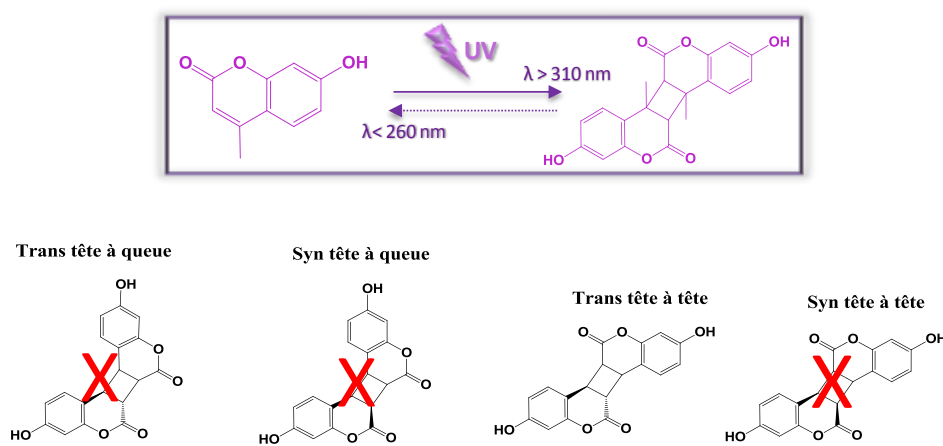


Figure 1-15 : Sélectivité de la dimérisation de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine.

4.2. Polymères porteurs d'unités coumarine : de la simple photo-dimérisation à la photo-réticulation

A la diversité des entités photo-chromiques s'ajoute la variété des architectures polymères sur lesquelles elles peuvent être incorporées. On parlera ici spécifiquement des copolymères amphiphiles. Comme le montre la Figure 1-16, il y a trois positions que le chromophore peut occuper.¹²⁴ Le chromophore peut se situer en *position α ou ω* d'une chaîne polymère. La photo-stimulation entraîne la formation d'un **polymère à bloc**. Si le polymère de départ est amphiphile (lui-même copolymère dibloc) et que la fonction photo-sensible est portée par le bloc hydrophobe, leur auto-association dans l'eau donnera des nano-objets à **cœur hydrophobe photo-dimérisé**.

Il peut se situer *en positions α et ω* d'une chaîne polymère. La photo-stimulation entraîne un phénomène d'**extension de chaîne** comme reporté par Chen et al.¹²⁵

Le chromophore peut se situer en **chaîne pendante d'un polymère greffé**. Ceci a largement été étudié dans le cas de copolymères amphiphiles hétérogreffés photo-stimulables. Si le copolymère est constitué de co-monomères hydrophobes portant un motif coumarine et de co-monomères hydrophiles alors son auto-assemblage dans l'eau formera des nano-objets à **cœur hydrophobe photo-réticulé** par dimérisations intra- et inter-chaînes.

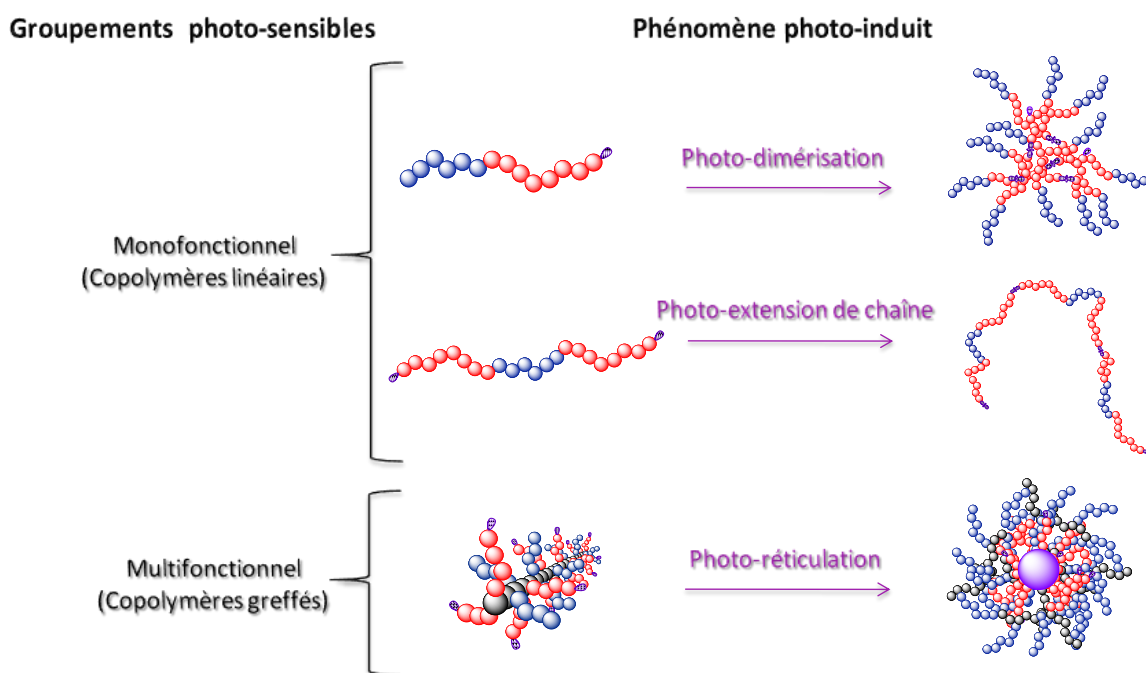


Figure 1-16 : Structures photo-fonctionnelles et phénomènes photo-induits.

Nous aborderons maintenant les **copolymères amphiphiles photo-stimulables à base de 7-hydroxy-4-méthylcoumarine**. Zhao et *al.* montrent la diversité des applications auxquelles de tels systèmes donnent accès, dont quelques exemples sont illustrés ici. Tout d'abord, en milieu suffisamment dilué, les groupements pendants peuvent photo-dimériser entre eux au sein d'une même chaîne conduisant ainsi à une **photo-réticulation intra-chaîne** (Figure 1-17).¹²⁶ Zhao et *al.* ont également montré qu'il est possible à partir de copolymères amphiphiles d'obtenir des micelles photo-réticulées (Figure 1-18). Lors de l'auto-assemblage en milieu aqueux, les copolymères amphiphiles, constitués d'un bloc hydrophile linéaire et d'un bloc hydrophobe composé de monomères porteurs de fonctions coumarine en extrémité de chaîne pendante, se comportent en « coil-brush ». Des **micelles à cœur photo-réticulé** sont formées. On note le caractère réversible de la photo-réticulation.¹²⁷ Zhao et *al.* ont poursuivi avec des **copolymères amphiphiles hétérogreffés** où les greffons hydrophobes sont

fonctionnalisés par des motifs coumarine en position terminale. Des **micelles inverses à couronne photo-réticulée** ont été décrites en conditions acides (Figure 1-18).¹²⁸

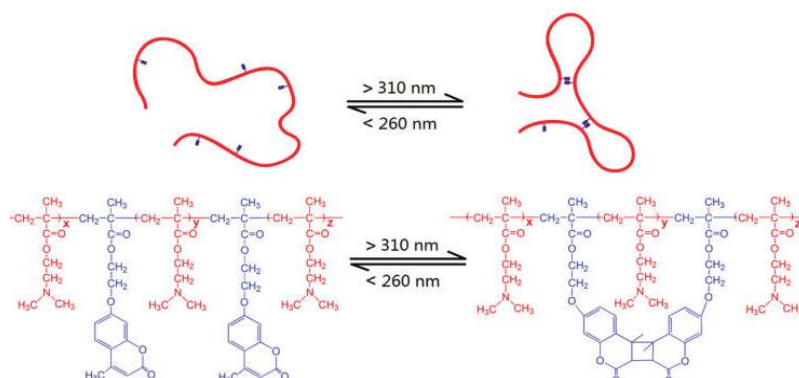


Figure 1-17 : Photo-réticulation intra-chaîne de polymères photo-stimulables greffés.¹²⁶

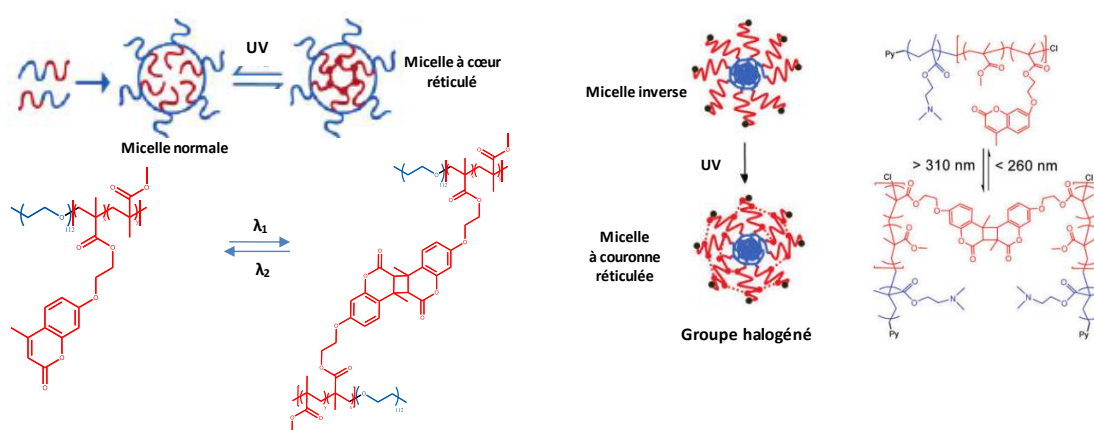


Figure 1-18 : Photo-réticulation du cœur (à gauche) ou de la couronne (à droite) de micelles.^{127,128}

Une autre étude a mis en évidence qu'il est possible d'**associer la photo-stimulation à d'autres stimuli** : la thermo-sensibilité et la pH-sensibilité. Ainsi, en synthétisant des structures greffées possédant une LCST (low critical solution temperature) et porteuses en extrémité de chaîne pendante des coumarines ou des fonctions sensibles au pH, ces systèmes sont capables de photo-dimériser au niveau du cœur ou de la couronne selon que les micelles soient normales ou inverses en fonction du pH ou de la température. Ces structures étant alors stabilisées par la photo-réticulation des coumarines, un changement de pH ou de température ne conduit pas à leur déstabilisation (Figure 1-19).¹⁰⁷

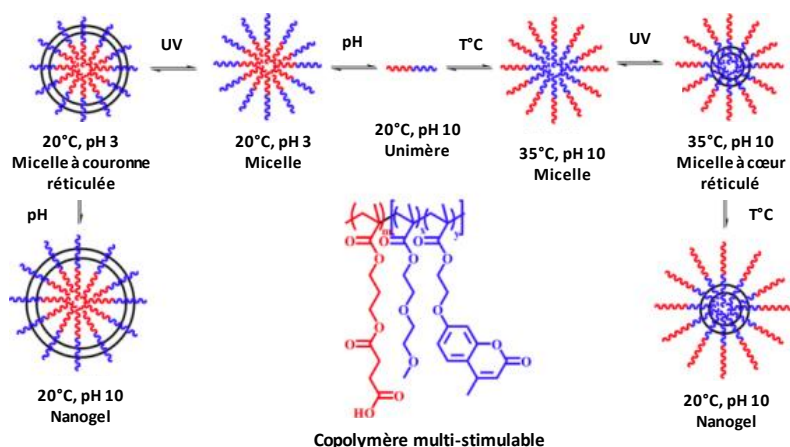


Figure 1-19 : Stabilisation d'assemblages de copolymères amphiphiles multi-stimulables par photo-réticulation des coumarines.¹⁰⁷

Les précédents exemples mettent en évidence que les architectures principalement photosensibles et amphiphiles généralement associées aux coumarines sont des structures greffées. Les unités coumarine contenues aussi bien dans le cœur que dans la couronne permettent de stabiliser les auto-assemblages par photo-réticulation réversible. Cependant, à ce jour, ***aucun polymère linéaire amphiphile α -fonctionnalisé par une unité photo-chromique coumarine n'a été décrit. L'intérêt serait ici de comparer la photo-dimérisation du cœur d'une micelle obtenue dans l'eau à partir de polymère amphiphile linéaire à la photo-réticulation du cœur d'une micelle obtenue dans l'eau à partir de copolymère amphiphile hétérogreffé.***

Par ailleurs, les structures amphiphiles décrites présentent le plus souvent un bloc ou des greffons hydrophiles à base de poly(éthylène glycol). Ce dernier est largement utilisé en raison de ses propriétés intrinsèques particulièrement attractives pour de nombreuses applications. Cependant, d'autres polymères hydrophiles possédant des propriétés similaires sont en plein essor avec parmi eux les polyoxazolines.

5. Vision détaillée des polyoxazolines (POx)

5.1. De leurs structures chimiques à leurs propriétés physico-chimiques

Les poly(2-oxazoline)s (POx)s sont également appelées de façon plus appropriée poly(*N*-acyléthylèneimine)s.¹²⁹ Elles sont souvent décrites comme des analogues d'acides aminés¹³⁰ ou comme des ***pseudo-peptides*** bien qu'ici la liaison peptidique n'appartienne pas à la chaîne principale. Comme le montre la Figure 1-20, les POx sont obtenues par

polymérisation par ouverture de cycle du monomère 2-R-2-oxazoline correspondant : hétérocycle insaturé à 5 atomes comportant un atome d'oxygène et un atome d'azote en position β l'un de l'autre. Dans la suite de ce travail, il sera uniquement question des oxazolines porteuses d'un groupement R en position 2. Les POx présentent ainsi une structure polyamide isomère des polypeptides, des polyacrylamides et des poly(*N*-acylglycine)s. Le caractère tertiaire des fonctions amide confère aux POx une grande stabilité en milieu physiologique. En effet, la non-reconnaissance de ces fonctions par les enzymes les rend ***furtives vis-à-vis du système immunitaire.***

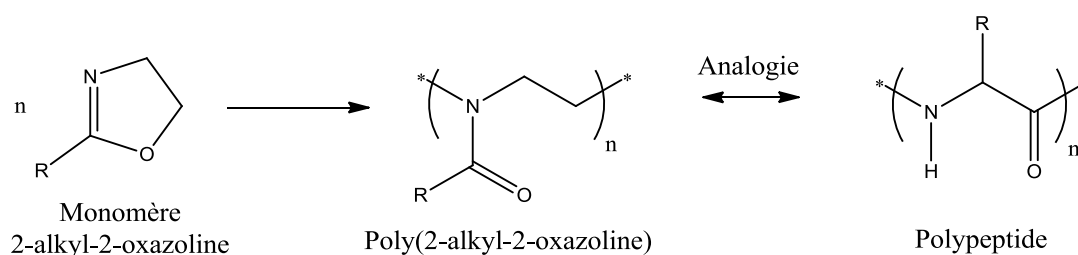


Figure 1-20 : Structure pseudo-peptidique des poly(2-R-2-oxazoline)s.

Le **groupement R** présent sur l'oxazoline se décline sous la forme d'un grand nombre de fonctions chimiques : cycliques ou acycliques. Les fonctions cycliques comptent les cycles aromatiques tels que le phényle substitué¹³¹ ou non¹³² par des chaînes hydrocarbonées, par des hétéroatomes comme le fluor,¹³³ le soufre,^{134, 135} le chlore¹³⁴ et l'iode¹³⁶ ou encore possédant un hétéroatome¹³⁴ au sein du cycle comme le furanyle. Cette catégorie comprend également les cycles hydrocarbonés tels que les bicycles ou tricycles^{137, 138} ainsi que les hétérocycles à base d'azote¹³⁹ et/ou d'oxygène.¹⁴⁰ La catégorie des acycliques, quant à elle, comprend les groupements possédant un hétéroatome comme les phosphorés,¹³⁷ les oxygénés,¹⁴¹ ceux de type polymère¹⁴²⁻¹⁴⁴ ou encore les hydrocarbonés saturés et insaturés, linéaires ou ramifiés.^{134, 136, 141, 145}

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur la 2-méthyl-2-oxazoline (MOx) qui est intéressante à plusieurs égards : i) sa **réactivité** permet des temps de polymérisation courts par rapport aux autres oxazolines et ii) son hydrophilie élevée et par conséquent sa forte **hydrosolubilité**, lorsque l'on recherche la ségrégation de phase avec un bloc hydrophobe, favorisant l'auto-assemblage de nano-objets dans l'eau.^{142, 146-150} Il est à noter que toutes les oxazolines ne sont pas hydrosolubles. Cela dépend de la nature du groupement R (Figure 1-21). Plus le groupement R est carboné (phényle, butyle, nonyle), plus la POx est hydrophobe

et moins elle est hydrosoluble. La nature du groupement R n'influe pas uniquement sur le comportement des POx en solution mais également sur leur comportement en température et à l'état solide. En effet, la température de transition vitreuse (T_g) dépendant de la mobilité des chaînes polymères, plus le groupement R est encombrant, plus le volume libre est important et par conséquent plus la T_g est faible. Ainsi, pour un groupement en C_1 comme la MOx, la T_g est de l'ordre de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^{151, 152} contre des valeurs proches de la température ambiante pour des C_3 ou C_5 .¹⁵³⁻¹⁵⁶

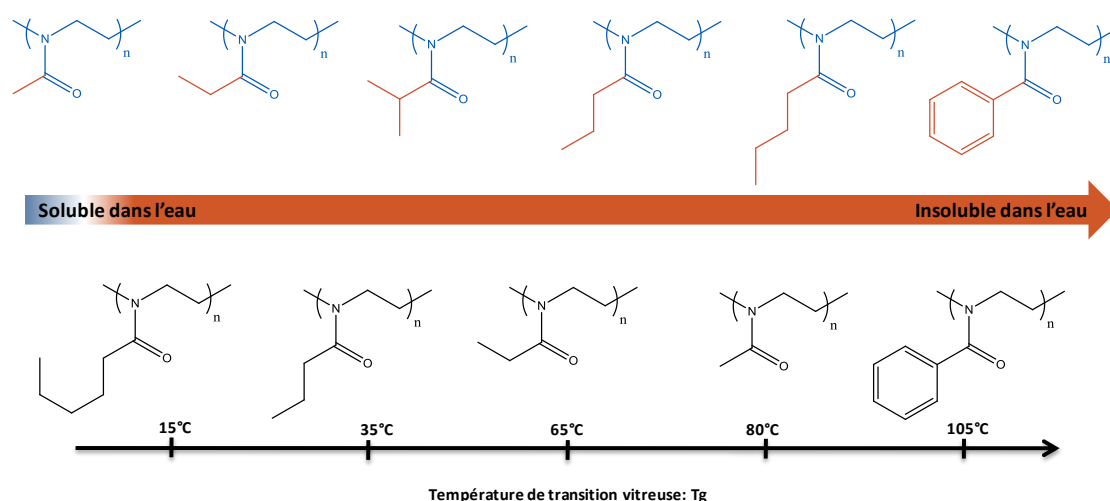


Figure 1-21 : Hydrosolubilité et température de transition vitreuse des POx en fonction de la nature de la chaîne pendante.

5.2. Polymérisation cationique par ouverture de cycle des oxazolines (CROP)

La polymérisation cationique par ouverture de cycle, connue sous l'acronyme **CROP** pour "*Cationic Ring-Opening Polymerization*", a été découverte dans le milieu des années 1960 par quatre groupes de chercheurs indépendants : Seeglier, Tomalia, Bassiri et Kagiya.^{152, 157-159} Il a été mis en évidence que la polymérisation est uniquement possible avec des oxazolines substituées sur le carbone 2 car les monomères substitués en position 4 ou 5 présentent une gêne stérique pour l'ouverture du cycle.¹³⁹ Cette polymérisation nécessite l'utilisation d'un amorceur (Am-X) ainsi qu'un agent de terminaison (At-H). Cette famille de polymères a été très étudiée dans les années 60-70 pour être oubliée dans les années 80-90. Ce désintérêt se justifie par leur temps de polymérisation relativement long pouvant aller de quelques heures à quelques jours.¹³⁰ L'équipe de Schubert a suscité un nouvel engouement

pour ces polymères en diminuant leur temps de polymérisation jusqu'à quelques dizaines de seconde par activation micro-ondes.¹⁶⁰

La CROP des 2-R-2-oxazolines se fait en trois étapes : l'amorçage, la propagation et la terminaison. Deux types de mécanisme existent ou coexistent, l'un ionique et l'autre covalent, en fonction du caractère nucléophile du contre-ion provenant de l'amorceur par rapport à la nucléophilie du monomère (cette particularité sera expliquée ultérieurement à l'aide de la Figure 1-23).^{161, 162} Ces deux mécanismes, simplifiés dans la Figure 1-22, présentent des similitudes (en noir) et des différences notables particulièrement lors de l'étape de propagation de la polymérisation (en rouge et en vert).

Lors de l'**amorçage**, l'espèce active se forme par attaque nucléophile du monomère sur l'amorceur. Deux cas se présentent alors : soit le contre-ion provenant de l'amorceur Am-X (X) est plus nucléophile que le monomère et le mécanisme est de type covalent, soit il l'est moins et le mécanisme est de type ionique. Dans les deux cas, il y a attaque nucléophile du doublet non-liant de l'atome d'azote d'un monomère sur l'amorceur Am-X. Il se forme alors un sel d'oxazolinium. La différence entre les deux mécanismes vient de l'instabilité de cette espèce. Le caractère nucléophile du contre-ion X^- étant plus important que celui du monomère, X^- réagit spontanément par attaque nucléophile sur le carbone 5 en α de l'oxygène et clive la liaison C-O du monomère. Le cycle s'ouvre alors et forme une espèce dite covalente acyléthylèneimine porteuse d'une extrémité de chaîne $-CH_2-X$ (en vert) tandis que dans le cas du mécanisme ionique, l'espèce active stable en fin d'amorçage est un sel (en rouge).

Comme lors de l'amorçage, deux cas distincts se présentent lors de la **propagation**. Avec le mécanisme ionique, le monomère est plus nucléophile que le contre-ion X^- , il y a alors attaque nucléophile du monomère sur le sel d'oxazolinium et clivage de la liaison C-O qui provoque l'ouverture de l'ion oxazolinium. L'espèce ionique, qui présente une succession de motifs acyléthylèneimine et un groupement terminal oxazolinium, est alors obtenue après addition de plusieurs monomères. Dans le cas du mécanisme covalent, l'atome d'azote d'une nouvelle unité monomère attaque le CH_2 en α du groupe partant X de l'espèce propageante. Il se forme alors également l'espèce ionique qui présente en extrémité de chaîne un sel d'oxazolinium. Selon le mécanisme covalent, l'espèce est instable car le caractère nucléophile du contre-ion provenant de l'amorceur X^- est plus important que celui du monomère. Le sel d'oxazolinium réagit rapidement par attaque nucléophile du contre-ion X^- sur le carbone 5 en α de l'oxygène

et clive la liaison C-O. Le cycle s'ouvre et après addition de plusieurs unités monomères, il se forme une espèce libre dite covalente poly(acyléthylèneimine).

La dernière étape est l'étape de **terminaison** où l'espèce active est neutralisée par l'addition d'une espèce nucléophile. Dans le cas du mécanisme ionique, la terminaison se fait par attaque nucléophile de l'agent de terminaison At-H sur l'oxazolinium terminal. Cela provoque alors l'ouverture du cycle en extrémité de chaîne en croissance et la formation de l'espèce terminale. La chaîne polymère est ainsi constituée d'une succession de motifs acyléthylèneimine avec en position α le groupement Am provenant de l'amorceur et en position ω le groupement nucléophile At provenant de l'agent de terminaison. Dans le cas du mécanisme covalent, la terminaison se fait par attaque nucléophile d'At-H sur le CH₂ en α du groupement terminal X et provoque ainsi le départ de l'ion X⁻. Selon les deux mécanismes, la même chaîne polymère finale est obtenue en fin de processus.

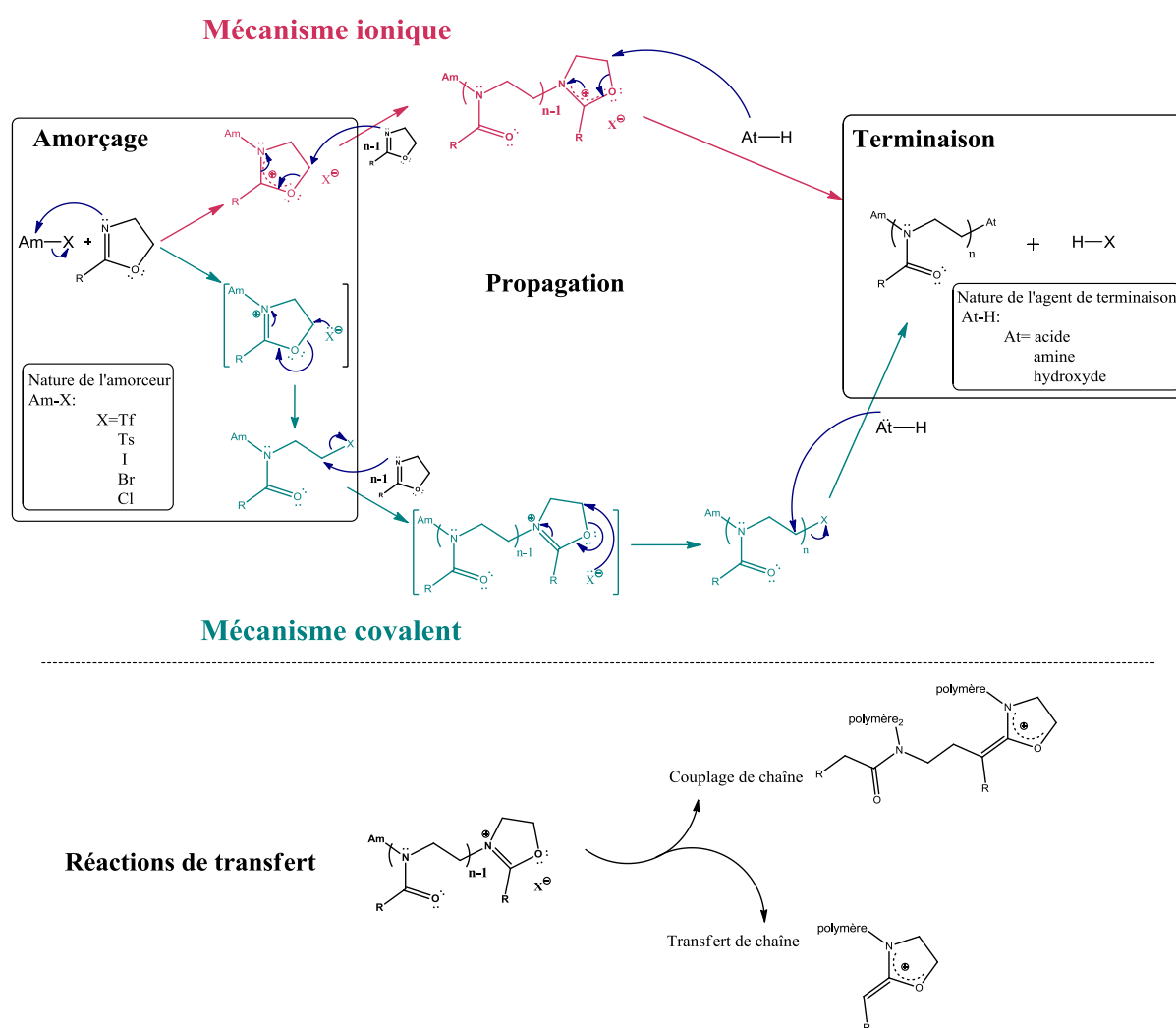


Figure 1-22 : Mécanismes ionique et covalent de la CROP des 2-R-2-oxazolines.

Le mécanisme de polymérisation des 2-R-2-oxazolines dépend du caractère **nucléophile de l'amorceur** (Am-X) et du monomère 2-R-2-oxazoline. Lors de la polymérisation de différentes oxazolines, la nature des espèces propageantes a été examinée pour différents types d'amorceurs (Am-X). Lors de l'étape d'amorçage, ces amorceurs génèrent des contre-ions X^- .^{161, 162} X peut être un atome halogéné comme le chlore, le brome et l'iode ou un groupement comme le tosylate et le triflate. Les différents amorceurs utilisés sont le chlorure¹⁶³ et le bromure de benzyle,^{164, 165} l'iodure de méthyle,^{166, 167} le tosylate de méthyle¹⁶⁸ et le triflate de méthyle.¹⁶⁹ Un classement de la nucléophilie des monomères et des contre-ions provenant des amorceurs a pu être établi. Il permet ainsi de prévoir si le mécanisme de polymérisation est de type ionique et/ou covalent. Il est à noter que la polarité du solvant est également un paramètre influant sur le type de mécanisme. Une étude issue de la littérature montre que quatre cas sont possibles (Figure 1-23) selon le caractère nucléophile du monomère et du contre-ion généré après réaction de l'amorceur avec le premier monomère. Ainsi, lorsque le caractère nucléophile du contre-ion est moins important que celui du monomère, l'espèce propageante covalente se forme comme dans le cas de la polymérisation de la MOx en présence d'amorceurs de type chlorure d'alkyle. En revanche, lorsque le caractère nucléophile du monomère est plus important que celui du contre-ion, c'est l'espèce cationique propageante oxazolinium qui va se former comme c'est le cas avec la MOx en présence d'amorceurs de type iodure d'alkyle, bromure d'alkyle, tosylate d'alkyle et triflate d'alkyle. Pour d'autres monomères, tels que la 2-oxazoline non-substituée, la 2-éthyl-2-oxazoline et la 2-phényl-2-oxazoline, les deux mécanismes de polymérisation co-existent.¹⁶⁸ La nature du solvant est alors le paramètre qui va favoriser un mécanisme par rapport à l'autre. Par ailleurs, des monomères ayant une trop faible nucléophilie comme la 2-perfluororalkyl-2-oxazoline, ne peuvent pas polymériser en présence d'amorceurs chlorés ou bromés.

Notre étude se focalisant uniquement sur le monomère MOx, nous avons choisi d'utiliser un amorceur générant un contre-ion de faible nucléophilie, le tosylate. Le mécanisme des polymérisations réalisées par CROP sera ainsi purement ionique.

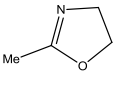
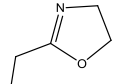
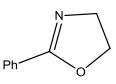
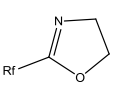
		Contre-ions (X ⁻)				
		Nucléophilie ←				
Nucléophilie ↑	Monomères	Cl	Br	I	TsO	TfO
		covalent	ionique	ionique	ionique	ionique
		covalent	ionique et covalent	ionique et covalent	ionique	ionique
		covalent	covalent	ionique et covalent	ionique	ionique
		-	covalent	ionique et covalent	ionique	ionique
		-	-	covalent	covalent	ionique

Figure 1-23 : Mécanisme préférentiel selon la nucléophilie des monomères et des amorceurs.^{161, 162}

De plus, la polymérisation de type CROP des 2-oxazolines étant une polymérisation vivante, elle nécessite l'ajout d'un agent de terminaison pour mettre fin à la propagation en désactivant l'espèce active en extrémité de chaîne. L'**agent de terminaison** doit posséder un caractère nucléophile plus fort que celui du monomère ou du contre-ion selon le mécanisme mis en jeu. En outre, le pKa doit être élevé ($pK_a \geq 10$) pour que la réaction de terminaison soit totale et rapide.¹⁷⁰ De nombreux agents de terminaison sont utilisés lors de la polymérisation de la MOx et peuvent être classés en trois catégories : les hydroxylés, les acides carboxyliques et les azotés. Les hydroxylés avec, par exemple, la potasse méthanolique^{166, 171} où l'ion OH⁻ généré attaque le carbone 5 du cycle oxazolinium terminal, ce qui a pour conséquence l'ouverture du cycle et la formation d'une liaison C-OH en extrémité de chaîne polymère. A cela s'ajoute la catégorie des acides carboxyliques avec par exemple l'acide méthacrylique⁹⁶ qui présente l'intérêt d'insérer un groupement polymérisable en extrémité de chaîne POx et celle des azotés avec par exemple l'amine secondaire, pipéridine.¹⁷²

Une **polymérisation vivante** est définie comme une polymérisation en chaîne sans aucune réaction de terminaison ni de transfert. Trois conditions doivent être respectées pour qu'une polymérisation soit qualifiée de vivante : i) l'amorçage doit être plus rapide que la propagation pour que toutes les chaînes de polymère soient amorcées au même instant, ii) la vitesse de dépropagation doit être suffisamment lente par rapport à celle de la propagation et iii) le système doit être en milieu homogène,¹⁷³ c'est-à-dire totalement solubilisé. Les

polymères obtenus sont parfaitement définis avec des indices de polymolécularité faibles et des masses molaires expérimentales en accord avec celles théoriques prédéfinies. Deux paramètres influent sur le contrôle de la polymérisation des 2-R-2-oxazolines : la concentration en espèces actives et le type de contre-ion provenant de l'amorceur. La polymérisation des 2-R-2-oxazolines amorcée avec des amorceurs de type ROTf ou ROTs s'accompagne souvent d'une perte de contrôle des masses molaires.¹⁶⁸ Celle-ci peut s'expliquer par une concentration élevée en centres actifs cationiques due à la faible nucléophilie des contre-ions provenant de l'amorceur (TfO^- ou TsO^-) favorisant ainsi les réactions de terminaison ou de transfert (Figure 1-22). De plus, il a été montré que la perte de contrôle des masses molaires est plus marquée avec des amorceurs de type ROTf qu'avec des amorceurs de type ROTs, même s'ils amorcent plus rapidement la polymérisation que ces derniers. La concentration en monomère a également un impact sur le contrôle de la polymérisation. Il a été montré que les polymérisations de la 2-éthyl-2-oxazoline et de la MOx¹⁶⁹ nécessitent une concentration en monomère comprise entre 4 et 7 mol.L⁻¹ pour éviter les réactions de transfert. Ainsi, la CROP des 2-R-2-oxazolines est considérée comme une polymérisation vivante si elle est réalisée dans des conditions appropriées de concentration, de température et de solvant.¹⁶²

Bien que les **réactions de transfert** observées lors de la polymérisation des 2-R-2-oxazolines restent peu étudiées, une étude expose toutefois un mécanisme possible de formation de ces réactions dans le cas particulier des oxazolines présentant un groupement $\text{CH}_2\text{-R}$ en position α du cycle.^{174, 175} Cette étude a mis en évidence que le carbone en α du cycle oxazoline est le site le plus favorable à des réactions de transfert car porteur de protons acide labiles. Ce transfert se fait par abstraction d'un proton au cycle oxazolinium en extrémité de chaîne polymère par un monomère qui n'a pas encore réagi (Figure 1-22). En conséquence, une chaîne polymère inactive est formée ainsi qu'un monomère chargé positivement. Ce monomère cationique alors formé peut amorcer une nouvelle chaîne polymère qui aura, par conséquent, une masse molaire plus faible que les chaînes amorcées en début de polymérisation. Quant à la chaîne polymère non-active résultante, elle peut se coupler à une chaîne polymère en croissance pour former un polymère de masse molaire très élevée. Ces réactions de transfert tendent à former des polymères soit de faibles masses molaires soit de masses molaires élevées conduisant à l'obtention d'indices de polymolécularité élevés avec le non-contrôle de la masse molaire. La littérature montre qu'il est difficile d'obtenir des homopolymères POx de haut poids moléculaire. Seul Guis et al.¹⁰⁰

ont réussi à préparer des copolymères P(MOx)-*stat*-poly(2-éthyl-2-oxazoline) avec un premier bloc P(MOx) de degré de polymérisation moyen (DP_n) 430 et le second bloc de DP_n 250 (masse molaire totale d'environ 60000 g.mol⁻¹). De façon générale, les homopolymères POx présentent des masses molaires allant jusqu'à 55000 g.mol⁻¹. Dans le cas de la MOx, la présence de réactions de transfert limite la masse molaire à 13000 g.mol⁻¹. L'équipe de Schubert a développé une méthode de polymérisation basée sur l'utilisation des micro-ondes comme méthode d'activation à des températures élevées (140 °C).¹⁶⁹ Il a été montré qu'il est possible d'augmenter les masses molaires de façon contrôlée avec des degrés de polymérisation de l'ordre de 400 pour la poly(2-éthyl-2-oxazoline) et 375 pour la poly(2-phényl-2-oxazoline). Cependant, dans le cas de la 2-nonyl-2-oxazoline et de la MOx, le DP_n plafonne à 100. En conclusion, quelles que soient les conditions utilisées, il est très difficile de synthétiser une P(MOx) de façon contrôlée avec des DP_n supérieurs à 100 même si Hoogenboom et *al.* viennent de montrer la faisabilité par l'utilisation d'une verrerie adaptée et d'un principe de polymérisation sacrificielle.¹⁷⁶

5.3. Les points forts des polyoxazolines

Les polyoxazolines présentent un grand intérêt applicatif entre autre dans le domaine biomédical au regard d'un fort caractère hydrophile et non ionique, d'une **grande stabilité** en **milieu physiologique**, d'une **solubilité élevée** dans les solvants aqueux et organiques et **facilement fonctionnalisables** permettant l'éventuelle fixation d'une prodrogue. Cela explique pourquoi, depuis trente ans, les POx ont largement été étudiées. L'une des premières applications fût en tant qu'additif dans l'industrie agroalimentaire et remonte aux années 1980. Par la suite, de nombreuses études ont montré leurs multiples utilités dans le domaine pharmaceutique et biomédical et plus particulièrement pour la bio-conjugaison de protéines, la vectorisation et la libération contrôlée de principes actifs. Dans ces applications, les systèmes PEGylés (poly(éthylène glycol), PEG) sont en place depuis plus d'une vingtaine d'années¹⁷⁷ grâce à leurs excellentes propriétés intrinsèques et leur caractère furtif leur permettant de circuler plus longtemps dans le système sanguin améliorant de ce fait leur efficacité de ciblage et de délivrance.¹⁷⁸ Cependant, en raison de leur utilisation intensive dans de nombreux produits alimentaires et cosmétiques,^{179, 180} des anticorps spécifiques au PEG ont récemment été identifiés.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ En outre, il a été montré que le PEG peut s'accumuler dans l'organisme par adsorption¹⁸⁵ provoquant sa dégradation et la formation de sous-produits toxiques comme le tétrahydrofurane.¹⁷⁷ Même si les études de toxicité et de cytotoxicité sur les POx ne sont pas encore suffisantes pour les déclarer biocompatibles, elles sont approuvées

par la Food and Drug Administration (FDA) en tant qu'additifs indirects utilisés au contact des denrées alimentaires, laissant ainsi présager de leur future approbation en milieu pharmaceutique.¹⁷⁸ Différents travaux allant dans ce sens ont été menés afin d'évaluer la biocompatibilité des homopolymères et des copolymères à base de POx. Les études *in vitro* ont permis un approfondissement de leur cytotoxicité sur différentes lignées cellulaires, ainsi que leur hémocompatibilité ou leur internalisation cellulaire.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Ces dernières ont révélé leur possible endocytose ainsi que leur caractère **cytocompatible**, **hémocompatible** et ce indépendamment de leur structure.^{181, 189-192} Mais si les POx sont comparées aux PEG ce n'est pas uniquement pour leur biocompatibilité mais surtout pour leur **furtivité**. En effet, la furtivité des POx a été publiée pour la première fois en 1994 par Woodle et *al.*¹⁹³ qui ont observé une augmentation du temps de circulation de liposomes recouverts de POx en milieu sanguin et une diminution de leur accumulation dans le système réticulo-endothélial témoignant de leur invisibilité face au système immunitaire par rapport aux liposomes "nus". De plus, il a été prouvé que cette furtivité,¹⁹⁴ comparable à celle du PEG, induit une capacité à éviter l'adhésion des protéines grâce à sa forte hydrophilie et sa stabilité.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ D'autres études *in vitro* conduisent à penser que les POx sont dégradables¹⁹⁸ puisque malgré l'absence de dégradation enzymatique¹⁹⁹ ou hémolytique en conditions physiologiques, une dégradation oxydante²⁰⁰ a été observée. De plus, la **faible viscosité** des POx comparée à celle des polymères PEGylés facilite l'élaboration de formulations pharmaceutiques. C'est pour ces différentes raisons que les POx sont considérées comme une sérieuse alternative au PEG,^{177, 189, 195, 201} non seulement en recherche académique mais également dans l'industrie pharmaceutique comme la société américaine *Serina Therapeutics*, qui valide actuellement différentes formulations à base de POx pour le traitement de cancers et de la maladie de Parkinson.

5.4. Fonctionnalisation des POx

A ces avantageuses propriétés biologiques, s'ajoute une polyvalence chimique. En fin de polymérisation, la chaîne polymère porte en position α le groupement électrophile provenant de l'**amorceur** (Am) et en position ω le groupement nucléophile de l'**agent de terminaison** (At) comme indiqué sur la Figure 1-24. Il est donc possible de fonctionnaliser le polymère aux extrémités de chaînes et d'obtenir des P(Ox) dites α,ω -téléchéliques, dans le cas d'une utilisation conjointe d'un amorceur et d'un agent de terminaison fonctionnels.²⁰² L'autre possibilité est la synthèse de P(Ox) α -hémitéléchéliques ou ω -hémitéléchéliques dans le cas d'utilisation d'un amorceur ou d'un agent de terminaison respectivement

fonctionnalisés. La fonctionnalisation par l'amorceur de la P(Ox) présente l'avantage de s'assurer que toutes les chaînes polymères sont fonctionnalisées même en cas d'amorçage partiel. A l'inverse, la fonctionnalisation de la P(Ox) par l'agent de terminaison assure un bon contrôle des masses par un choix judicieux de l'amorceur même si le risque d'une terminaison partielle peut avoir lieu lors d'une trop faible réactivité de l'agent de terminaison.

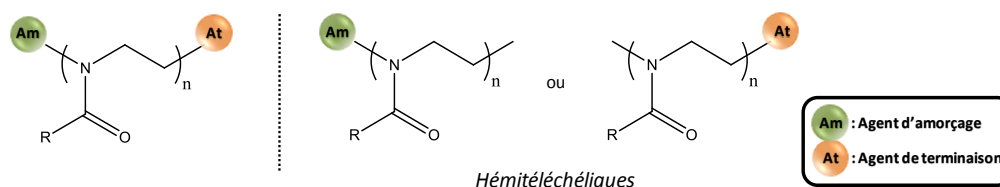


Figure 1-24 : Diversité de fonctionnalisation des POx.

De plus, contrairement au PEG, la synthèse de monomères 2-R-2-oxazoline possédant des **groupements R fonctionnalisés** variés permet d'aboutir à des polymères "sur-mesure". En effet, contrairement au PEG qui est uniquement fonctionnalisable en extrémités de chaîne, les POx le sont également en chaînes latérales offrant de très nombreuses possibilités supplémentaires d'architectures complexes.^{203,175, 204}

Au cours de notre étude, cette grande variété de fonctionnalisations sera mise à profit pour préparer une large gamme d'architectures macromoléculaires. En effet, des polymères linéaires amphiphiles photosensibles ont été développés grâce à la synthèse de chaînes P(MOx) hémitéléchéliques, fonctionnalisées par un amorceur photo-sensible coumariné. A cela s'ajoute l'obtention de structures greffées amphiphiles photo-sensibles par la copolymérisation de méthacrylates à chaînes pendantes hydrophobes aliphatiques coumarinées et hydrophiles P(MOx) hémitéléchéliques.

5.5. Suprastructuration des POx

La variété de fonctionnalisation offerte par les polyoxazolines conduit à des architectures complexes et à des structurations à grande échelle. Pour cela, le cas le plus simple est l'utilisation des interactions hydrophobes qui permettent le contrôle des auto-organisations en solution de ces nanostructures. Cependant, lorsqu'une ou plusieurs forces motrices (« *driving* » force) viennent s'ajouter à ces interactions hydrophobes, l'auto-assemblage devient plus sophistiqué et des structurations hiérarchiques se forment alors à plus grande échelle.^{23, 205}

Les biopolymères, tels que les protéines ou les peptides, sont connus pour leur capacité à former des structures hiérarchiques hautement ordonnées sur une échelle allant de quelques nanomètres à plusieurs microns. En regardant ces organisations de plus près, les interactions provenant des ponts hydrogène entre les séquences de nucléotides, d'acides aminés, les sucres ou les phospholipides sont responsables d'une organisation à longue distance entre ces séquences. C'est ainsi que l'enchaînement de nucléotides donnent accès à la double hélice α et aux feuillets β caractéristiques de l'ADN, au collagène ou la kératine pour les acides aminés, aux membranes et à la cellulose pour les phospholipides et les sucres.²⁰⁶ Hormis les interactions hydrogène et hydrophobes, cette organisation et agrégation hiérarchisée des biomolécules peut être menée par d'autres interactions non covalentes comme des interactions électrostatiques, dipôle-dipôle ou encore π -stacking. De la même façon, par leur caractère pseudo-peptidique, les POx laissent présager de leur capacité à former de telles organisations hiérarchisées. Dans le cas de polymères synthétiques, de telles suprastructures, type double hélice, ont déjà pu être mises en évidence comme par exemple par Schlaad et *al.* Ces derniers ont utilisé un polymère hydrophile structurellement assimilable aux biopolymères, le poly[2-(acétoacétoxy)éthylméthacrylate] (PAEMA). Son auto-organisation sous forme de double hélice (Figure 1-25) se fait par ponts hydrogène entre les groupements C=O et CH₂ des groupements acétoacétoxy et par compensation de moments dipolaires.²⁰⁷

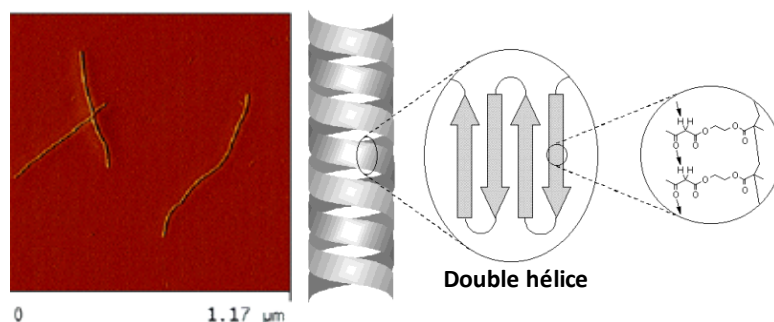


Figure 1-25 : Structuration hélicoïdale des homopolymères PAEMA.

Une conséquence directe des fonctionnalisations de POx est la modification des propriétés physico-chimiques et des propriétés mécaniques. Par exemple, la nature du substituant R en chaîne latérale des POx détermine son hydrophilie. Ainsi, la PMOx est hydrosoluble indépendamment de la température alors que les PEOx et poly(2-n-propyl-2-oxazoline) montrent un caractère thermosensible. De la même façon, les propriétés des POx étant liées entre elles, l'hydrophobie, la longueur et l'encombrement stérique du groupement R engendrent des variations de mobilité des chaînes et donc de valeurs de Tg (Figure 1-26). De

même, la nature du groupement R amène plus ou moins d'organisation et donc un caractère amorphe ou semi-cristallin.^{156, 208-210}

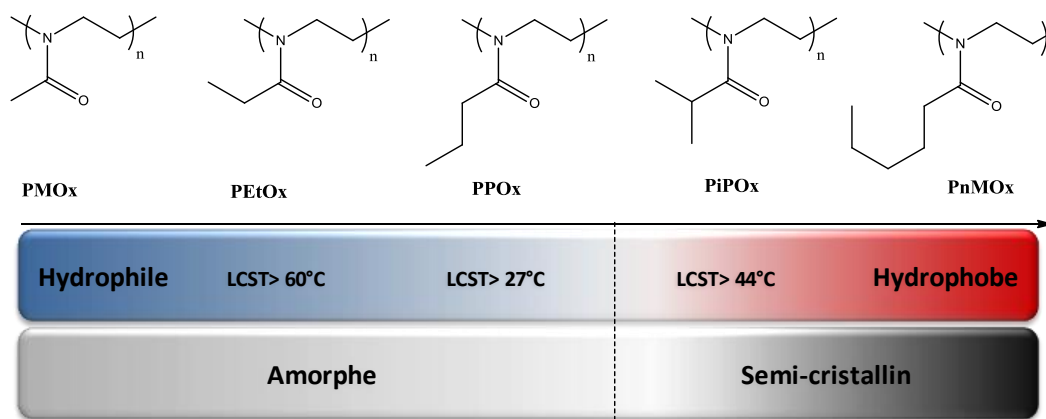


Figure 1-26 : Influence du groupement R sur les propriétés intrinsèques des poly(2-R-2-oxazoline)s.

Alors que les PMOx et PEtOx sont connues pour leur hydrophilie, leur Tg élevée, le PiPOx, polymère thermosensible, est largement utilisé pour son caractère semi-cristallin. De nombreuses études réalisées sur ce dernier ont montré sa capacité à cristalliser dans une direction privilégiée grâce à des interactions hydrophobes et dipolaires lorsqu'il est placé en milieu aqueux à une certaine température et conduisant ainsi à la formation de nanofibres.²¹¹ De plus, en augmentant la longueur du groupement latéral R alkylé des monomères 2-R-2-oxazolines, d'autres études ont montré que la chiralité générée après leur polymérisation au niveau de la chaîne principale menait à des structures hiérarchiques cristallines.²¹² Dans l'optique d'obtenir des architectures hiérarchisées à grande distance, il est également fréquemment reporté l'association de deux POx de substituants R différents et notamment en structures type greffé où les POx constituent les chaînes latérales du copolymère.^{213, 214} Ainsi, l'association de PiPOx et de PMOx, en conjuguant leurs propriétés, conduit à la formation de nanofibres cristallines hydrosolubles par l'alignement des fonctions amine, selon des interactions dipolaires qui sont à l'origine de la cristallisation de la chaîne principale (Figure 1-27a).²¹⁵ D'autres travaux ont eux privilégié le caractère cristallin des PiPOx en n'utilisant pas uniquement ce type de POx en chaînes latérales mais en les rattachant à un squelette principal polysaccharide (Figure 1-27b).²¹⁶ Cette association mène également à des structures cristallines hydrosolubles. Cependant, la différence par rapport à l'exemple précédent est que l'organisation provient d'interactions hydrogène entre unités sucre (donneurs d'électrons) et POx (accepteurs d'électrons). Lorsque ces sucres sont placés en extrémité des groupements R

des unités POx, les interactions hydrogène mènent de nouveau à des nanofibres non torsadées (Figure 1-27c).²⁰⁶

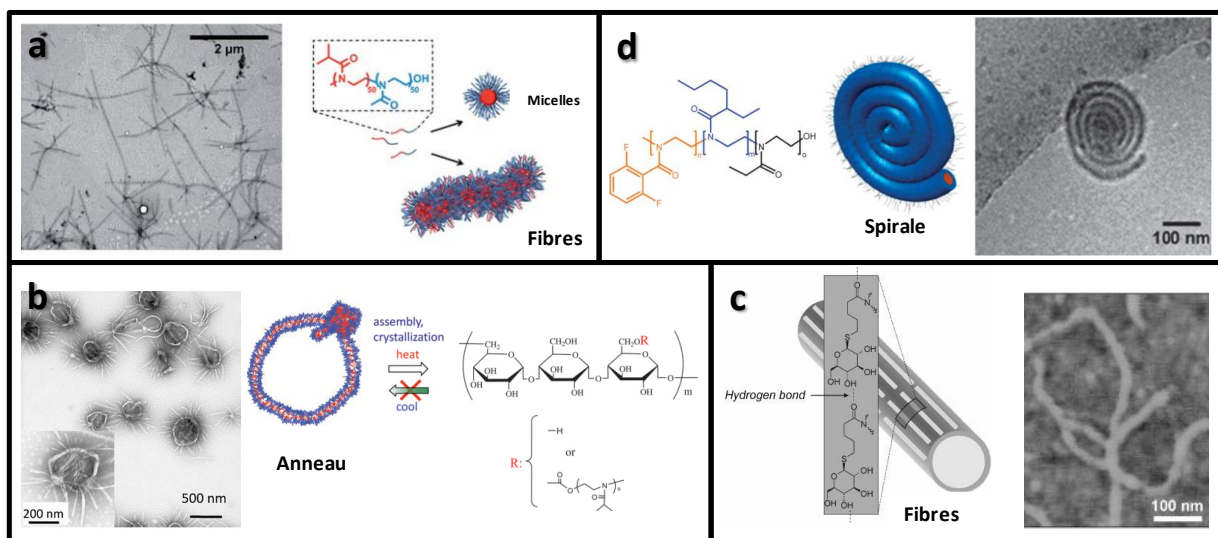


Figure 1-27 : Exemples de suprastructurations à base de POx.

Concernant les POx possédant des groupements R comptant un seul voire deux carbones, type MOx et EtOx, très peu d'études sont répertoriées sur la formation de structures hiérarchisées à longue distance. Or, leur caractère hydrophile tend à laisser supposer que les interactions hydrogène seront d'autant plus importantes dans leur cas. De plus, dans le cas de copolymères amphiphiles, les interactions hydrophobes, qui sont couramment à l'origine des assemblages en nano-objets, vont s'ajouter à ces interactions hydrophiles ce qui pourrait conduire à des suprastructures. Une étude réalisée par Schubert et Gohy a toutefois récemment montré la formation de micelles agrégées sous forme de spirale après mise en solution de triblocs amphiphiles à base de PEtOx, de PEPOx et de chaînes fluorées (Figure 1-27d).²¹⁷ Ces spirales se forment par interactions hydrophobes et hydrophiles. Dans le cas de la MOx, une seule étude a montré la formation de colloïdes cristallins de copolymères étoilés en polymérisant la MOx à partir d'un cœur aromatique multifonctionnel.¹⁵¹ La polymérisation à partir d'un même cœur induit une cristallisation des chaînes en croissance par conjugaison d'un système π donneur d'électrons et d'un système accepteur d'électrons.

Bien que la PMOx soit amorphe, elle peut être un excellent candidat à la formation de structures sophistiquées à condition de lui associer des groupements complémentaires (donneur de protons, cycle aromatique,...). Dans ce travail, l'association de groupements photo-sensibles de type coumarine à la PMOx semble intéressant au regard d'interactions

hydrophobes et hydrogène potentielles. Des phénomènes de π -stacking, d'alignement dipolaire et de chiralité semblent possibles. Ceci est envisagé dans le cas de copolymères greffés amphiphiles où les PMOx se situent en chaînes latérales d'un squelette polyméthacrylate de même que des greffons aliphatiques hydrophobes coumarine. De plus, l'intérêt d'insérer une fonction photo-sensible en extrémité de chaîne PMOx est de la rendre photo-stimulable, c'est-à-dire d'ajouter à ses nombreuses propriétés citées précédemment un caractère "intelligent".

5.6. Quelques rares exemples de polyoxazolines photo-sensibles

Dans la littérature, il existe très peu d'études portant sur les polyoxazolines photo-sensibles. Pourtant, combiner leurs propriétés d'hydrophilie, de biocompatibilité, de furtivité et de structuration à un processus de stimulation non toxique, rapide, simple et contrôlable se révèle être un axe d'étude particulièrement intéressant et porteur pour de nombreux domaines d'application, en particulier en *drug delivery*.

Parmi les quelques rares exemples répertoriés, les travaux les plus récents sur les POx photo-sensibles ont été réalisés par Schubert et Hoogenboom (Figure 1-28).²¹⁸ Ces derniers ont réticulé sous irradiation UV des copolymères obtenus par CROP des monomères MOx, 2-(déc-9-enyl)-2-oxazoline ou 2-éthyl-2-oxazoline par l'ajout de dithiol afin de former des hydrogels homogènes et dégradables. Cette "photo-gélation" par thiol-ène présente l'avantage d'être rapide (240 s) et d'être réalisée à température ambiante. En revanche, par rapport aux systèmes photo-stimulables utilisant des chromophores, la photo-thiol-ène nécessite l'ajout d'additifs : le photo-amorceur et surtout les dithiols susceptibles de former des ponts disulfure résiduels dans le matériau final mais aucune réversibilité ne semble possible.

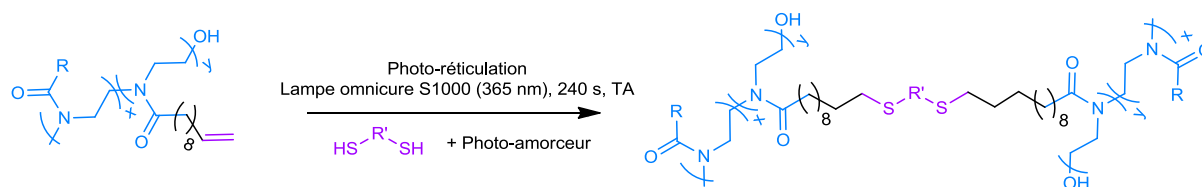


Figure 1-28 : Photo-gélation de polyoxazolines photo-stimulables par réaction thiol-ène.²¹⁸

David et al.²¹⁹ ont inséré le chromophore cinnamate en extrémité de chaîne par terminaison avec l'acide cinnamique (Figure 1-29). Cependant, l'aspect photo-sensible des chaînes POx

n'a pas été étudié. Elles ont uniquement été utilisées pour la copolymérisation en émulsion avec le styrène.

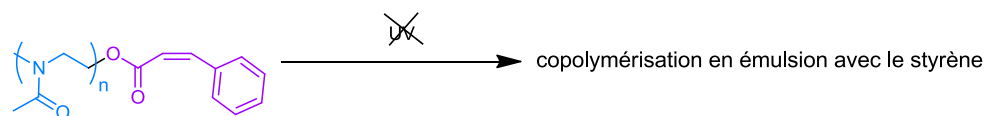


Figure 1-29 : Photo-fonctionnalisation en extrémité de chaîne POx à l'aide de l'acide cinnamique.²¹⁹

Il faut remonter aux années 1990, avec les travaux de Chujo et Saegusa pour observer les seules études de photo-réticulation réalisées sur des polyoxazolines chromophorées. Ces dernières ont permis de réaliser des hydrogels dégradables par "photo-gélation" de chaînes POx obtenues par CROP de MOx et d'oxazolines fonctionnalisées par un groupement porteur de dithiol et terminé par un chromophore anthracène (Figure 1-30).²²⁰ Sous irradiation UV (durant 6h30), les groupements anthracène réticulent entre eux conduisant à des hydrogels. Cependant, la photo-dimérisation de l'anthracène n'étant pas réversible, des fonctions dithiol ont été insérées en chaînes pendantes afin de pouvoir dégrader par réduction ces réseaux gélifiés.

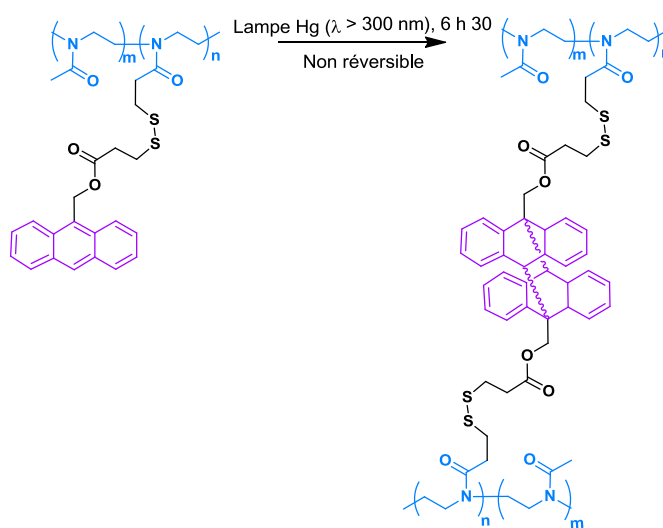


Figure 1-30 : Photo-réticulation irréversible de POx porteuses du chromophore anthracène.²²⁰

De la même manière, une étude a permis de "photo-gélifier" de façon partiellement réversible des copolymères hydrophiles obtenus par CROP de MOx et de monomères oxazoline porteurs d'une fonction coumarine photo-sensible (Figure 1-31). Ces groupements pendants coumarine sont alors réticulés sous irradiation UV à 310 nm (7 h) afin de former un hydrogel qui peut ensuite être clivé partiellement en irradiant à 254 nm.²²¹

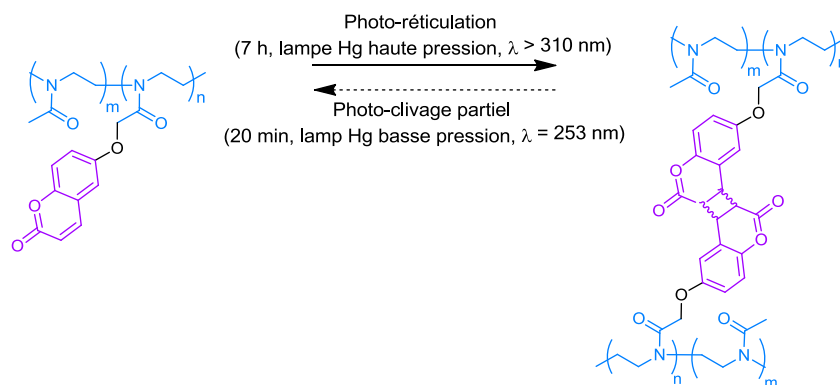


Figure 1-31 : Photo-réticulation de POx coumarinées.²²¹

Il est à noter que ces polyoxazolines photo-sensibles sont purement hydrophiles dans chacun des travaux répertoriés. De plus, les structures étudiées en photo-stimulation sont des architectures greffées et montrent donc uniquement un phénomène de photo-réticulation. La coumarine semble en revanche être un chromophore particulièrement intéressant puisque, bien que la photo-gélation semble longue dans les deux cas, elle apporte une certaine réversibilité par rapport à l'anthracène. Il apparaît donc qu'aucune étude n'ait été réalisée sur des copolymères amphiphiles photo-sensibles à base de POx. Il s'avère ainsi novateur de développer des architectures de polyoxazolines amphiphiles porteuses d'un groupement coumarine afin de mettre en évidence leur différence de comportement tant en terme d'auto-assemblage qu'en terme de photo-stimulation. En effet, *l'irradiation de structures linéaires ou greffées, pour des mêmes entités constitutionnelles, donnera lieu à des phénomènes de photo-réaction différents : respectivement la photo-dimérisation et la photo-réticulation, qui n'ont à ce jour encore jamais été comparées en terme d'efficacité sous UV mais aussi de stabilité d'objets.*

6. Conclusion

Après avoir rappelé les paramètres clés intervenant dans l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles, la stimulation d'objets polymères a été discutée. En effet, les conditions extérieures telles que le solvant, la température, le pH, la concentration restent des éléments perturbateurs pouvant déstabiliser ces nano-objets. Pour parer à cela, il est possible de rendre ces copolymères intelligents ou encore adaptatifs en présence d'un stimulus extérieur. Ils sont alors capables de modifications majeures de leurs propriétés physiques. Un stimulus intéressant est la photo-stimulation qui est un procédé non-toxique, peu énergivore et qui présente un grand nombre d'autres avantages. Parmi les chromophores les plus utilisés, la coumarine réagit par photo-dimérisation relativement rapidement, sélectivement et de façon réversible. Cette photo-cyclisation $[2\pi+2\pi]$ peut entraîner la formation, le désassemblage, le clivage ou la réticulation réversible d'assemblages micellaires. Dans le dernier cas, les nano-objets constitués de copolymères amphiphiles possèdent un cœur coumariné pouvant être stabilisé par photo-réticulation intra- et inter-chaine. Ce travail de bibliographie a permis de mettre en évidence la pertinence des polymères photo-actifs étudiés dans la suite de cette étude, à savoir les polyoxazolines amphiphiles décorées par des motifs coumarine, unité photo-chromique. Les polyoxazolines sont des polymères hydrophiles obtenus par polymérisation par ouverture de cycle cationique (CROP). Leur structure pseudo-peptidique leur confère des propriétés de biocompatibilité et de furtivité vis-à-vis du système immunitaire, qui sont des atouts majeurs pour une utilisation dans le domaine biomédical au cahier des charges exigeant mais également dans bien d'autres domaines. Or, aucune étude n'a encore été réalisée sur l'association de coumarine à des polyoxazolines pour obtenir des copolymères amphiphiles photo-sensibles. Les copolymères amphiphiles envisagés ici profitent de la forte hydrophilie des POx par contraste avec le bloc hydrophobe photo-sensible ce qui devrait assurer une ségrégation de phase en milieu aqueux, clé de l'auto-assemblage en nano-objets de morphologie parfaitement définie. A cela vient s'ajouter la capacité des POx à former des superstructures hiérarchisées à longue distance selon l'architecture et les groupements qui leurs sont associés grâce à des interactions faibles. En outre, la position et le nombre de chromophores au sein de la structure ayant une importance capitale dans le phénomène photo-induit, il serait intéressant de comparer la photo-réticulation du cœur de nano-objets constitués de copolymères hétérogreffés amphiphiles à la photo-dimérisation du cœur de nano-objets constitués de copolymères amphiphiles diblocs linéaires. Ces deux phénomènes photo-induits peuvent alors mener à des différences encore jamais explorées que

ce soit en termes d'efficacité UV que de morphologie ou de stabilité de nano-objets en solution.

Références bibliographiques

1. A. Jakli, A. Saupe; *CRC Press*, **2006**.
2. S. Paria, K. C. Khilar; *Advances in Colloid and Interface Science*, **2004**; 110, 75-95.
3. G. Riess; *Progress in Polymer Science*, **2003**; 28, 1107-1170.
4. U. P. Strauss, E. G. Jackson; *Journal of Polymer Science*, **1951**; 6, 649-659.
5. U. P. Strauss, N. L. Gershfeld; *The Journal of Physical Chemistry*, **1954**; 58, 747-753.
6. R. Mülhaupt; *Angewandte Chemie International Edition*, **2004**; 43, 1054-1063.
7. P. Alexandridis; *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **1996**; 1, 490-501.
8. A. V. Kabanov, E. V. Batrakova, V. Y. Alakhov; *Journal of Controlled Release*, **2002**; 82, 189-212.
9. G. S. Kwon, T. Okano; *Advanced drug delivery reviews*, **1996**; 21, 107-116.
10. V. S. Trubetskoy; *Advanced drug delivery reviews*, **1999**; 37, 81-88.
11. J. Zhou, L. Wang, J. Ma; *Designed Monomers and Polymers*, **2009**; 12, 19-41.
12. O. Ikkala, G. Ten Brinke; *Chemical Communications*, **2004**; 2131-2137.
13. N. Haberkorn, M. C. Lechmann, B. H. Sohn, K. Char, J. S. Gutmann, P. Theato; *Macromolecular Rapid Communications*, **2009**; 30, 1146-1166.
14. F. D. Gunstone, F. B. Padley; *CRC Press*, **1997**.
15. L. Watson; *Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Second Edition*, **2007**; 1014-1025.
16. K. M. Kelly A. Davis; *Springer*, **2002**.
17. J. P. Mercier, W. Kurz, G. Zambelli; *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*, **1999**.
18. S. Forster, M. Konrad; *Journal of Materials Chemistry*, **2003**; 13, 2671-2688.
19. S. Foster, T. Planterberg; *Angewandte Chemie International Edition*, **2002**; 41, 689-714.
20. S. Förster, M. Antonietti; *Advanced Materials*, **1998**; 10, 195-217.
21. V. A. Stephan Förster, Axel H. E. Müller; *Springer Berlin*, **2004**; 166, 267-277.
22. C. J. F. Rijcken, O. Soga, W. E. Hennink, C. F. V. Nostrum; *Journal of Controlled Release*, **2007**; 120, 131-148.
23. J. P. Patterson, M. P. Robin, C. Chassenieux, O. Colombani, R. K. O'reilly; *Chemical Society Reviews*, **2014**; 43, 2412-2425.
24. I. W. Hamley; *Oxford Science Publications*, **1998**.
25. M.-C. Jones, J.-C. Leroux; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **1999**; 48, 101-111.
26. J. N. Israelachvili, 19 - *Thermodynamic Principles of Self-Assembly*, in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)* **2011**, Academic Press: San Diego. p. 503-534.
27. J.-F. Gohy; *Springer Berlin*, **2005**; 190.
28. J. Rodríguez-Hernández, F. Chécot, Y. Gnanou, S. Lecommandoux; *Progress in Polymer Science*, **2005**; 30, 691-724.
29. B. Jeong, A. Gutowska; *Trends in Biotechnology*, **2002**; 20, 305-311.
30. I. Y. Galaev, B. Mattiasson; *Trends in Biotechnology*, **1999**; 17, 335-340.
31. R. Dagami; *Chemical engineer news*, **1995**; 30-33.
32. E. S. Gil, S. M. Hudson; *Progress in Polymer Science*, **2004**; 29, 1173-1222.
33. I. W. Hamley; *Angewandte Chemie International Edition*, **2003**; 42, 1692-1712.
34. J. Hu, G. Zhang, S. Liu; *Chemical Society Reviews*, **2012**; 41, 5933-5949.
35. M.-J. Zhang, W. Wang, R. Xie, X.-J. Ju, L. Liu, Y.-Y. Gu, L.-Y. Chu; *Soft Matter*, **2013**; 9, 4150-4159.
36. L. Meng, W. Huang, D. Wang, X. Huang, X. Zhu, D. Yan; *Biomacromolecules*, **2013**; 14, 2601-2610.
37. J. Zhuang, M. R. Gordon, J. Ventura, L. Li, S. Thayumanavan; *Chemical Society Reviews*, **2013**; 42, 7421-7435.
38. A. Rodríguez-Pulido, A. I. Kondrachuk, D. K. Prusty, J. Gao, M. A. Loi, A. Herrmann; *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, **2013**; 52, 1008-1012.

39. H. Brondsted, J. I. Kopecek, *pH-Sensitive Hydrogels*, in *Polyelectrolyte Gels* **1992**, American Chemical Society. p. 285-304.
40. T. Okano; *Springer*, **1993**; II, 180-197.
41. M. Shabayama, T. Tanaka; *Springer*, **1993**; I.
42. Y. Osada, J. Gong; *Progress in Polymer Science*, **1993**; 18, 187-226.
43. R. Yoshida, K. Sakai, T. Okano, Y. Sakurai; *Advanced drug delivery reviews*, **1993**; 11, 85-108.
44. S. Samarajeewa, R. Shrestha, M. Elsbahy, A. Karwa, A. Li, R. P. Zentay et al. K. L. Wooley; *Molecular Pharmaceutics*, **2013**; 10, 1092-1099.
45. Q. Zhang, N. Re Ko, J. Kwon Oh; *Chemical Communications*, **2012**; 48, 7542-7552.
46. M. Oak, R. Mandke, J. Singh; *Drug Discovery Today: Technologies*, **2012**; 9, e131-e140.
47. P. Froimowicz, H. Frey, K. Landfester; *Macromol Rapid Commun*, **2011**; 32, 468-73.
48. A. S. Hoffman, P. S. Stayton, V. Bulmus, G. Chen, J. Chen, C. Cheunget al. T. Miyata; *Journal of Biomedical Materials Research*, **2000**; 52, 577-586.
49. M. a. C. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Muller, C. Ober, M. Stamm et al. S. Minko; *Nat Mater*, **2010**; 9, 101-113.
50. W. Senaratne, L. Andruzzi, C. K. Ober; *Biomacromolecules*, **2005**; 6, 2427-2448.
51. C. L. Bayer, N. A. Peppas; *Journal of Controlled Release*, **2008**; 132, 216-221.
52. A. S. Hoffman; *Journal of Controlled Release*, **2008**; 132, 153-163.
53. Y. Lu, Y. Mei, M. Drechsler, M. Ballauff; *Angewandte Chemie International Edition*, **2006**; 45, 813-816.
54. Y. Lu, S. Proch, M. Schrinner, M. Drechsler, R. Kempe, M. Ballauff; *Journal of Materials Chemistry*, **2009**; 19, 3955-3961.
55. A. S. Hoffman; *Journal of Controlled Release*, **1987**; 6, 297-305.
56. S. H. Gehrke, G. P. Andrews, E. L. Cussler; *Chemical Engineering Science*, **1986**; 41, 2153-2160.
57. D. Guoqiang, R. Kaul, B. Mattiasson; *J. Chromatogr. A*, **1994**; 668, 145-152. .
58. A. G. Skirtach, A. Muñoz Javier, O. Kreft, K. Köhler, A. Piera Alberola, H. Möhwald et al. G. B. Sukhorukov; *Angewandte Chemie International Edition*, **2006**; 45, 4612-4617.
59. O. Kreft, A. M. Javier, G. B. Sukhorukov, W. J. Parak; *Journal of Materials Chemistry*, **2007**; 17, 4471-4476.
60. E. R. Gillies, T. B. Jonsson, J. M. J. Fréchet; *Journal of the American Chemical Society*, **2004**; 126, 11936-11943.
61. N. Laugel, C. Betscha, M. Winterhalter, J.-C. Voegel, P. Schaaf, V. Ball; *The Journal of Physical Chemistry B*, **2006**; 110, 19443-19449.
62. Y. Kakizawa, K. Kataoka; *Advanced drug delivery reviews*, **2002**; 54, 203-222.
63. M. Oishi, H. Hayashi, M. Iijima, Y. Nagasaki; *Journal of Materials Chemistry*, **2007**; 17, 3720-3725.
64. E. S. Lee, D. Kim, Y. S. Youn, K. T. Oh, Y. H. Bae; *Angewandte Chemie International Edition*, **2008**; 47, 2418-2421.
65. D. E. Discher, V. Ortiz, G. Srinivas, M. L. Klein, Y. Kim, D. Christian et al. F. Ahmed; *Progress in Polymer Science*, **2007**; 32, 838-857.
66. A. Blanz, S. P. Armes, A. J. Ryan; *Macromolecular Rapid Communications*, **2009**; 30, 267-277.
67. I. K. Voets, R. Fokink, T. Hellweg, S. M. King, P. D. Waard, A. D. Keizer, M. A. Cohen Stuart; *Soft Matter*, **2009**; 5, 999-1005.
68. M.-H. Li, P. Keller; *Soft Matter*, **2009**; 5, 927-937.
69. H.-C. Chiu, Y.-W. Lin, Y.-F. Huang, C.-K. Chuang, C.-S. Chern; *Angewandte Chemie International Edition*, **2008**; 47, 1875-1878.
70. S. Chatani, C. J. Kloxin, C. N. Bowman; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 2187-2201.
71. S. Dai, P. Ravi, K. C. Tam; *Soft Matter*, **2009**; 5, 2513-2533.
72. F. Ercole, T. P. Davis, R. A. Evans; *Polymer Chemistry*, **2010**; 1, 37-54.
73. L. A. Wells, F. Lasowski, S. D. Fitzpatrick, H. Sheardown; **2010**; 38, 487-509.

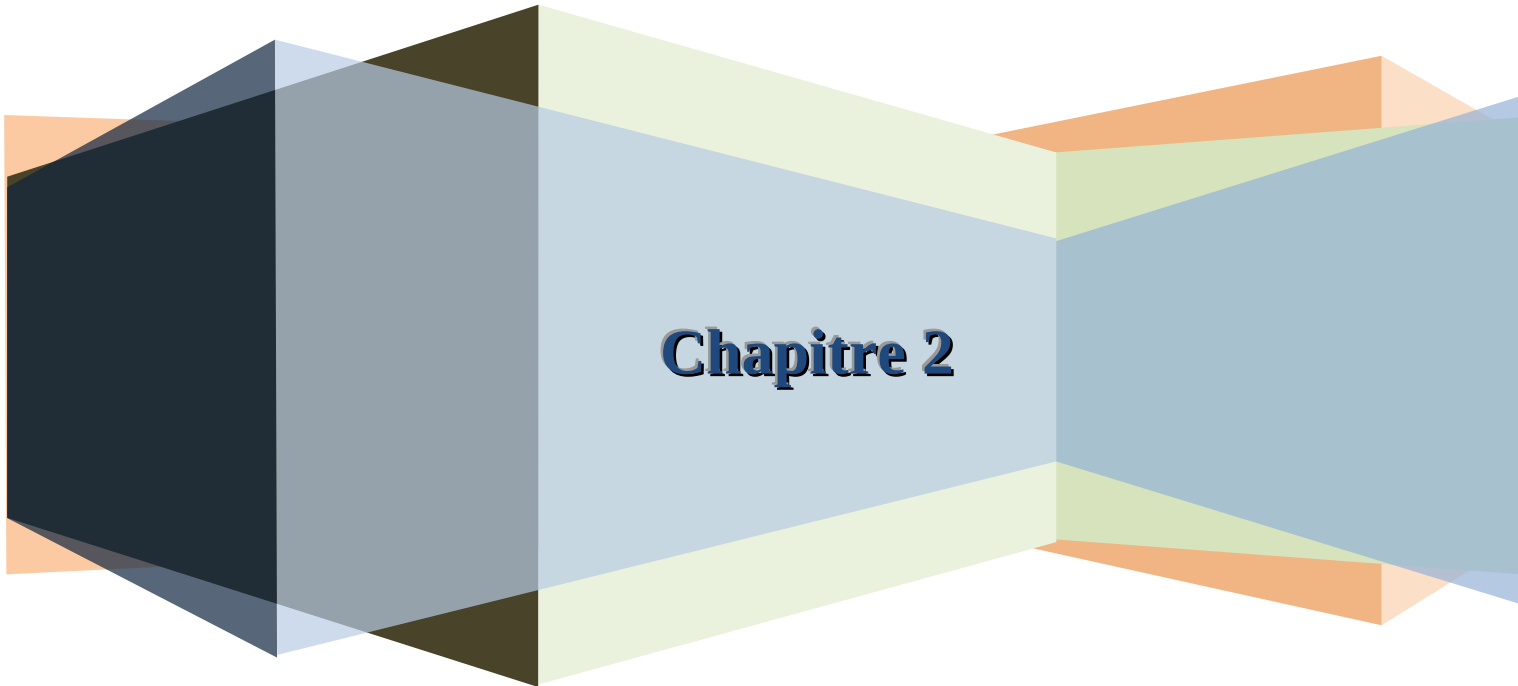
74. J.-P. Fouassier, J. F. Rabek; *Radiation Curing in Polymer Science and Technology Springer*, **1993**563.
75. Y. Zhao; *Journal of Materials Chemistry*, **2009**; 19, 4887-4895.
76. J.-M. Schumers, C.-A. Fustin, J.-F. Gohy; *Macromolecular Rapid Communications*, **2010**; 31, 1588-1607.
77. Y. Zhao; *Macromolecules*, **2012**; 45, 3647-3657.
78. G. Pasparakis, T. Manouras, P. Argitis, M. Vamvakaki; *Macromolecular Rapid Communications*, **2012**; 33, 183-198.
79. T. F. Scott, C. J. Kloxin, D. L. Forman, R. R. Mcleod, C. N. Bowman; *Journal of Materials Chemistry*, **2011**; 21, 14150-14155.
80. J.-F. Gohy, Y. Zhao; *Chemical Society Reviews*, **2013**; 42, 7117-7129.
81. Y. Huang, R. Dong, X. Zhu, D. Yan; *Soft Matter*, **2014**; 10, 6121-6138.
82. I. Tomatsu, K. Peng, A. Kros; *Advanced drug delivery reviews*, **2011**; 63, 1257-1266.
83. Q. Yan, D. Han, Y. Zhao; *Polymer Chemistry*, **2013**; 4, 5026-5037.
84. N. Fomina, J. Sankaranarayanan, A. Almutairi; *Advanced drug delivery reviews*, **2012**; 64, 1005-1020.
85. C. J. Barrett, J.-I. Mamiya, K. G. Yager, T. Ikeda; *Soft Matter*, **2007**; 3, 1249-1261.
86. G. Wang, X. Tong, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2004**; 37, 8911-8917.
87. X. Tong, G. Wang, A. Soldera, Y. Zhao; *The Journal of Physical Chemistry B*, **2005**; 109, 20281-20287.
88. W. Kirmse; *European Journal of Organic Chemistry*, **2002**; 2002, 2193-2256.
89. N. K. Urdabayev, V. V. Popik; *Journal of the American Chemical Society*, **2004**; 126, 4058-4059.
90. L. Sun, Y. Yang, C.-M. Dong, Y. Wei; *Small*, **2011**; 7, 401-406.
91. J. L. Mynar, A. P. Goodwin, J. A. Cohen, Y. Ma, G. R. Fleming, J. M. J. Frechet; *Chemical Communications*, **2007**2081-2082.
92. G.-Y. Liu, C.-J. Chen, D.-D. Li, S.-S. Wang, J. Ji; *Journal of Materials Chemistry*, **2012**; 22, 16865-16871.
93. G. Liu, W. Liu, C.-M. Dong; *Polymer Chemistry*, **2013**; 4, 3431-3443.
94. H. Zhao, E. S. Sterner, E. B. Coughlin, P. Theato; *Macromolecules*, **2012**; 45, 1723-1736.
95. R. K. O'reilly, C. J. Hawker, K. L. Wooley; *Chemical Society Reviews*, **2006**; 35, 1068-1083.
96. A. Guo, G. Liu, J. Tao; *Macromolecules*, **1996**; 29, 2487-2493.
97. J. Ding, G. Liu; *Macromolecules*, **1998**; 31, 6554-6558.
98. A. Lendlein, H. Jiang, O. Junger, R. Langer; *Nature (London)*, **2005**; 434, 879-882.
99. H. Yang, L. Jia, Z. Wang, A. Di-Cicco, D. Lévy, P. Keller; *Macromolecules*, **2011**; 44, 159-165.
100. S. Mavila, O. Eivgi, I. Berkovich, N. G. Lemcoff; *Chemical Reviews*, **2016**; 116, 878-961.
101. G. Kaur, P. Johnston, K. Saito; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 2171-2186.
102. P. Weiss; *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, **1983**; 21, 310-310.
103. D. Habault, H. Zhang, Y. Zhao; *Chemical Society Reviews*, **2013**; 42, 7244-7256.
104. X. Chen, M. A. Dam, K. Ono, A. Mal, H. Shen, S. R. Nutt et al. F. Wudl; *Science*, **2002**; 295, 1698-1702.
105. S. R. Trenor, T. E. Long, B. J. Love; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2004**; 205, 715-723.
106. M. Sierant, P. Paluch, M. Florczak, A. Rozanski, B. Miksa; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2013**; 111, 571-578.
107. Q. Jin, X. Liu, G. Liu, J. Ji; *Polymer*, **2010**; 51, 1311-1319.
108. J. T. Woodward, A. Ulman, D. K. Schwartz; *Langmuir*, **1996**; 12, 3626-3629.
109. G. O. Schenck, I. Von Wilucki, C. H. Krauch; *Chemische Berichte*, **1962**; 95, 1409-1412.
110. J. Mcmurry; *Ed. Howard and Laike, Brooks/Cole, USA*, **2004**; Ch 30, 1134-1151.
111. G. J. Fisher, H. E. Johns; *Photochemistry and Photobiology*, **1970**; 11, 429-444.
112. N. Tohnai, T. Sugiki, E. Mochizuki, T. Wada, Y. Inaki; *Journal of Photopolymer Science and Technology*, **1994**; 7, 91-92.
113. T. N. Solie, J. A. Schellman; *Journal of Molecular Biology*, **1968**; 33, 61-77.

114. R. Lisewski, K. L. Wierzchowski; *Photochemistry and Photobiology*, **1970**; 11, 327-347.
115. J.-O. Joswig, T. Lorenz, G. Seifert; *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **2014**; 228.
116. T. Wolff, H. Gorner; *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2004**; 6, 368-376.
117. W. G. Kim; *Journal of Applied Polymer Science*, **2008**; 107, 3615-3624.
118. A. P. Somlai, R. A. Cozad, K. A. Page, H. R. Williams, D. Creed, C. E. Hoyle; *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2008**; 7, 578-587.
119. M. J. Moghaddam, S. Hozumi, Y. Inaki, K. Takemoto; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **1988**; 26, 3297-3308.
120. J. Matsui, Y. Ochi, K. Tamaki; *Chemistry Letters*, **2006**; 35, 80-81.
121. J. He, Y. Zhao; *Dyes and Pigments*, **2011**; 89, 278-283.
122. M. D'auria, R. Racioppi; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2004**; 163, 557-559.
123. F. D. Lewis, S. V. Barancyk; *Journal of the American Chemical Society*, **1989**; 111, 8653-8661.
124. S. R. Trenor, A. R. Shultz, B. J. Love, T. E. Long; *Chemical Reviews*, **2004**; 104, 3059-3078.
125. M. Chen, S. P. Jensen, M. R. Hill, G. Moore, Z. He, B. S. Sumerlin; *Chemical Communications*, **2015**; 51, 9694.
126. J. He, L. Tremblay, S. Lacelle, Y. Zhao; *Soft Matter*, **2011**; 7, 2380-2386.
127. J. Jiang, B. Qi, M. Lepage, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2007**; 40, 790-792.
128. J. Babin, M. Lepage, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2008**; 41, 1246-1253.
129. H. Schlaad, C. Diehl, A. Gress, M. Meyer, A. L. Demirel, Y. Nur, A. Bertin; *Macromolecular Rapid Communications*, **2010**; 31, 511-525.
130. R. Hoogenboom; *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**; 48, 7978-7994.
131. W. H. Binder, H. Gruber; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2000**; 201, 949-957.
132. A. Levy, M. Litt; *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*, **1968**; 6, 63-72.
133. M. Lobert, H. M. L. Thijs, T. Erdmenger, R. Eckardt, C. Ulbricht, R. Hoogenboom, U. S. Schubert; *Chemistry – A European Journal*, **2008**; 14, 10396-10407.
134. K. Kempe, M. Lobert, R. Hoogenboom, U. S. Schubert; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2009**; 47, 3829-3838.
135. S. Cesana, A. Kurek, M. A. Baur, J. Auernheimer, O. Nuyken; *Macromolecular Rapid Communications*, **2007**; 28, 608-615.
136. P. Persigehl, R. Jordan, O. Nuyken; *Macromolecules*, **2000**; 33, 6977-6981.
137. K. Kempe, M. Lobert, R. Hoogenboom, U. S. Schubert; *Journal of Combinatorial Chemistry*, **2009**; 11, 274-280.
138. M. M. Bloksma, C. Weber, I. Y. Perevyazko, A. Kuse, A. Baumgärtel, A. Vollrath et al. U. S. Schubert; *Macromolecules*, **2011**; 44, 4057-4064.
139. M. Miyamoto, M. Shimakura, K. Tsutsui, K. Hasegawa, K. Aoi, S. Yamaga, T. Saegusa; *Macromolecules*, **1993**; 26, 7116-7124.
140. C. Taubmann, R. Luxenhofer, S. Cesana, R. Jordan; *Macromolecular Bioscience*, **2005**; 5, 603-612.
141. A. Levy, M. Litt; *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*, **1968**; 6, 1883-1894.
142. H. Malz, J. Pionteck, P. Pötschke, H. Komber, D. Voigt, J. Lustoň, F. Böhme; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2001**; 202, 2148-2154.
143. K. Lüdtke, R. Jordan, P. Hommes, O. Nuyken, C. A. Naumann; *Macromolecular Bioscience*, **2005**; 5, 384-393.
144. O. Glaied, C. Delaite, G. Hurtrez, M. Joubert, P. Dumas; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2005**; 43, 2440-2447.
145. K. Kempe, S. Jacobs, H. M. L. Lambermont-Thijs, M. M. W. M. Fijten, R. Hoogenboom, U. S. Schubert; *Macromolecules*, **2010**; 43, 4098-4104.
146. G. Cai, M. H. Litt; *Macromolecules*, **1992**; 25, 2277-2279.
147. M. Baumert, J. Zimmermann, J. Scherble, R. Mülhaupt, J. Kressler; *Macromolecules*, **1999**; 32, 2503-2510.

148. H. Malz, H. Komber, D. Voigt, I. Hopfe, J. Pionteck; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **1999**; 200, 642-651.
149. T. Saegusa, H. Ikeda, H. Fujii; *Polym J*, **1973**; 4, 87-92.
150. R. Luxenhofer, A. Schulz, C. Roques, S. Li, T. K. Bronich, E. V. Batrakova et al. A. V. Kabanov; *Biomaterials*, **2010**; 31, 4972-4979.
151. R.-H. Jin; *Journal of Materials Chemistry*, **2003**; 13, 672-675.
152. T. G. Bassiri, A. Levy, M. Litt; *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*, **1967**; 5, 871-879.
153. F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, M. Leenen, S. F. G. M. Van Nispen, M. Van Der Loop, C. H. Abeln et al. U. S. Schubert; *Macromolecules*, **2005**; 38, 7957-7966.
154. J. Y. Kim, S. U. Hong, J. Won, Y. S. Kang; *Macromolecules*, **2000**; 33, 3161-3165.
155. S. Kobayashi, M. Kaku, T. Saegusa; *Macromolecules*, **1988**; 21, 334-338.
156. E. F. J. Rettler, J. M. Kranenburg, H. M. L. Lambermont-Thijs, R. Hoogenboom, U. S. Schubert; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2010**; 211, 2443-2448.
157. W. Seeliger, E. Aufderhaar, W. Diepers, R. Feinauer, R. Nehring, W. Thier, H. Hellmann; *Angewandte Chemie*, **1966**; 78, 913-927.
158. D. A. Tomalia, D. P. Sheetz; *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*, **1966**; 4, 2253-2265.
159. T. Kagiya, S. Narisawa, T. Maeda, K. Fukui; *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*, **1966**; 4, 441-445.
160. F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, U. S. Schubert; *Macromolecular Rapid Communications*, **2004**; 25, 1739-1764.
161. O. C. Philippe Dubois, Jean-Marie Raquez Wiley, **2009** 425.
162. K. Aoi, M. Okada; *Progress in Polymer Science*, **1996**; 21, 151-208.
163. D. N. S. Prakash D. Trivedi; *Polymer Bulletin*, **1980**; 3, 37-44.
164. S. Kobayashi, H. Uyama, Y. Narita, J. Ishiyama; *Macromolecules*, **1992**; 25, 3232-3236.
165. T. Saegusa, S. Kobayashi, A. Yamada; *Die Makromolekulare Chemie*, **1976**; 177, 2271-2283.
166. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Macromolecules*, **2010**; 43, 5964-5970.
167. T. Saegusa, H. Ikeda; *Macromolecules*, **1973**; 6, 808-811.
168. R. Hoogenboom, M. W. M. Fijten, U. S. Schubert; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2004**; 42, 1830-1840.
169. F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, M. a. M. Leenen, M. a. R. Meier, U. S. Schubert; *Macromolecules*, **2005**; 38, 5025-5034.
170. O. Nuyken, G. Maier, A. Groß, H. Fischer; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **1996**; 197, 83-95.
171. M. Miyamoto, K. Naka, M. Tokumizu, T. Saegusa; *Macromolecules*, **1989**; 22, 1604-1607.
172. J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Leet et al. S. H. Thang; *Macromolecules*, **1998**; 31, 5559-5562.
173. K. Matyjaszewski; *Polymer International*, **1997**; 44, 111-111.
174. M. Litt, A. Levy, J. Herz; *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry*, **1975**; 9, 703-727.
175. B. Brissault, A. Kichler, C. Leborgne, O. Danos, H. Cheradame, J. Gauet et al. C. Guis; *Biomacromolecules*, **2006**; 7, 2863-2870.
176. R. Hoogenboom, B. Monnery, *Method for the preparation of uniform, high molar mass cyclic imino ether polymers*, Editor^Editors. **2016**, Google Patents.
177. K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert; *Angewandte Chemie International Edition*, **2010**; 49, 6288-6308.
178. *Food and Drug Administration Website*, consulté en octobre 2015; <http://www.accessdata.fda.gov>.
179. R. Leger, P. Ardt, G. Garratty, J. Armstrong, H. Meiselman, T. Fisher; *American association blood banks*, **2001** 18101 Glenbrook RD, Bethesda, MD 20814-2749 USA.

180. J. Armstrong, R. Leger, R. Wendy, H. Mieselman, G. Garratty, T. Fisher; *American society hematology*, **2003** 1900 M st. NW suite 200, Washington, DC 20036 USA.
181. T. X. Viegas, M. D. Bentley, J. M. Harris, Z. Fang, K. Yoon, B. Dizmanet al.F. M. Veronese; *Bioconjugate chemistry*, **2011**; 22, 976-986.
182. J. K. Armstrong, G. Hempel, S. Koling, L. S. Chan, T. Fisher, H. J. Meiselman, G. Garratty; *Cancer*, **2007**; 110, 103-111.
183. M. R. Sherman, M. G. P. Saifer, F. Perez-Ruiz; *Advanced drug delivery reviews*, **2008**; 60, 59-68.
184. R. Konradi, B. Pidhatika, A. Mühlebach, M. Textor; *Langmuir*, **2008**; 24, 613-616.
185. C. Fruijtier-Pölloth; *Toxicology*, **2005**; 214, 1-38.
186. R. Luxenhofer, G. Sahay, A. Schulz, D. Alakhova, T. K. Bronich, R. Jordan, A. V. Kabanov; *Journal of Controlled Release*, **2011**; 153, 73-82.
187. P. Goddard, L. E. Hutchinson, J. Brown, L. J. Brookman; *Journal of Controlled Release*, **1989**; 10, 5-16.
188. F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan, M. Essler; *Journal of Controlled Release*, **2007**; 119, 291-300.
189. M. Bauer, C. Lautenschlaeger, K. Kempe, L. Tauhardt, U. S. Schubert, D. Fischer; *Macromolecular Bioscience*, **2012**; 12, 986-998.
190. M. Bauer, S. Schroeder, L. Tauhardt, K. Kempe, U. S. Schubert, D. Fischer; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2013**; 51, 1816-1821.
191. J. H. Jeong, S. H. Song, D. W. Lim, H. Lee, T. G. Park; *Journal of Controlled Release*, **2001**; 73, 391-399.
192. G.-H. Hsiue, H.-Z. Chiang, C.-H. Wang, T.-M. Juang; *Bioconjugate chemistry*, **2006**; 17, 781-786.
193. M. C. Woodle, C. M. Engbers, S. Zalipsky; *Bioconjugate chemistry*, **1994**; 5, 493-496.
194. S. Zalipsky, C. B. Hansen, J. M. Oaks, T. M. Allen; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1996**; 85, 133-137.
195. R. Konradi, C. Acikgoz, M. Textor; *Macromolecular Rapid Communications*, **2012**; 33, 1663-1676.
196. N. Zhang, T. Pompe, I. Amin, R. Luxenhofer, C. Werner, R. Jordan; *Macromolecular Bioscience*, **2012**; 12, 926-936.
197. K. Naka, T. Nakamura, A. Ohki, S. Maeda; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **1997**; 198, 101-116.
198. H. P. C. Van Kuringen, J. Lenoir, E. Adriaens, J. Bender, B. G. De Geest, R. Hoogenboom; *Macromolecular Bioscience*, **2012**; 12, 1114-1123.
199. C.-H. Wang, K.-R. Fan, G.-H. Hsiue; *Biomaterials*, **2005**; 26, 2803-2811.
200. J. Ulbricht, R. Jordan, R. Luxenhofer; *Biomaterials*, **2014**; 35, 4848-4861.
201. M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, M. J. Vicent; *Polymer Chemistry*, **2011**; 2, 1900-1918.
202. C. A. Uraneck, H. L. Hsieh, O. G. Buck; *Journal of Polymer Science*, **1960**; 46, 535-539.
203. B. L. Farrugia, K. Kempe, U. S. Schubert, R. Hoogenboom, T. R. Dargaville; *Biomacromolecules*, **2013**; 14, 2724-2732.
204. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Macromolecular Rapid Communications*, **2012**; 33, 1600-1612.
205. J.-M. Lehn, *From Molecular to Supramolecular Chemistry*, in *Supramolecular Chemistry* **2006**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-9.
206. A. Gress, B. Smarsly, H. Schlaad; *Macromolecular Rapid Communications*, **2008**; 29, 304-308.
207. H. Schlaad, T. Krasia, M. Antonietti; *Journal of the American Chemical Society*, **2004**; 126, 11307-11310.
208. R. Hoogenboom, H. Schlaad; *Polymers*, **2011**; 3, 467.
209. C. Weber, R. Hoogenboom, U. S. Schubert; *Progress in Polymer Science*, **2012**; 37, 686-714.
210. M. M. Bloksma, M. M. R. M. Hendrix, U. S. Schubert, R. Hoogenboom; *Macromolecules*, **2010**; 43, 4654-4659.

211. A. L. Demirel, M. Meyer, H. Schlaad; *Angewandte Chemie International Edition*, **2007**; 46, 8622-8624.
212. E. F. J. Rettler, H. M. L. Lambermont-Thijs, J. M. Kranenburg, R. Hoogenboom, M. V. Unger, H. W. Siesler, U. S. Schubert; *Journal of Materials Chemistry*, **2011**; 21, 17331-17337.
213. C. Diehl, I. Dambowsky, R. Hoogenboom, H. Schlaad; *Macromolecular Rapid Communications*, **2011**; 32, 1753-1758.
214. C. Weber, M. Wagner, D. Baykal, S. Hoeppener, R. M. Paulus, G. Festag et al. U. S. Schubert; *Macromolecules*, **2013**; 46, 5107-5116.
215. C. Legros, M.-C. De Pauw-Gillet, K. C. Tam, D. Taton, S. Lecommandoux; *Soft Matter*, **2015**; 11, 3354-3359.
216. N. Morimoto, R. Obeid, S. Yamane, F. M. Winnik, K. Akiyoshi; *Soft Matter*, **2009**; 5, 1597-1600.
217. K. Kempe, R. Hoogenboom, S. Hoeppener, C.-A. Fustin, J.-F. Gohy, U. S. Schubert; *Chemical Communications*, **2010**; 46, 6455-6457.
218. T. R. Dargaville, R. Forster, B. L. Farrugia, K. Kempe, L. Voorhaar, U. S. Schubert, R. Hoogenboom; *Macromolecular Rapid Communications*, **2012**; 33, 1695-1700.
219. G. David, A. Ioanid; *Journal of Applied Polymer Science*, **2001**; 80, 2191-2199.
220. Y. Chujo, K. Sada, R. Nomura, A. Naka, T. Saegusa; *Macromolecules*, **1993**; 26, 5611-5614.
221. Y. Chujo, K. Sada, T. Saegusa; *Macromolecules*, **1990**; 23, 2693-2697.



Chapitre 2

Chapitre 2 : Auto-assemblage de polyoxazolines amphiphiles diblocs photo-stimulables

1. Introduction

Dans la littérature, comme explicité dans le chapitre 1, les polymères amphiphiles photo-sensibles, notamment ceux porteurs du chromophore coumarine, sont le plus souvent des **copolymères greffés** ayant de nombreux motifs photo-sensibles pendants le long de la chaîne polymère. Le principe de leur auto-assemblage dans l'eau consiste en la formation de nanoparticules dont le cœur est constitué de chaînes hydrophobes et **photo-réticulées** comme illustré sur la Figure 2-1 b). Or, à ce jour, la simple **photo-dimérisation** d'un cœur de nanoparticule constitué de chaînes hydrophobes enchevêtrées à partir d'un copolymère amphiphile **dibloc** portant un seul motif coumarine par chaîne Figure 2-1 a) n'a encore jamais été envisagée.

L'ambition de ce second chapitre réside donc dans l'étude d'un copolymère amphiphile dibloc photo-sensible porteur d'une unité coumarine à l'extrémité du bloc hydrophobe et d'un bloc hydrophile PMOx. L'auto-assemblage des polyoxazolines amphiphiles porteuses de chaînes alkyle étant bien connu, il semble intéressant d'ajouter un chromophore coumarine et d'étudier son impact sur l'auto-assemblage en solution en apportant une attention plus particulière à la morphologie des nanoparticules formées ainsi que sur leur stabilité (voir chapitre 5).

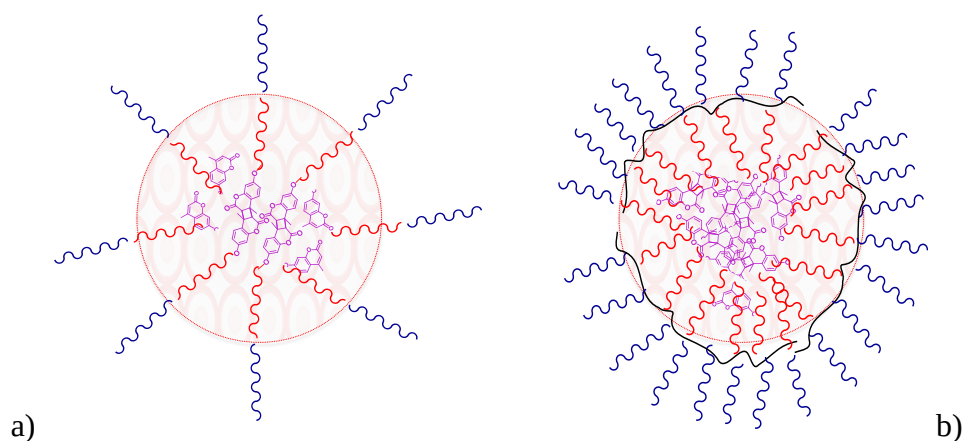


Figure 2-1 : Photo-dimérisation des chaînes polymères unes à unes (à gauche, Fig. 2-1 a)) et de photo-réticulation (à droite, Fig. 2-1 b)) d'assemblages de copolymères amphiphiles diblocs et hétérogréffés porteurs d'unités coumarine.

2. Voies de synthèse des copolymères amphiphiles diblocs

Grâce aux techniques de polymérisation actuelles, il est possible d'accéder à une grande diversité de copolymères à blocs tant en terme de nature chimique de bloc que de la taille des blocs. Ainsi, la grande variabilité de blocs disponibles permet de moduler de plus en plus finement les propriétés des copolymères en vue d'applications nécessitant des réponses spécifiques. Les différentes stratégies de synthèse de copolymères à blocs, en particulier le cas des copolymères diblocs A-B, ont largement été décrites.^{1, 2} Quatre grandes voies de synthèse peuvent être répertoriées comme illustré dans la Figure 2-2 :

- l'**addition séquentielle** (Figure 2-2 a)) permet d'accéder aux copolymères diblocs par polymérisation successive du premier monomère A puis du second monomère B. Cette stratégie nécessite l'utilisation de processus d'une polymérisation vivant et contrôlé afin de permettre la formation d'une espèce propageante stable assurant l'amorçage de la polymérisation du second monomère et de contrôler la longueur des blocs. Cette stratégie requiert donc des conditions de polymérisation strictes et ne peut pas être appliquée à toutes les natures de monomères,
- l'utilisation d'un **macroamorceur** (Figure 2-2 b)) capable d'amorcer la polymérisation d'un monomère B. Il s'agit d'une variante de la première stratégie. Elle permet d'associer des monomères de natures chimiques très différentes (à condition de modifier l'extrémité de chaîne), polymérisant selon des processus variés mais a l'inconvénient de souvent s'accompagner d'un mauvais contrôle des masses molaires du deuxième bloc en raison de l'encombrement stérique de l'amorceur,
- la troisième voie repose sur l'utilisation d'un **amorceur difonctionnel** (Figure 2-2 (c)). Cela débute par la formation du premier bloc polymère A à partir duquel le second bloc polymère B pourra croître. La deuxième étape revient alors à la stratégie du macroamorceur *via* la seconde extrémité de chaîne. Cette approche offre l'avantage de ne pas nécessiter de polymérisations vivantes car le deuxième bloc ne dépend pas du premier. L'inconvénient majeur est la difficulté de synthétiser des amorceurs *dual*,
- la dernière voie de synthèse repose sur le **couplage polymère-polymère** (Figure 2-2 d)) nécessite la synthèse préalable de blocs polymères fonctionnalisés en extrémité de chaîne par des groupements chimiques pouvant se lier de manière covalente selon des réactions de couplage spécifiques (Huisgen, thiol-ène, thiol-yne...). L'avantage de

cette stratégie provient de la grande variété de copolymères auxquels elle donne accès (nature chimique et procédé de polymérisation variés) mais l'efficacité du couplage reste dépendante de la réactivité des fonctions chimiques portées en extrémité de chaîne. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas de copolymères amphiphiles où deux chaînes antagonistes (l'une hydrophile l'autre hydrophobe) doivent réagir ensemble. De plus, la séparation des copolymères diblocs escomptés des blocs résiduels peut être parfois contraignante.

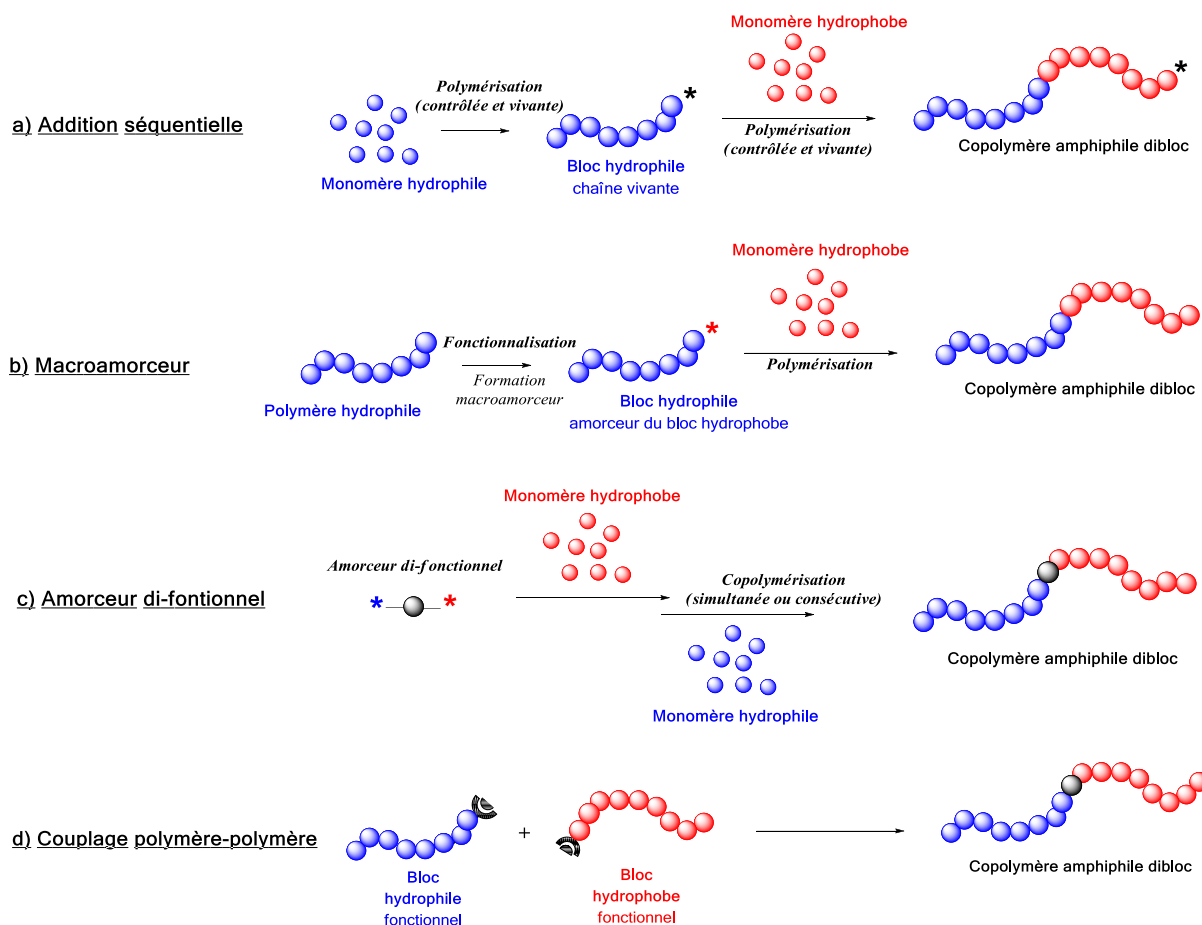


Figure 2-2 : Voies de synthèse des copolymères amphiphiles diblocs a) par addition séquentielle, b) par l'intermédiaire d'un macro-amorceur, c) d'un amorceur di-fonctionnel et d) par couplage polymère-polymère.

3. Inventaire des polyoxazolines amphiphiles diblocs

Les micelles polymères issues de copolymères amphiphiles connaissent un essor important dans les applications telles que la détergence, la stabilisation d'émulsions ou de dispersions et ceci pour leurs propriétés moussantes, émulsifiantes et leurs faibles valeurs de CAC.³ Parmi les nombreux copolymères à blocs amphiphiles existants, la grande majorité est constituée d'un bloc hydrophile PEG même si l'utilisation de POx est de plus en plus courante. Ici, en se limitant aux copolymères amphiphiles diblocs à base de POx, parmi les entités hydrophobes qui leur ont déjà été associées se trouvent les **polyesters** provenant de lactides comme le PEtOx-*b*-PLLA décrit par Hsiue et *al.*,⁴ de lactones : PEtOx-*b*-PCL décrit par Lee et *al.*⁵ Des **polycarbonates** ont également été associés aux POx comme le POx-*b*-poly(1,3-triméthylène carbonate) obtenu par ouverture de cycle du monomère correspondant.⁶ L'association à des **peptides** (PMOx-*b*-poly(L-phénylalanine)) est également à noter avec la formation de copolymères amphiphiles à blocs peptidique et pseudo-peptidique.⁷ Par ailleurs, plusieurs études sur l'association de **lipides** pour former des polyoxazolines lipidiques (lipoPOx) ont été menées, entre autres par notre équipe. Nous avons étudié des associations de chaînes grasses linéaires insaturées⁸ (dérivés oléiques) mais également des dérivés lipidiques de type triglycéride (huiles végétales de type huile de ricin⁹ ou de pépins de raisin¹⁰). Enfin, une étude approfondie des chaînes linéaires saturées C₁₂ et C₁₈ associées aux POx a été menée afin d'évaluer leur capacité d'auto-assemblage sous forme de nanoparticules sphériques de type cœur/couronne.¹¹

4. Notre stratégie de synthèse des polyoxazolines à structure diblocs amphiphiles

Les copolymères diblocs développés dans cette étude ont été synthétisés selon la stratégie dite du (macro)amorceur même si la faible masse molaire de l'amorceur (400 g/mol) peut être surprenante. Toutefois, n'oublions pas le caractère antagoniste, hydrophobe, de celui-ci par rapport au monomère. Cette stratégie, contrairement à la voie de couplage, donne exclusivement des copolymères diblocs sans résidu de monoblocs.

Le bloc hydrophobe CoumOH est constitué d'une chaîne aliphatique en C₁₁ possédant à une extrémité l'unité photo-sensible coumarine et à l'autre une fonction hydroxyle qui est ensuite convertie en fonction tosylate CoumOTs. Ce synthon CoumOTs sert d'amorceur hydrophobe

photo-sensible pour la polymérisation du monomère MOx et permet de générer le copolymère dibloc amphiphile photo-stimulable CoumPOx (Figure 2-3). Le terme de copolymère dibloc est employé ici bien que la structure développée ne corresponde pas exactement à la définition d'un copolymère puisque la partie hydrophobe n'est pas issue d'une polymérisation. L'efficacité de cet amorceur original de POx a conduit à l'élaboration d'une gamme de polymères amphiphiles diblocs variés en longueurs de bloc hydrophile POx.

Les polyoxazolines étant connues pour leur fort caractère hydrophile, leur association à des chaînes alkyle C_{11} au caractère hydrophobe marqué et porteuses d'une unité photo-sensible coumarine conduit à la formation de copolymères amphiphiles capables de s'auto-assembler en milieu aqueux de manière à former des agrégats de type micellaire au cœur photo-dimérisable par irradiation UV.

A travers ce travail, il semble intéressant de comparer l'auto-assemblage dans l'eau de C_n -POx linéaires (C_{12} -PMOx et C_{18} -PMOx) à une C_n -POx dans laquelle une chaîne en C_{11} éloigne le groupement coumarine photo-actif du bloc POx (cf publication ci-dessous).

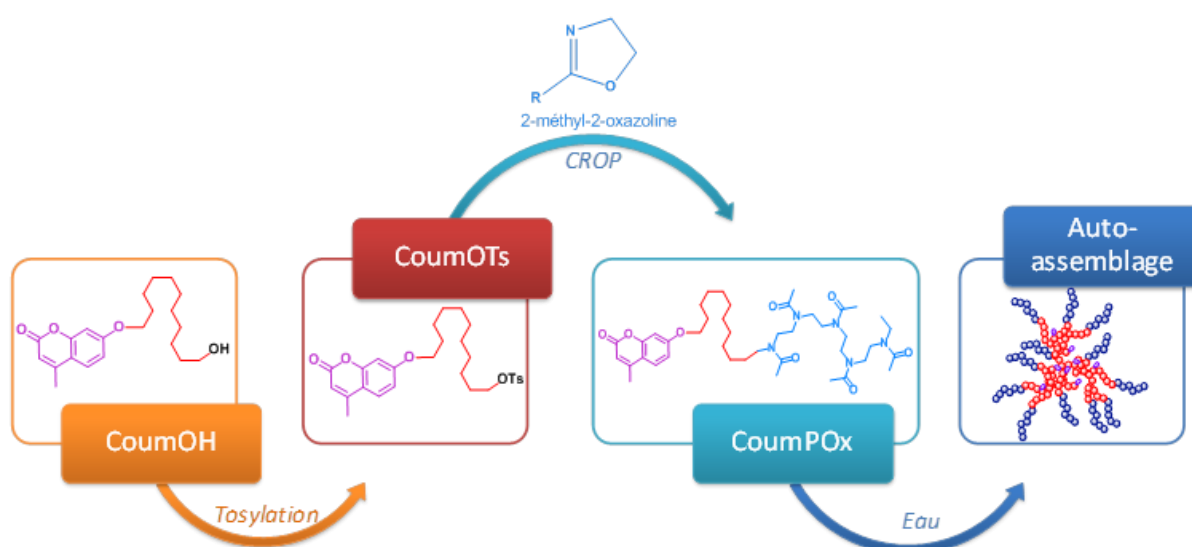


Figure 2-3 : Stratégie de synthèse et auto-assemblage des polyoxazolines linéaires amphiphiles diblocs CoumPOx.

5. Publication : *Photodimerization as an alternative to photocrosslinking of nanoparticles: proof of concept with amphiphilic linear polyoxazoline bearing coumarin unit*

L'étude présentée ci-après a pour objectif de mettre en évidence l'efficacité de cet amorceur de polymérisation cationique par ouverture de cycle (CROP) original CoumOTs pour accéder à des copolymères diblocs amphiphiles photo-stimulables CoumPOx. Il s'agit ensuite d'étudier l'auto-assemblage de ces derniers en milieu aqueux sous forme de nanoparticules au cœur photo-dimérisable en terme de morphologie et d'organisation mais également d'observer l'impact des unités chromophores coumarine sur ces derniers en les comparant à leurs homologues non photo-sensibles (C_{12} -POx), assemblés en solution dans les mêmes conditions. La publication est parue dans *Polymer Chemistry*, **2015**, 6, 6029.

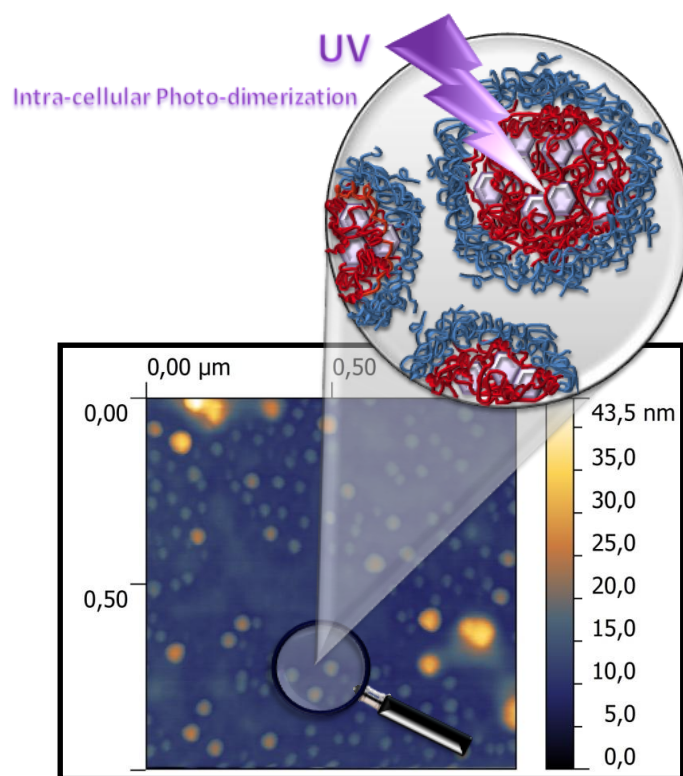


Figure 2-4 : Table of content of the publication.

Cite this: *Polym. Chem.*, 2015, 6, 6029

Photodimerization as an alternative to photocrosslinking of nanoparticles: proof of concept with amphiphilic linear polyoxazoline bearing coumarin unit †

Laetitia Korchia,^a Cécile Bouilhac,^a Vincent Lapinte,^{*a} Christophe Travelet,^{b,c} Redouane Borsali^{b,c} and Jean-Jacques Robin^a

Photosensitive amphiphilic linear polyoxazolines (CoumC11-POX_n) bearing alkyl chain decorated by a UV-active coumarin end group have been synthesized by cationic ring-opening polymerization (CROP). Using DLS and DOSY NMR experiments, their self-assemblies in water were compared with those of homologous photo-unreactive amphiphilic polyoxazolines (Cm-POX_n). In both cases, spherical nanoparticles with D_H-values around 10 nm were observed. The CoumC11-POX_n nanoparticles were illuminated upon $\lambda = 300$ nm inducing the photodimerization of the coumarin units located in the inner compartment of the nanoparticles. Finally, the pros and the cons of the photo-dimerization of linear copolymers related to the photo-crosslinking of graft copolymers were discussed.

Received 2nd June 2015,

Accepted 30th June 2015

DOI:10.1039/c5py00834d
www.rsc.org/Polymers

Introduction

Amphiphilic copolymers have for a long time attracted much attention due to their ability to self-assemble in selective solvents.¹²⁻¹⁷ Otherwise, stimuli-responsive polymeric systems including photo-responsive polymers provide an attractive tool for fabrication of tailored smart functional materials.¹⁸ Light permits photodimerization, photopolymerization, photocrosslinking, photoisomerization and photoinduced cyclization reactions.¹⁹ UV radiation is a simple and convenient form of energy that requires low temperature and inexpensive devices. Moreover the photochemistry is an energy-efficient process, limits the production of

wastes and the emission of volatile organic compounds (VOC). For these reasons, the photo-process can be classified as an environmentally friendly process. It is specially adapted to biosourced materials and thermally sensitive molecules, as this technology works at ambient temperature.²⁰ The photo-reaction can be achieved either by cycloaddition of photosensitive molecules (chromophore type) or by polyaddition of activated double bonds ((meth)acrylic monomers) under radical or cationic initiation. In this study, we focus on the macromolecules bearing chromophore moieties.

The use of UV irradiation in polymer field concerns the elaboration of soft materials like polymeric micelles and films. In fact, the self-organization in solution of amphiphilic polymers into micelles could occur under UV exposure inducing either by the crosslinking of the shell²¹ or of the core²² to control the macromolecular nanoscale size and shape,²³ to stabilize the assemblies,^{24, 25} to disperse single-walled carbon nanotubes²⁶ or the photo-degradation of the micelles to release a drug.^{27, 28} The crosslinking of films²⁹ or soft materials requires the synthesis of copolymers bearing photosensitive pendant groups able to react under UV exposure and transform free polymeric chain into 3D material. In a few other cases, α,ω -terminated polymers decorated by photosensitive end groups generate photo-cleavable single-chain nanoparticles³⁰ or have polymers capable of reversible chain extension.³¹ Several reviews describe [2 + 2] and [4 + 4] cycloaddition of the photosensitive moieties giving a cyclobutane dimer under UV exposure. The main photo-reactive chromophores include anthracene,³² cinnamic acid,^{33, 34} thymine, stilbene, benzophenone,³⁵ dimethylmaleimide³⁶ and coumarin.^{37, 38} We focus the discussion on the coumarin group which enables both UV light-induced chain cross-linking ($\lambda = 320$ nm) and chain scission ($\lambda = 254$ nm) *via* photo-dimerization by [2 + 2] cycloaddition and photo-cleavage of the chromophore, respectively.³⁰ Numerous applications of coumarin have already been described in biology and medicine as therapeutic agents (anti-HIV,^{39, 40} antibacterial, anti-hyper-proliferative, anticoagulant).⁴¹ They are also used in perfumes and cosmetics, in tobacco or as fluorescent tags and fluoroprobes for instance in herbicide detection. In polymer field,⁴² coumarin was applied in electro-optical applications such as photo-crosslinkable liquid crystalline polymers (LCP) (non-linear optical devices),⁴³ in photoactive surface applications where monolayers of liquid crystal polymers bearing coumarin were self-assembled on silicon and quartz,^{44, 45} in electroluminescent devices where colors ranged from red to violet by changing the coumarin derivative, in light and energy harvesting applications⁴⁶ and in lithography (Figure 2-5).⁴⁷

Otherwise, polyoxazolines (POx) represent valuable bio-inspired polymers with a pseudo-peptidic structure and are considered as an alternative to PEG. To date, they have mainly been investigated towards biomedical applications due to their biocompatibility, biodistribution, blood clearance and protein adsorption.^{48, 49} Well-defined POx are easily prepared by the cationic ring-opening polymerization (CROP) of cyclic 2-R-2-oxazolines and various properties are obtained in function of the nature of the R pendant alkyl chain (Me, Et, Pr, etc.). Many macromolecular architectures based on POx have already been described such as diblock or triblock copolymers bearing hydrophilic and/or hydrophobic 2-oxazolines only or obtained by combination with other polymerization process such as CROP-RITP⁵⁰ or click reaction between two blocks with terminal reactive end groups.⁵¹ Graft copolymers were also synthesized from macromonomers⁵² or by click reaction with pendant groups.⁵³ These successful syntheses were explained by the numerous possibilities of functionalization of POx using terminating agents⁵⁴ or initiators⁵⁵ as described in several recent reviews.⁵⁶ We can cite our recent work on the association of lipidic derivatives and vegetable oils to POx in order to elaborate amphiphilic LipoPOx.⁵⁷⁻⁶⁰

Polyoxazolines could be also decorated by photosensitive groups as previously described by David *et al.*⁶¹ They copolymerized in dispersion styrene and PMOx macromers with cinnamoyl end groups to obtain monodisperse micrometer size beads even though no UV study was described in this paper. Hoogenboom and Dargaville used another strategy with the modification of unsaturated pendant chain of poly(2-(dec-9-enyl)-2-oxazoline) by thiol-ene coupling under UV condition⁶² to crosslink the polymeric materials and form soft gels. Through this example, a photo-reaction occurred on POx in the presence of a photo-initiator even though no photo-sensitive group was bore by it. Inversely Chujo and Saegusa developed the photo-gelation of POx substituted by either anthracene^{63, 64} or coumarin⁶⁵ photo-sensitive group. These photosensitive polyoxazolines were produced in moderate yields after partially hydrolysis and amidation with coumarin derivative. The anthracene strategy consists in amidation of partially hydrolyzed POx by a derivative bearing both anthracenyl and dithioether moieties. The reversible redox reaction of disulfide groups enabled the interconversion between hydrogel and soluble polymer upon light irradiation.

To our knowledge, the amphiphilic linear POx bearing coumarin in terminal position of the backbone have never been described in the literature. In most cases, the reactive coumarin moieties are located in side-chain. They permit by crosslinking the elaboration of films, or of nano-objects by crosslinking of the micellar core or shell as illustrated in Figure 2-5. Crosslinking by photo-dimerization has been used commercially in the past decade for a wide

variety of purposes in paint, printing, adhesive, and dental industries as well as in the field of photo-resist.⁶⁵ Herein, we investigated the dimerization of amphiphilic linear polyoxazoline bearing a terminal coumarin unit. Thanks to a preliminary comparison between $C_m\text{-POx}_n$ and $\text{CoumC}_{11}\text{-POx}_n$, the influence of the coumarin unit on the self-organization in water was examined. Then, the dimerization of the inner part of the nanoparticles was studied in detail by dynamic light scattering and microscopy.

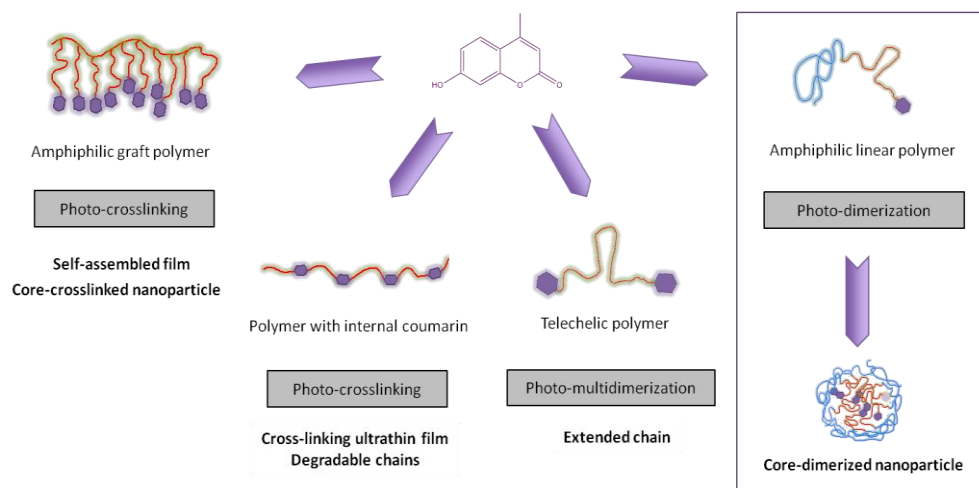


Figure 2-5: Overview of the macromolecular architectures containing coumarin unit and their applications.

Results and discussion

1-Synthesis of amphiphilic linear polyoxazolines

The amphiphilic diblock polyoxazolines composed of a linear alkyl chain and a hydrophilic block poly(2-methyl-2-oxazoline) are named $C_m\text{-POx}_n$ where m corresponds to the number of CH_2 units in the alkyl chain and n is the oxazoline monomer unit number. The termination step of cationic ring-opening polymerization (CROP) permits the addition of alcohol group at the end of the POx chains. We note that the synthesis of $C_m\text{-POx}_n$ using alkyl iodide initiator has previously been described by Volet *et al.*⁶⁶ Furthermore, Winnik described the same structures but 2-ethyl-2-oxazoline or 2-isopropyl-2-oxazoline monomers were replaced by 2-methyl-2-oxazoline.⁶⁷ An alternative structure to $C_m\text{-POx}_n$ includes the addition of 7-hydroxy-4-methylcoumarin unit at the end of the hydrophobic chain ($\text{CoumC}_{11}\text{-POx}_n$). The comparison of these amphiphilic polymers demonstrates the influence of additional UV-active coumarin moieties on the self-assembly of amphiphilic copolymers.

The first step of the $C_m\text{-POx}_n$ and $\text{CoumC}_{11}\text{-POx}_n$ synthesis is the preparation of the tosylated initiators from the corresponding alcohols (lauryl alcohol, stearyl alcohol and CoumOH)

(Figure 2-6). In the last case, a preliminary step is required to modify 7-hydroxy-4-methylcoumarin into CoumOH after adding C₁₁ extension chain. Finally, C_m-POx_n and CoumC₁₁-POx_n are synthesized through CROP of 2-methyl-2-oxazoline (MOx) in acetonitrile at 80°C for 15 hours before the termination step in the presence of methanolic potassium hydroxide.

The modification of 7-hydroxy-4-methylcoumarin into CoumOH and finally the CROP of MOx was monitored by ¹H NMR spectroscopy as illustrated in Figure 2-7. The tosylation was detected by the appearance of aromatic protons corresponding to Ts group at 7.80, 7.25 and 2.35 ppm as well as by the shift of the CH₂-O from 3.60 to 3.90 ppm. As expected, characteristic signals of the POx block, alkyl chain and coumarin moiety appeared in the ¹H NMR spectrum of CoumC₁₁-POx_n.

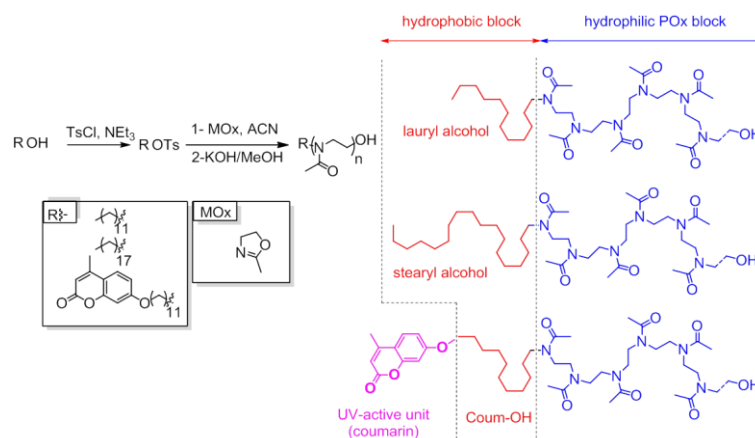


Figure 2-6 : Synthesis of C_m-POx_n and CoumC₁₁-POx_n amphiphilic polyoxazoline.

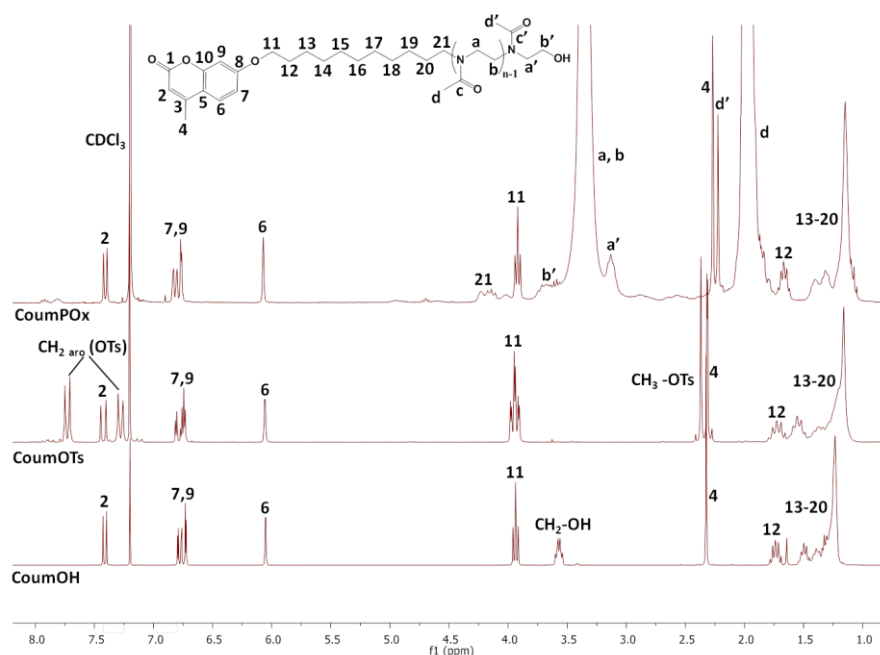


Figure 2-7: ¹H NMR spectra (300 MHz; CDCl₃) of CoumOH, Coum-OTs and CoumC₁₁-POx_n.

For C_m -PO x_n and CoumC $_{11}$ -PO x_n , various lengths of hydrophilic chain, n ranging from 12 to 34, were investigated as compiled in Table 2-1. The relatively low yields of the CROP, given in the experimental part, were explained by the low molecular weight ($M_n=3000-1000 \text{ g.mol}^{-1}$) of the PO x chains that is reluctant to precipitation phenomenon. The nature of the initiator has little influence on the dispersity of the polymer chains comprised between 1.1 and 1.3 as determined by SEC in DMF. M_{PHILE}/M_{TOT} ratio corresponding to the molecular weight of the hydrophilic PO x related to the total molecular weight of the amphiphilic polymer was also reported to bring out the hydrophilic character of all polymers. The percentage of hydrophilic groups per chain varied from 76 to 94%.

Table 2-1: C_m -PO x_n and CoumC $_{11}$ -PO x_n characteristics.

Copolymers	M_n^a [g.mol $^{-1}$]	$\bar{D}^a$ [-]	M_{PHILE}/M_{TOT}^b [%]	D_H^c [nm]
C$_{12}$-POx_{13}	1200	1.16	92	7.7
C$_{12}$-POx_{25}	2400	1.14	88	8.4
C$_{12}$-POx_{33}	2900	1.21	97	7.7
C$_{18}$-POx_{25}	3300	1.23	89	11.8
CoumC$_{11}$-POx_{13}	1500	1.26	74	9.0
CoumC$_{11}$-POx_{25}	2200	1.18	96	9.9
CoumC$_{11}$-POx_{33}	3200	1.30	88	9.4

^a: Determined by SEC in DMF using PMMA standards. ^b: $M_{PHILE}/M_{TOT} = 85n / M_{n, GPC}$. ^c: Value ± 0.2 nm, determined by DLS technique.

2-Self-organization of C_m -PO x_n and CoumC $_{11}$ -PO x_n

To examine the effect of the hydrophobic chains (C $_{12}$, C $_{18}$ and CoumC $_{11}$) on the self-assembly of the corresponding amphiphilic polymers, three candidates in PO x_{25} were investigated: C $_{12}$ -PO x_{25} , C $_{18}$ -PO x_{25} and CoumC $_{11}$ -PO x_{25} . Volet *et al.* have already estimated the CMC values of C $_{12}$ -PO x_n and C $_{18}$ -PO x_n polymers by fluorescence technique and studied the micelles by viscosimetry⁶⁸ and SANS.⁶⁶ Due to the quite pronounced hydrophilic character of the copolymers (Table 2-1), their self-assembly was studied in aqueous medium (ultrapure Milli-Q water) and the solutions were prepared by direct dissolution of the copolymers at 4 mg.mL $^{-1}$. Preliminary studies have been performed to check the effect of the copolymer concentration on the self-assembly: by DLS, similar D_H -values were measured between 4 and 16 mg.mL $^{-1}$ concentration range (*data not shown*). When C_m -PO x_n and CoumC $_{11}$ -PO x_n were directly

dissolved in water, they spontaneously self-assembled as deduced from dynamic light scattering (DLS) measurements. The auto-correlation functions were measured at different angles including 40, 90 and 140° leading to corresponding relaxation time distributions obtained using CONTIN analysis were reported in Figure 2-8.⁶⁹ Whatever the scattering angle, the autocorrelation functions ($g^{(2)}-1$) exhibit monomodal and quite narrow exponential decays. In all cases, the linear dependences of the relaxation frequency (Γ) on the square of the wave vector modulus (q^2) clearly indicate the Brownian diffusive motion of particles (Figure 2-8).

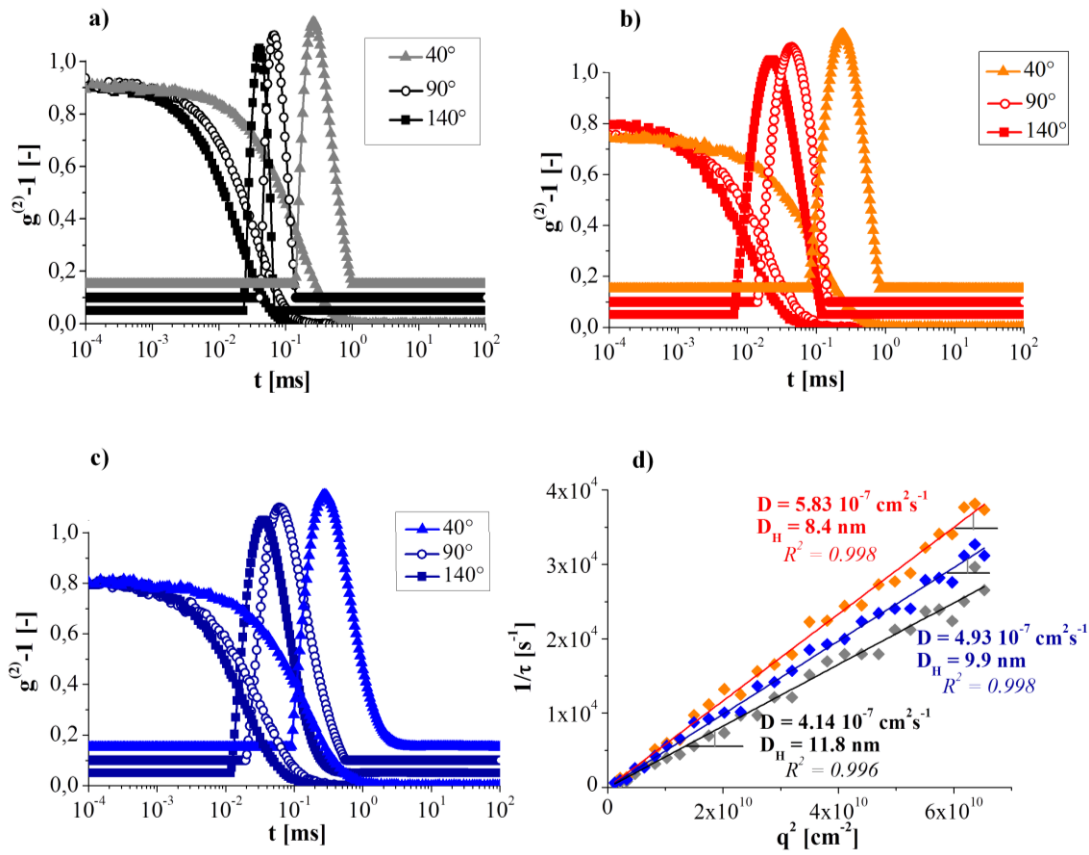


Figure 2-8: DLS results of (a) C_{18} -POx₂₅, (b) C_{12} -POx₂₅ and (c) Coum C_{11} -POx₂₅ directly dissolved at 4 mg.mL⁻¹ in water. (a, b, c): autocorrelation function ($g^{(2)}-1$) as a function of time (t) and relaxation time distribution at scattering angles of 40, 90 and 140°, and (d) dependence of Γ on q^2 from 15 up to 150° by step of 5° (coefficient of determination for the linear regression (R^2)).

The value of the slope is equal to the diffusion coefficient (D) of the particles from which the hydrodynamic diameter (D_H) is calculated using the Stokes-Einstein relation (Equation 1):

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta_0 D} \quad (1)$$

where k_B is the Boltzmann constant, T represents the absolute temperature of the sample and η_0 is the viscosity of the pure solvent (water in this case).^{70,71}

The calculated values of D_H are 8.4 and 11.8 nm for C_{12} -POx₂₅ and C_{18} -POx₂₅, respectively, and 9.9 nm for CoumC₁₁-POx₂₅. Indeed, whatever the scattering angle, the relaxation time decreases as follows $\tau_{C_{18}\text{-POx}_{25}} > \tau_{\text{CoumC}_{11}\text{-POx}_{25}} > \tau_{C_{12}\text{-POx}_{25}}$, reflecting the lower diffusion coefficients calculated for C_{18} -POx₂₅ and CoumC₁₁-POx₂₅.

In order to go deeper in the meaning of the results, DLS experiments were carried out in acetone, a good organic solvent for both alkyl and polyoxazoline blocks. For CoumC₁₁-POx₂₅, a D_H -value of 2.6 nm corresponding to an isolated single-polymer chain was measured (*data not shown*). This value seems consistent with the one of persistence length $l_p = 2.0$ nm previously calculated for the polyoxazoline chain and considered as a semi-flexible molecule by Volet *et al.*⁶⁶ We note that the notion of persistence length is strongly correlated to worm-like chain model^{72, 73} valid for semi-flexible polymers in dilute solution and could be used to estimate (although the molar mass is low) the mean-square diameter of gyration (D_G) according to Equation 2:

$$D_G^2 = \frac{4l_p L_c}{3} - 4l_p^2 + \frac{8l_p^3}{L_c} - \frac{8l_p^4}{L_c^2} \left[1 - \exp\left(-\frac{L_c}{l_p}\right) \right] \quad (2)$$

where L_c designates the contour length. For $n = 25$, making the hypotheses that the whole polymer chain behaves as the semi-flexible hydrophilic block and can be viewed as an alkyl chain with 16 carbon atoms (*vide infra*) (thus $n_{\text{apparent}} = 25 + (16/3) \approx 30$), we get $L_c = 10.2$ nm and $D_G = 4.0$ nm. Based on a D_H -value of 2.6 nm, a ratio $\rho = D_G/D_H = 4.0/2.6 = 1.5$ was calculated meaning the presence of monodisperse random coils made of a single linear chains in a theta solvent.

In contrast to DLS measurements performed in acetone, CoumC₁₁-POx_n exhibits in aqueous medium D_H -values of about 10 nm, which implies that single unimers are not present in water and that the copolymer chains are able to self-assemble into nanoparticles with size up to 11.8 nm (Figure 2-9). In addition, this result shows that the system is not compatible with the simple star-like micelle model⁷⁴ for which the characteristic expected diameter would be roughly $2L_c = 20.4$ nm. The D_H -values of other amphiphilic polymers, C_{12} -POx₂₅ and C_{18} -POx₂₅, are also reported in Figure 2-9.

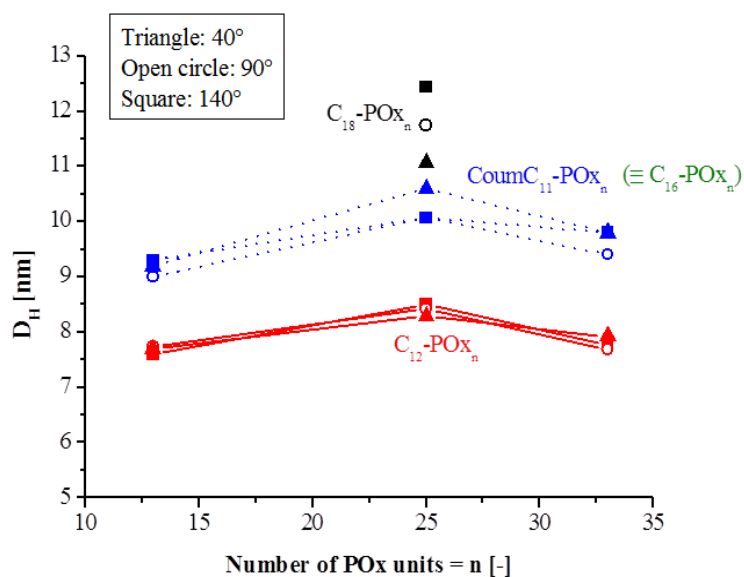


Figure 2-9: Hydrodynamic diameter (D_H) determined using DLS as a function of the length of POx block for C_{18} -POx_n, C_{12} -POx_n and CoumC₁₁-POx_n (direct dissolution in water at 4 mg mL⁻¹).

The copolymers differ not only by the length of their hydrophilic blocks but also by the size and nature of their hydrophobic parts (12 carbon atoms for C_{12} -POx_n, 18 for C_{18} -POx_n and 11 carbon atoms end-capped by a coumarin group for CoumC₁₁-POx_n). For a given hydrophobic block, it clearly appears that the D_H -values do not increase linearly with n but reach a maximum for $n = 25$ and a similar value for C_{12} -POx₁₃ and C_{12} -POx₃₃. The same trend was observed for CoumC₁₁-POx_n series. The size differences does not exceed 10%. Therefore, the length of the hydrophilic block has a poor influence on the size of the self-assembly of the copolymers in water. Several explanations can be given including the extension of the polyoxazoline chains in water and/or their low compactness. Besides, the contrast polymer/solvent may be not favorable under the experimental conditions. A similar behaviour has already been evidenced in a previous work on polyoxazoline-based copolymers.⁴⁹

The size of the self-assemblies was more sensitive to the hydrophobic block. Note that due to the cyclic character of the coumarin group, we hypothesized that the CoumC₁₁-POx_n copolymers amount to C_{16} -POx_n copolymers. The D_H -values increase with the length of the hydrophobic block. For instance, in the POx₂₅ series, D_H increases from 8.4, 9.9 to 11.8 nm for C_{12} -POx₂₅, CoumC₁₁-POx₂₅ (i.e. C_{16} -POx₂₅) and C_{18} -POx₂₅, respectively. More precisely, the D_H -values increase by 40% when the number of carbon of the hydrophobic block increases by 50%. The higher characteristic sizes observed for CoumC₁₁-POx_n (i.e. C_{16} -POx_n) and C_{18} -POx₂₅ in water may be explained by the necessity of having a higher aggregation number in order to assure an efficient stabilization by the hydrophilic block.⁴⁹ The sizes of the

self-assemblies are mainly controlled by the hydrophobic block length. Lastly, note that the characteristic size of the nanoparticles remains reasonably unchanged when varying the scattering angle (Figure 2-9), which implies that the systems are relatively monodisperses. So as to apprehend more closely and more finely the self-assembling behavior of CoumC₁₁-POx₂₅, ¹H diffusion ordered spectroscopy NMR (¹H DOSY NMR) was performed in D₂O as shown in Figure 2-10.⁷⁵⁻⁷⁷ It is noteworthy that this technique is appropriate for the diffusion coefficients such as $10^{-12} \leq D \leq 2 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$,⁷⁷ corresponding to D_H-values lower than *ca.* 490nm which is the case of CoumC₁₁-POx_n nanoparticles measured by DLS. Almost all the spots belonged to CoumC₁₁-POx₂₅ hydrogen atoms and they were aligned to a unique horizontal line at a $D = 4.57 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ corresponding to D_H of 10.7 nm. Moreover, the spot at a higher diffusion coefficient value was reasonably attributed to free water molecules ($\delta = 4.8 \text{ ppm}$).⁷⁸ A similar spectrum was recorded in D₂O for C₁₂-POx₂₄ giving a translational diffusion coefficient ($D = 6.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) and a D_H-value of 7.4nm. In both cases, these results are in good agreement with those determined by DLS (Table 2-1) and confirm the self-assembly behavior of the copolymers in water.

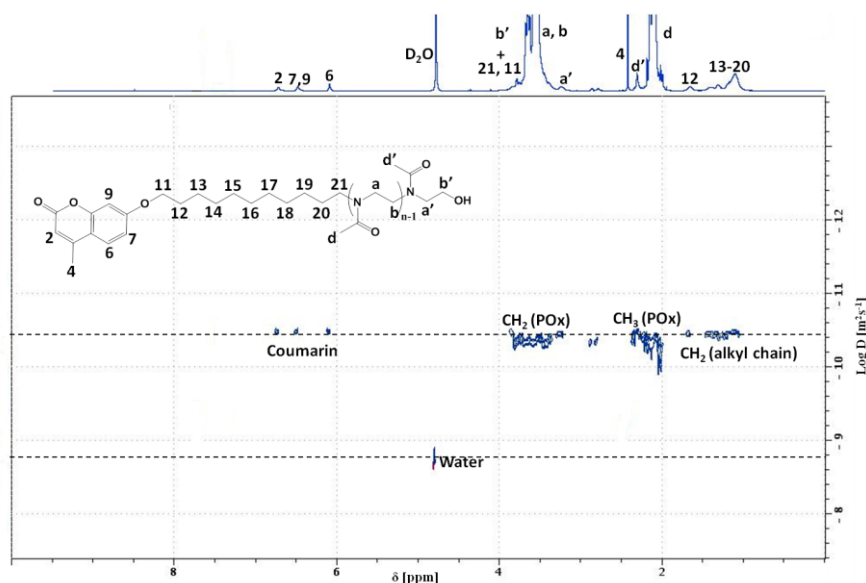


Figure 2-10: ¹H DOSY NMR spectrum (600 MHz; D₂O) of CoumC₁₁-POx₂₅ dissolved in water at 11.7 mg mL⁻¹.

3-Photo-dimerisation of self-assembled CoumC₁₁-POx_n

With regards to coumarinated polyoxazoline, CoumC₁₁-POx_n, a self-organization in water into nanoparticles constituted of a hydrophobic inner part composed of alkyl chains linked to a coumarin unit surrounded by a hydrophilic polyoxazoline chains was observed. The chromophores located in the nanoparticle inner part were dimerized under one hour of UV exposure at $\lambda = 300$ nm as illustrated in Figure 2-11.

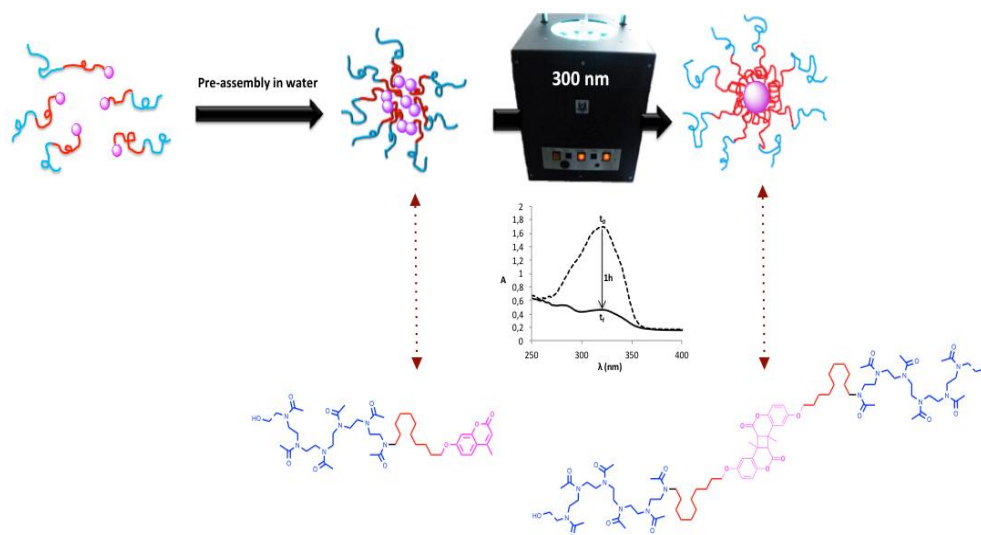


Figure 2-11: Principle of the photo-dimerization of self-organized CoumC₁₁-POx_n.

CoumC₁₁-POx_n in water were studied by DLS at various scattering angles before (Figure 2-8 c) and d)) and after UV-illumination (Figure 2-12). Whatever the scattering angle, the relaxation time distributions obtained from the autocorrelation functions exhibit, for all the systems, a bimodal exponential decay after UV-irradiation. They are shown at scattering angles of 40, 90 and 140° as illustrated for CoumC₁₁-POx₂₅ in Figure 2-12.

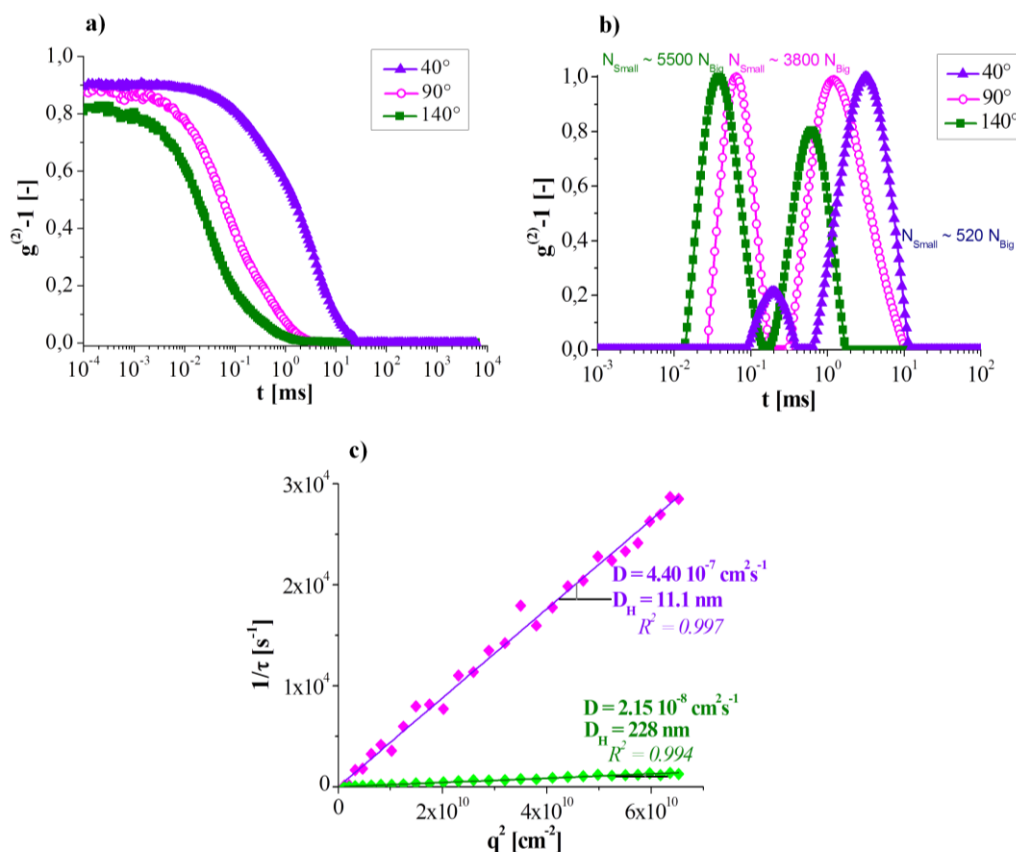


Figure 2-12: DLS results of CoumC₁₁-POx₂₅ directly dissolved at 4 mg.mL⁻¹ in water after UV-irradiation. (a, b) autocorrelation function ($g^{(2)}-1$) as a function of time (t) and relaxation time distribution at scattering angles of 40, 90 and 140°, and (c) dependence of Γ on q^2 from 15 up to 150° by step of 5° (coefficient of determination for the linear regression (R^2)).

Two distributions in size of nanoparticles co-existed with calculated D_H -values of 11.1 and 228 nm. The lower value is close to the size of the nanoparticles measured before UV-irradiation (*i.e.* 9.9 nm). After UV-irradiation, the appearance of bigger nanoparticles may originate from inter-particulate aggregations between smaller nanoparticles due to covalent binding *via* dimerization of coumarin groups belonging to different primary structures or to weak interactions (π - π interactions) between the self-assemblies. As expected, the bigger nanoparticles are predominant at low scattering angles. However, the fact that the slow relaxation mode (*i.e.* right hand side peak) has a surface area comparable (especially at 90°) with the one of the fast relaxation mode (*i.e.* left hand side peak) does not mean that an equal number of small and big nanoparticles are present. Indeed, DLS measurements are much more sensitive to the bigger objects than small ones.⁶⁸ Assuming that the present nanoparticles behave like hard-spheres in water and that all the nanoparticles have the same density, the percentage of small nanoparticles can be calculated using Equation 3:

$$\frac{N_{Small}}{N_{Big}} = \left(\frac{\tau_{Big}}{\tau_{Small}} \right)^3 \left(\frac{S_{Small}}{S_{Big}} \right) \quad (3)$$

where N_{Small} refers to the number of small nanoparticles (fast relaxation mode), τ_{Small} is the relaxation time corresponding to the small nanoparticles and S_{Small} represents the surface area under the peak related to the small nanoparticles.^{49,70} For example at 90°, we have $S_{Small} = 0.492$ a. u., $S_{Big} = 0.835$ a. u., $\tau_{Small} = 0.06524$ ms and $\tau_{Big} = 1.215$ ms. Thus, we get $N_{Small} \sim 3800 N_{Big}$. Therefore, the small nanoparticles represent 99.97% of the nanoparticles in number.

The D_H -values of the coumarin end-capped copolymers self-assemblies in water before and after UV-irradiation, calculated from the particle diffusion coefficients using the Stock-Einstein equation, are collected in Figure 2-13.

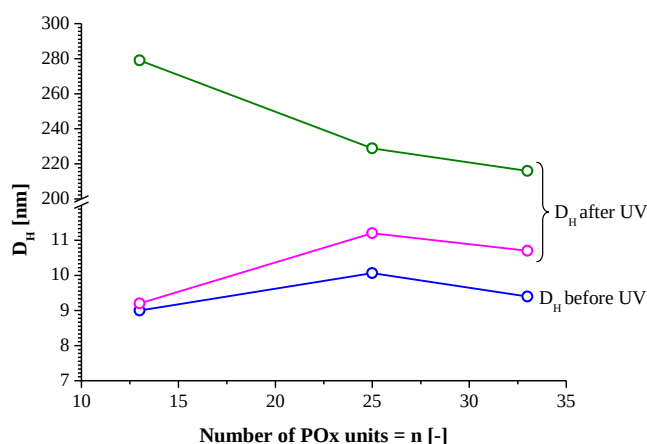


Figure 2-13: Hydrodynamic diameter (D_H) determined using DLS as a function of the length of the POx block for CoumC₁₁-POx_n before and after UV-irradiation (direct dissolution in water at 4 mg mL⁻¹).

As already mentioned, after UV-irradiation, two distributions in size of nanoparticles were observed by DLS. It is noteworthy that the evolution of the lowest D_H -values as a function of n follows a similar profile than the copolymer self-assemblies before UV-irradiation. Besides, the size of the small nanoparticles, observed after UV-irradiation, remains close to the starting ones with a maximum increase of only 14% for CoumC₁₁-POx₃₃. This relative difference tends to increase with the length of the hydrophilic block (from 2 to 14% for $n = 13$ to 33). The copolymer with short polyoxazoline block (CoumC₁₁-POx₁₃) is less hydrophilic than CoumC₁₁-POx₂₅ and CoumC₁₁-POx₃₃ (76% versus 86 and 89%, respectively - Table 2-1) and, consequently, has lower chain mobility within the self-assemblies in aqueous solution. The system is more confined and the inner part of the nanoparticles is more compact, limiting the possible re-organizations. With such frozen systems, the UV-irradiation may have a very

limited impact on the D_H -values of the copolymer self-assemblies. More hydrophilic systems (CoumC₁₁-POx₂₅ and CoumC₁₁-POx₃₃) may have a lower compactness enabling, to a certain extent, some mobility or re-organization of the copolymers within the suspended nanoparticles in water, especially under UV-irradiation. A slight increase of the size of the primary self-assemblies is observed in this case, accompanied by an increase of the aggregation number ($N_{Agg} = 41$ before UV *versus* 65 after UV, *vide infra*). However, note that this phenomenon is not proportional to the hydrophilic percentage of the copolymers.

Regarding the bigger nanoparticles formed after UV-irradiation, the characteristic size decreases when the length of the polyoxazoline block increases (from 279 nm for $n = 13$ to 216 nm for $n = 33$). The highest D_H -value measured for the copolymer with the shorter polyoxazoline chain (CoumC₁₁-POx₁₃) may be linked to the fact that, at a constant mass concentration, numerous chains are present when n is small. This implies that more coumarin end-groups are available in the system, which statistically increases the possibility of having coumarin-groups located in the outer part of the primary nanoparticles. Consequently, covalent binding *via* dimerization of coumarin groups belonging to different primary nanoparticles (provoking the sticking of several of them) is promoted! The access of the inner part of the nanoparticles may be easier with shorter polyoxazoline chains, which promotes inter-particles binding.

The aggregation number (N_{Agg}) of the nanoparticles before and after UV-irradiation, in the case of CoumC₁₁-POx₂₅, was deduced by a Zimm-like plot⁵⁷ after angular extrapolation towards small angles and at a given concentration ($dn/dC = 0.2773 \text{ mL g}^{-1}$) (*data not shown*). After extrapolation towards 0, the apparent mass-average molecular weight ($M_{w,app}$) was equal to $1.02 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ before UV, and after UV-irradiation to $1.61 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ for the primary nanoparticles and $4.21 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ for the big ones, implying N_{Agg} of *ca.* 41, 65 and 1706, respectively.

AFM imaging technique was performed on CoumC₁₁-POx₂₅ before and after UV-irradiation (Figure 2-14). Individual and well-defined nanoparticles with spherical shape were observed on the substrate. Statistical treatment carried out on more than 100 objects gave a main height ($H_{AFM, MAX}$) of 6.5 nm before UV-irradiation. After UV-irradiation, a main height of 6 nm was observed together with one secondary maximum at 22 nm.

$H_{AFM, MAX}$ obtained before UV-irradiation is in good agreement with the D_H of 9.9 nm measured by DLS. As expected, the DLS size is higher due to the swollen state of the self-assemblies in the presence of the solvent. Similar results were obtained after UV-irradiation for the small nanoparticles. Regarding the bigger objects corresponding to the secondary

maximum height of 22 nm, this value is more than 10 times lower than the D_H -value found by DLS ($D_H = 228$ nm). This difference may be due to a considerable shrinking upon drying of the self-assemblies. It may also be explained by an important subsidence of the big nanoparticles due to a weaker mechanical resistance in the unswollen state. Besides, it is worth noting that the secondary maximum height, observed in the histogram of AFM images after UV-irradiation, corresponds approximately to the quadruple size of the primary nanoparticles of $H_{AFM, MAX} = 6$ nm. This suggests that the bigger nanoparticles may originate from the coalescence of four small nanoparticles. The coalescence may be due to covalent bindings *via* coumarin-groups or more likely weaker interactions including coumarin-polyoxazoline or polyoxazoline-polyoxazoline. The last hypothesis doesn't seem valuable since after one hour of UV illumination of C_{12} -POx₂₅, no aggregation was observed. Moreover, the coumarin-coumarin interactions across the hydrophilic POx corona appeared unlikely. In brief, the amphiphilic linear polymers seem to be relevant macromolecular structures to obtain nanoparticles with photo-active inner part. Moreover, the synthesis of these polymers offers several advantages related to amphiphilic graft copolymers: i) elaboration of similar self-organizations using oligomers instead of high molecular weight polymers, ii) easy control of the hydrophilic-hydrophobic balance of the small polymers, iii) the end chain functionalization of polymers is compatible with various polymerization processes including radical polymerization, ionic polymerization such as CROP whereas the synthesis of graft copolymers is limited to radical polymerization with (meth)acrylate monomers, and iv) this synthetic pathway is versatile since amphiphilic linear copolymers can be synthesized using hydrophobic and hydrophilic comonomers as well as using antagonist monomers and macroinitiator (hydrophobic and hydrophilic and *vice versa*).

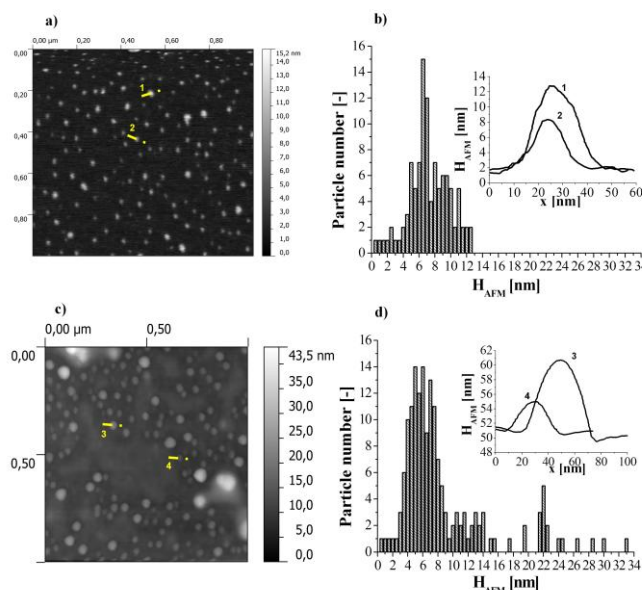


Figure 2-14: AFM topographic image in tapping mode using a monolithic silicon tip (a) before and (c) after UV-irradiation, and corresponding height (H_{AFM}) distribution after baseline correction over more than 100 self-assemblies (b) before and (d) after UV-irradiation and in inset associated topographic cross-section profile corresponding to the yellow line on the topographic images for $CoumC_{11}-POx_{25}$ at 0.08 mg mL^{-1} in water dropped onto silica wafer.

Experimental

Materials

2-Methyl-2-oxazoline (MOx) was dried and distilled from CaH_2 and stored under dry nitrogen atmosphere. Acetonitrile (ACN) was distilled before use and stored under dry nitrogen. 7-Hydroxy-4-methylcoumarin, 11-bromoundecanol, lauryl alcohol, stearyl alcohol, ether, chloroform, ethanol, methanol, *p*-toluenesulfonyl chloride (TsCl), triethylamine (Et_3N), pyridine, MgSO_4 , potash (KOH) and potassium carbonate (K_2CO_3) were used without further purification. Dialysis membranes Spectra/Por® - MWCO 500-800 were purchased from Spectrum Laboratories, Inc.

Measurements

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a NMR Bruker Avance I 300 MHz or on a Bruker Avance III 600 MHz spectrometers. The chemical shifts were in part per million (ppm), where (s) means a singlet, (d) a doublet, (t) a triplet, (m) a multiplet and (dd) a doublet of doublet. Chemical shifts (^1H NMR) were referenced to the peak of residual CHCl_3 at 7.26 ppm. Chemical shifts (^{13}C NMR) were referenced to CDCl_3 at 77 ppm. Diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY) experiments were performed on a Bruker Avance 3 at

20 °C in 2.5 mm microtubes operating at 600 MHz with D₂O as solvent. The software used was Top spin 2.1 using the exponential method with a logarithmic scale. Size exclusion chromatography (SEC) was performed on a Spectra-Physics apparatus equipped with an RI Shodex refractive index detector. Two PL-gel mix C columns were used at 70 °C with a 0.8 mL/min flow rate of DMF (0.1% LiBr), calibrated using poly(methylmethacrylate) standards. Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed using an ALV/CGS-8FS/N069 apparatus (from ALV) equipped with an ALV/LSE-5004 multiple τ digital correlator with a 125 ns initial sampling time (from ALV) and a 35mW red HeNe linearly polarized laser operating at a wavelength of 632.8 nm (from JDSU). The copolymer suspensions in water (direct copolymer dissolution in Milli-Q water - characterized by a resistivity of 18.2 M Ω cm - at a concentration of 4 mgmL⁻¹) were successively filtered through 0.45 and then 0.1 μ m hydrophilic PTFE syringe filters (from Millipore and Whatman, respectively), loaded in 10 mm diameter cylindrical cells and maintained at a constant temperature of 25.0 $\pm$ 0.1 °C prior to measurement. Data were collected at different scattering angles ranging from 20 to 154° (i.e. $4.59 \times 10^{-3} \leq q = (4\pi n/\lambda)\sin(\theta/2) \leq 2.58 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ in pure water where q represents the scattering vector modulus, n the refractive index of the pure solvent (water in this case), λ the wavelength of the incident light *in vacuo* and θ the scattering angle relative to the transmitted beam) by a step of 1° for a counting time of typically 60 s using the digital ALV correlator software. In dynamic light scattering (DLS), the relaxation time distribution was obtained using CONTIN analysis of the autocorrelation function ($g^{(2)}-1$).⁶⁹ In static light scattering (SLS), the scattering intensity was correlated by the solvent signal and normalized by the toluene signal. The scattering volume change with the scattering angle was also taken into account.

The UV-dimerization of the CoumC₁₁-POx_n was performed in a cylindrical photochemical reactor “Rayonnet” composed of 16 symmetrically placed lamps with emission maxima in two different ranges: 254 nm (UV-C) and 300 nm (UV-B). The samples were irradiated in quartz cuvettes (1 cm×1 cm×4.5 cm) placed on a circular rotating holder. UV-visible analyses were conducted with a Perkin Elmer - lambda 35 UV/Vis spectrometer equipped with PTP-1+1 Peltier System. Atomic Force Microscopy (AFM) was carried out using Innova™ (Bruker). Sample preparation was done as follows: silica wafers were thoroughly washed with Milli-Q water, acetone and then fuming nitric acid for 2 h. They were subsequently rinsed with Milli-Q water and acetone. Then, the aqueous copolymer suspensions at 0.08 mg mL⁻¹ were successively filtered through 0.45 and then 0.1 μ m hydrophilic PTFE syringe filter (from Millipore and Whatman, respectively) and 50 μ L were dropped onto silica wafers

which were allowed to dry for 4 days in an exicator under static vacuum in the presence of silica gel. In the case of samples analyzed after UV irradiation, 4 mg mL⁻¹ aqueous copolymer suspensions were successively filtered through 0.45 and then 0.1 µm hydrophilic PTFE syringe filter (from Millipore and Whatman), irradiated for 1 h under a wavelength of 300 nm using a “Rayonnet” apparatus, diluted 50 times and 50 µL were dropped onto silica wafers. Topography and phase signal images were recorded with a resolution of 512×512 data points. Images were obtained in tapping mode using silicon tips with a spring constant of 48 N m⁻¹ and a resonance frequency of approximately 190 kHz (Vista Probes, Phoenix, USA). The images were processed in Gwyddion open source software.

Synthesis of CoumOH

7-Hydroxy-4-methylcoumarin, K₂CO₃ (0.7 eq.) and 11-bromoundecanol (1.4 eq.) were dissolved in ethanol (0.25 M). The mixture was heated at 85°C for 20h before being cooled and precipitated in diethyl ether. The crude product was filtered, dried under vacuum and recrystallized from ethanol. After filtration and drying under vacuum, a white powder was obtained in 75% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ = 7.4 (d, 1H, H₂), 6.8 (d, 1H, H₇), 6.7 (s, 1H, H₉), 6.1 (s, 1H, H₆), 3.9 (t, 2H, H₁₁), 3.6 (m, 2H, H₂₁), 2.3 (s, 3H, H₄), 1.8 (m, 2H, H₁₂), 1.5-1.2 (m, 16H, H₁₃-H₂₀).

Synthesis of tosylated initiators: Tosylation of lauryl alcohol and stearyl alcohol: C₁₂-OTs and C₁₈-OTs

To a solution containing lauryl alcohol or stearyl alcohol in presence of 2 eq. of pyridine dissolved in chloroform (0.5 M), was added dropwise at 0°C and left at room temperature during 24 h a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (TsCl) in chloroform (0.5 M). The mixture was washed with water (3x), and saturated Cu(SO₄)₂ solution, dried over anhydrous MgSO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure to yield a white powder (65% in C₁₂-OTs and 70% in C₁₈-OTs).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ = 7.8 (d, 2H, CH_{aroTs}), 7.25 (2H, CH_{aroTs}), 3.9 (m, 2H, CH₂-OTs), 2.3 (s, 3H, CH_{3Ts}), 1.8-1.1 (m, 15 or 23H, CH₂ and CH_{3terminal}).

Tosylation of CoumOH: CoumOTs

A chloroform solution (1M) of TsCl (1.5 eq.) was added dropwise at 0°C to a chloroform solution (1M) of CoumOH and pyridine (2 eq.). The resulting solution was stirred at RT for 24h, filtered and washed with brine (3x). The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. A recrystallization from diethylether gave a white powder in 60% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ = 7.8 (d, 2H, CH_{aroTs}), 7.4 (d, 1H, H₂), 7.25 (2H, CH_{aroTs}), 6.8-6.7 (m, 2H, H₇ and H₉), 6.1 (s, 1H, H₆), 3.9 (m, 2H, CH₂-O-), 3.5 (m, 4H, H₁₁ and H₂₁), 2.35 (s, 3H, CH_{3Ts}), 2.3 (s, 3H, H₄), 1.8 (m, 2H, H₁₂), 1.5-1.2 (m, 16H, H₁₃-H₂₀). m_p = 62°C

Typical procedure of cationic Ring-Opening Polymerization (CROP) of MOx

Polymerizations were carried out under a dry nitrogen atmosphere. The initiator and MOx, according to [M]₀/[I]₀, were dissolved in dry acetonitrile (4 M). The solution was vigorously stirred at 80 °C for 15h. The product was quenched by addition of an adequate amount of methanolic potassium hydroxide (5 eq., 5 M). The flask was maintained at 30 °C for 4 h. After cooling, the polymer was isolated by slow precipitation from cold diethylether.

C₁₂-POX_n: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ = 3.7-3.2 (m, (4n+2)H, CH₂ POX and CH₂N_{alkyl chain}), 2.4-2.1 (m, 3n, CH₃ POX), 1.3 (m, 20H, CH₂ aliphatic), 0.9 (t, 3H, CH₃ aliphatic).

M_n, yield: 1210 g mol⁻¹, 51%; 2440 g mol⁻¹, 57%; 2880 g mol⁻¹, 69%.

C₁₈-POX_n: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ = 3.7-3.2 (m, (4n+2)H, CH₂ POX and CH₂N_{alkyl chain}), 2.4-2.1 (m, 3n, CH₃ POX), 1.3 (m, 32H, CH₂ aliphatic), 0.9 (t, 3H, CH₃ aliphatic).

M_n, yield: 3330 g mol⁻¹, 63%.

C_{coum}C₁₁-POX_n: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ = 7.4 (d, 1H, H₂), 6.8 (d, 1H, H₇), 6.7 (s, 1H, H₉), 6.1 (s, 1H, H₆), 4.2 (m, 2H, H₂₁), 3.9 (t, 2H, H₁₁), 3.7 (m, 2H, H_{b'}), 3.5-3.25 (m, (2n-2)H, H_a and H_b), 3.2 (m, 2H, H_{a'}), 2.25 (s, 3H, H₄), 2.2 (s, 3H, H_{d'}), 2.2-1.75 (m, (n-1)H, H_d), 1.75 (m, 2H, H₁₂), 1.5-1.2 (m, 16H, H₁₃-H₂₀).

M_n, yield: 1050 g mol⁻¹, 45%; 2140 g mol⁻¹, 42%; 2900 g mol⁻¹, 62%.

Conclusions

An efficient synthetic route to photo-active amphiphilic polyoxazolines decorated by coumarin end group, CoumC₁₁-POx_n, was described. The hydrophobic block CoumC₁₁ amounts to C₁₆ alkyl chain, intermediate between C₁₂-POx_n and C₁₈-POx_n. Similarly to C_m-POx_n, CoumC₁₁-POx_n self-organized in water into spherical nanoparticles with D_H-values around 10 nm. As observed with photo-crosslinkable copolymers, the UV-irradiation of photo-dimerizable copolymers CoumC₁₁-POx_n preserved the size of the nanoparticles. This study demonstrated that the linear amphiphilic copolymers constitute a promising alternative route to the graft copolymers for photo-active polymeric systems and the advantages were discussed. The response of the inner compartment of the nanoparticles indiscriminately occurred by photo-crosslinking of graft copolymers bearing pendant coumarin units or by photo-dimerization of linear polymers bearing terminal coumarin unit.

Acknowledgements

The authors thank the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”, the “Centre National de la Recherche Scientifique”, Institut Carnot Polynat and Labex Arcane (ANR-11-LABX-0003-01).for financial support. They are thankful to Aurélien Lebrun at the “Laboratoire de Mesures Physiques” in University of Montpellier and Isabelle Jeacomine at the “Centre de recherche sur les macromolécules végétales” for ¹H DOSY NMR. The authors acknowledge Dr. Frédéric Dubreuil, Carolina Noronha and Tiffany Gomez for AFM imaging, and Philippe Colin-Morel for dn/dC measurement.

Notes

^a Institut Charles Gerhardt Montpellier UMR5253 CNRS-UM-ENSCM, Equipe Ingénierie et Architectures Macromoléculaires, Université Montpellier – Bâtiment 17 – cc1702, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier cedex 5, France

^b Université Grenoble Alpes, CERMAV, F-38000 Grenoble, France

^c CNRS, CERMAV, F-38000 Grenoble cedex 9, France.

6. Compléments sur l'étude UV

6.1. Méthodologie de suivi de l'activité UV

Concernant l'irradiation UV abordée dans la publication précédente, afin d'évaluer le phénomène de dimérisation et sa réversibilité qui sont plus amplement détaillés dans le chapitre 5, plusieurs techniques de caractérisation ont été employées. Tout d'abord, par **analyse RMN**, l'irradiation UV des copolymères CoumPOx s'est traduite par un dédoublement des signaux des protons aromatiques des motifs coumarine mais non quantifiables dans ces conditions (mauvaise résolution des signaux). Bien que non exploitée, cette technique est plus amplement étudiée par la suite en chapitre 3 et se révèle utile pour des systèmes moins complexes. La photo-dimérisation des CoumPOx est suivie par deux techniques complémentaires : la **spectroscopie UV** et la **spectrofluorométrie** comme indiqués sur la Figure 2-15. Ces dernières montrent respectivement au fur et à mesure de la dimérisation (1h), une diminution soit de la bande d'absorption soit de la bande d'émission permettant ainsi de remonter au pourcentage de dimérisation (cf annexe A5.1., SI5-1). De la même façon, lors du phénomène inverse, la dé-dimérisation (10 min) est quantifiée à partir des mêmes bandes. La spectroscopie UV donne un spectre de moins bonne résolution avec un non retour à la ligne de base contrairement au spectre fluorimétrique. Cependant, cette dernière analyse requiert un balayage de l'irradiation qui empêche un suivi cinétique rapide, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes, au regard du temps d'acquisition (environ 5 min) de chaque spectre. Même si ces deux techniques mènent à des résultats similaires, la spectroscopie UV sera privilégiée dans la suite de l'étude.

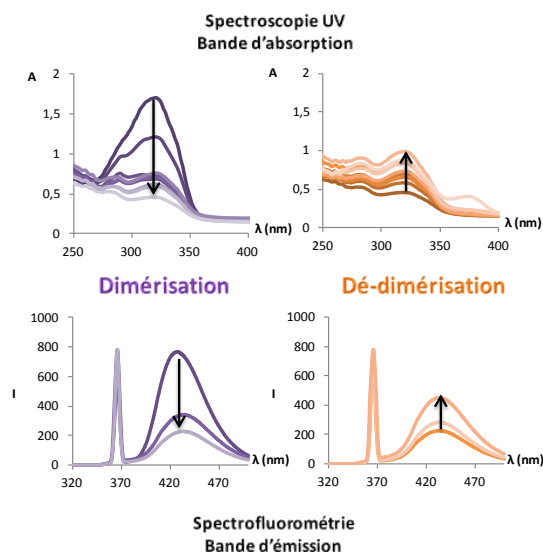


Figure 2-15 : Suivi spectroscopique UV et fluorimétrique des phénomènes de dimérisation (gauche) et dé-dimérisation (à droite).

6.2. Agrégation de nanoparticules sous UV

Comme montré précédemment par imagerie AFM (Figure 2-14) et DLS (Figure 2-13), la dimérisation des nanoparticules de CoumPOx entraîne l'apparition d'une population secondaire de taille plus élevée mais peu abondante. Cette observation s'est avérée d'autant plus marquée pour les assemblages non-filtrés (Figure 2-16 a) et b)), où initialement plus hétérogène la solution présente après irradiation une augmentation des tailles d'objets menant à des agrégats très polydisperses. Les clichés MET donnés dans la Figure 2-16 c) et d) et réalisés sur des solutions d'auto-assemblage préalablement filtrées (condition de mise en solution requise et définie lors des précédentes études pour une comparaison entre les copolymères homologues non stimulables C₁₂-POx et stimulables CoumPOx), révèlent comme escompté l'apparition d'une population secondaire de nanoparticules initialement homogènes en taille. Ainsi, Cette augmentation de taille, au vu des cliché b) et d), semble s'expliquer par une agrégation des objets après irradiation pouvant provenir de réactions de dimérisation inter-particulaires.

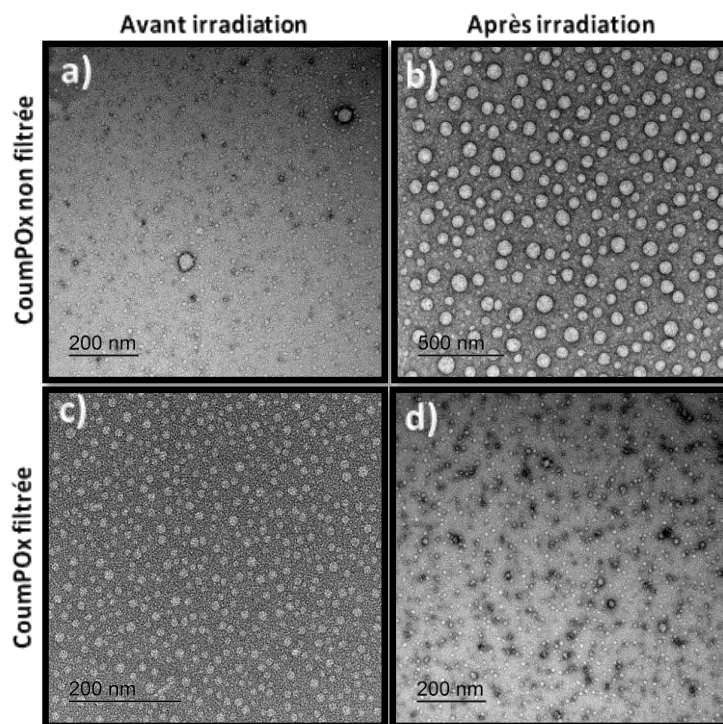


Figure 2-16 : Clichés MET réalisés sur les solutions non filtrées a) et b) et filtrées c) et d) des assemblages de CoumPOx avant a) et c) et après irradiation UV b) et d).

Ce phénomène d'aggrégation peut s'expliquer par une **hydrophilie partielle des groupements coumarine**. De ce fait, la mobilité des chaînes, permet leur positionnement non plus uniquement au cœur de l'objet mais également à l'interface cœur/couronne engendrant de ce fait une diminution de l'efficacité de dimérisation dû à l'éloignement des coumarines les unes des autres et favorisant, qui plus est, des réactions de dimérisation entre nanoparticules. Les couronnes de ces dernières n'étant pas compactes, lors de l'irradiation, ces dernières s'entremêlent et dimérisent de cœur à cœur donnant ce phénomène d'aggrégation. Afin de confirmer cette hypothèse d'hydrosolubilité partielle de la coumarine, une étude DLS a été réalisée sur la molécule modèle de départ, l'umbélliférone. Cette dernière normalement insoluble dans l'eau est en revanche totalement soluble dans l'acétone. Or, il s'est avéré que cette hydrophobie n'est pas totale puisqu'après mise en solution dans l'eau et filtration, le filtrat a révélé la présence de coumarine soluble comme le montre le cliché de la Figure 2-17 et les analyses DLS Figure 2-18. On observe que le comportement dans l'acétone (solvant de la coumarine), au regard de la coloration et des agrégats formés, est similaire à la partie solvatée dans l'eau. L'hypothèse d'une mauvaise définition du positionnement des unités coumarine est donc plausible. Pour parer à cela, une alternative est alors proposée dans le chapitre suivant (chapitre 3).



Figure 2-17 : Cliché photographique d'une solution de coumarine dans l'acétone (à gauche), de la partie soluble à l'eau (au centre) et de l'eau seule (à droite).

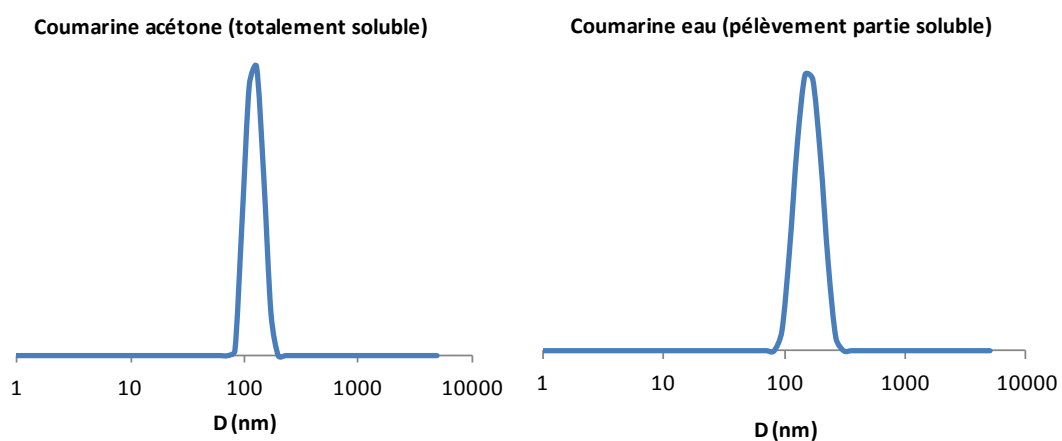


Figure 2-18 : DLS des solutions de coumarine dans l'acétone (à gauche) et de la partie soluble dans l'eau (à droite).

7. Conclusion

Au cours de ce second chapitre dédié à l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles photo-stimulables diblocs à base de polyoxazoline CoumPOx, la synthèse et la caractérisation (RMN 2D, GPC) de copolymères photo-sensibles alliant des chaînes de POx et des unités coumarine a été décrite. En alliant les propriétés d'hydrophobie et de photo-sensibilité de ces dernières aux POx, des nanoparticules au cœur photo-dimérisable ont pu être élaborées en milieu aqueux par **dissolution directe**. Ces dernières ont révélé des **morphologies sphériques** (AFM et MET) et **homogènes** de l'ordre de 10 nm (DLS, AFM, MET). Un **phénomène d'agrégation** sous UV, faisant apparaître des agrégats compris entre 200 et 300 nm, lié à des réactions de photo-dimérisation inter-particulaires a été envisagé. Ceci s'explique par le positionnement non défini des unités coumarine partiellement hydrophiles qui ne sont pas uniquement localisées au cœur de l'objet. Ces réactions inter-particulaires sont alors possibles par un entremêlement des couronnes, peu déployées, et un rapprochement des unités coumarine menant ainsi à leur agrégation.

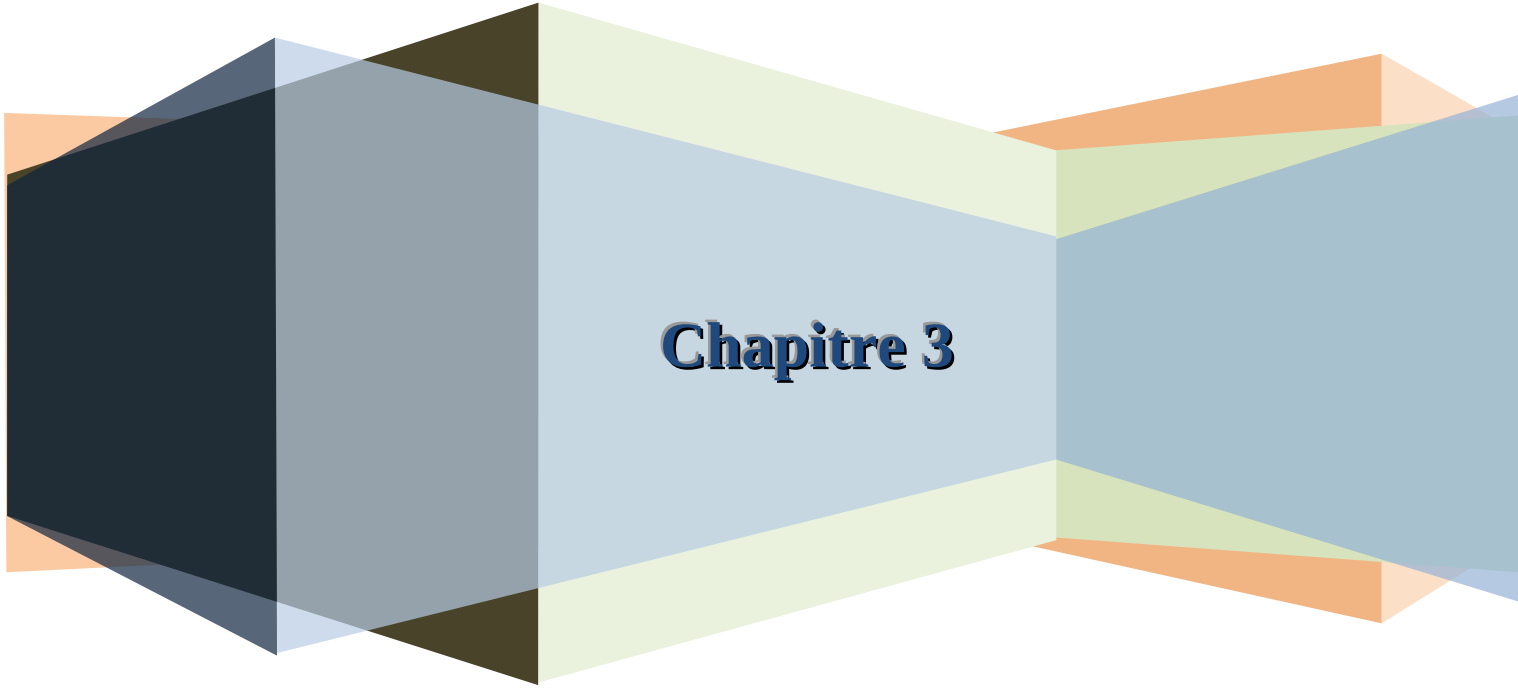
Pour parer à cela, la dimérisation avant l'auto-assemblage est envisagée, de manière à forcer le positionnement des coumarines au centre de l'objet. De plus, cela devrait assurer un maximum de dimérisation des coumarines. Une alternative est donc proposée dans le chapitre suivant reposant sur l'utilisation de triblocs photo-induits.

Références

1. D. Taton, Y. Gnanou, ed. *In Block Copolymers in Nanoscience*. Co, W. V. G., Ed. , ed. W.V.G. Co, Ed. 2006. 9-35.
2. K. Letchford, H. Burt; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2007**; 65, 259-269.
3. C. L. Giardi, V. Lapinte, C. Charnay; J. J. Robin; *React. Funct. Polym.*, **2009**; 69, 643-649.
4. G.-H. W. Hsiue; C.-L. Lo; C.-H. Wang; J.-P. Li; J.-L. Yang; *Int. J. Pharmaceut.*, **2006**; 317, 69-75.
5. Y. Lee; J.-S. Yoon; C. Kim; I. C. Kwon; Y.-H. Kim; S. Y. Jeong; *Macromolecules*, **1999**; 32, 1847-1852.
6. C. Kim, S. C. Lee, J. H. Shin, J.-S. Yoon, I. C. Kwon, S. Y. Jeong; *Macromolecules*, **2000**; 33, 7448-7452.
7. K. A. Tsutsumiuchi, K.; Okada, M.; *Macromolecules*, **1997**; 30, 4013-4017.
8. A. El Asmar, O. Gimello, G. Morandi, D. Le Cerf, V. Lapinte, F. Burel; *Macromolecules*, **2016**.
9. C. Giardi, V. Lapinte, F. Nielloud, J.-M. Devoisselle, J.-J. Robin; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2010**; 48, 4027-4035.
10. M. Stemmelen, F. Pessel, V. Lapinte, S. Caillol, J. P. Habas, J. J. Robin; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2011**; 49, 2434-2444.
11. C. Travelet, M. Stemmelen, V. Lapinte, F. Dubreuil, J.-J. Robin, R. Borsali; *Journal of Nanoparticle Research*, **2013**; 15, 1-16.
12. Y. Mai, A. Eisenberg; *Chemical Society Reviews*, **2012**; 41, 5969-5985.
13. T. P. Lodge; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2003**; 204, 265-273.
14. C. Bouilhac, E. Cloutet, D. Taton, A. Deffieux, R. Borsali, H. Cramail; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2009**; 47, 197-209.
15. C. Bouilhac, E. Cloutet, D. Taton, A. Deffieux, R. Borsali, H. Cramail; *Macromolecules*, **2008**; 41, 7321-7329.
16. C. Giacomelli, V. Schmidt, K. Aissou, R. Borsali; *Langmuir*, **2010**; 26, 15734-15744.
17. C. Travelet, C. Bouilhac, J.-J. Robin, R. Borsali; *Soft Matter*, **2014**; 10, 7545-7557.
18. *Photochemistry and Photophysics of Polymer Materials*. John Wiley & Sons, Inc ed **2010**: John Wiley & Sons, Inc.
19. S. Chatani, C. J. Kloxin, C. N. Bowman; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 2187-2201.
20. L. Fertier, H. Koleilat, M. Stemmelen, O. Giani, C. Joly-Duhamel, V. Lapinte, J. J. Robin; *Progress in Polymer Science*, **2013**; 38, 932-962.
21. E. S. Read, S. P. Armes; *Chemical Communications*, **2007** 3021-3035.
22. Y. Zhao; *Macromolecules*, **2012**; 45, 3647-3657.
23. Y. Zhao; *Journal of Materials Chemistry*, **2009**; 19, 4887-4895.
24. J. Jiang, B. Qi, M. Lepage, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2007**; 40, 790-792.
25. K. B. Thurmond, H. Huang, C. G. Clark, T. Kowalewski, K. L. Wooley; *Colloids and surfaces B*, **1999**; 16, 45-54.
26. M. G. Mohamed, K.-C. Hsu, S.-W. Kuo; *Polymer Chemistry*, **2015**; 6, 2423-2433.
27. Q. Zhang, N. Re Ko, J. Kwon Oh; *Chemical Communications*, **2012**; 48, 7542-7552.
28. R. H. Huyck, S. R. Trenor, B. J. Love, T. E. Long; *Journal of Macromolecular Science*, **2008**; 40, 9-15.
29. J. Lee, M. V. S. N. Maddipatla, A. Joy, B. D. Vogt; *Macromolecules*, **2014**; 47, 2891-2898.
30. W. Fan, X. Tong, Q. Yan, S. Fu, Y. Zhao; *Chemical Communications*, **2014**; 50, 13492-13494.
31. S. R. Trenor, T. E. Long, B. J. Love; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2004**; 205, 715-723.
32. Y. Shi, R. M. Cardoso, C. F. Van Nostrum, W. E. Hennink; *Polymer Chemistry*, **2015**; 6, 2048-2053.
33. Q. Bian, Y. Xiao, C. Zhou, M. Lang; *Journal of Colloid and Interface Science*, **2013**; 392, 141-150.

34. Y. Li, Y. Tang, K. Yang, X. Chen, L. Lu, Y. Cai; *Macromolecules*, **2008**; 41, 4597-4606.
35. J. S. Kim, J. H. Youk; *Polymer*, **2009**; 50, 2204-2208.
36. D. Roy, B. S. Sumerlin; *Macromolecular Rapid Communications*, **2014**; 35, 174-179.
37. J.-F. Gohy, Y. Zhao; *Chemical Society Reviews*, **2013**; 42, 7117-7129.
38. G. Kaur, P. Johnston, K. Saito; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 2171-2186.
39. T. Tanaka, T. Kumamoto, T. Ishikawa; *Tetrahedron Letters*, **2000**; 41, 10229-10232.
40. M. Suzuki, Y. Li, P. C. Smith, J. A. Swenberg, D. E. Martin, S. L. Morris-Natschke, K.-H. Lee; *Med. Res. Rev.*, **2003**; 23, 322.
41. M. A. Musa, J. S. Cooperwood, M. O. F. Khan; *Curr Med Chem.*, **2008**; 15, 2664-2679.
42. S. R. Trenor, A. R. Shultz, B. J. Love, T. E. Long; *Chem. Rev.*, **2004**; 104, 3059-3078.
43. Gangadhara, K. Kishore; *Macromolecules*, **1995**; 28, 806-815.
44. J. Fang, C. Whitaker, B. Weslowski, M.-S. Chen, J. Naciri, R. Shashidhar; *Journal of Materials Chemistry*, **2001**; 11, 2992-2995.
45. H.-C. Lin, K.-W. Lee, C.-M. Tsai, K.-H. Wei; *Macromolecules*, **2006**; 39, 3808-3816.
46. J. Serin, X. Schultze, A. Adronov, J. M. J. Fréchet; *Macromolecules*, **2002**; 35, 5396-5404.
47. H. Lin, X. Wan, Z. Li, X. Jiang, Q. Wang, J. Yin; *ACS applied materials & interface*, **2010**; 2, 2076-2082.
48. R. Hoogenboom, H. Schlaad; *Polymers*, **2011**; 3, 467-488.
49. R. Hoogenboom; *Angewandte Chemie-International Edition*, **2009**; 48, 7978-7994.
50. D. Rayeroux, V. Lapinte, P. Lacroix-Desmazes; *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, **2012**; 50, 4589-4593.
51. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, **2013**; 51, 1118-1128.
52. C. Weber, M. Wagner, D. Baykal, S. Hoeppener, R. M. Paulus, G. Festag et al. U. S. Schubert; *Macromolecules*, **2013**; 46, 5107-5116.
53. B. Guillermin, V. Darcos, V. Lapinte, S. Monge, J. Coudane, J.-J. Robin; *Chemical Communications*, **2012**; 48, 2879-2881.
54. C. Alexis, C. Charnay, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Progress in Organic Coatings*, **2013**; 76, 519-524.
55. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Macromolecules*, **2010**; 43, 5964-5970.
56. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Macromolecular Rapid Communications*, **2012**; 33, 1600-1612.
57. C. Giardi, V. Lapinte, C. Charnay, J. J. Robin; *Reactive & Functional Polymers*, **2009**; 69, 643-649.
58. C. Giardi, V. Lapinte, F. Nielloud, J.-M. Devoisselle, J.-J. Robin; *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, **2010**; 48, 4027-4035.
59. M. Stemmelen, C. Travelet, V. Lapinte, R. Borsali, J.-J. Robin; *Polymer Chemistry*, **2013**; 4, 1445-1458.
60. C. Travelet, M. Stemmelen, V. Lapinte, F. Dubreuil, J.-J. Robin, R. Borsali; *Journal of Nanoparticle Research*, **2013**; 15.
61. G. David, A. Ioanid; *Journal of Applied Polymer Science*, **2001**; 80, 2191-2199.
62. T. R. Dargaville, R. Forster, B. L. Farrugia, K. Kempe, L. Voorhaar, U. S. Schubert, R. Hoogenboom; *Macromolecular Rapid Communications*, **2012**; 33, 1695-1700.
63. Y. Chujo, K. Sada, R. Nomura, A. Naka, T. Saegusa; *Macromolecules*, **1993**; 26, 5611-5614.
64. Y. Chujo, K. Sada, A. Naka, R. Nomura, T. Saegusa; *Macromolecules*, **1993**; 26, 883-887.
65. Y. Chujo, K. Sada, T. Saegusa; *Macromolecules*, **1990**; 23, 2693-2697.
66. G. Volet, L. Auvray, C. Amiel; *The Journal of Physical Chemistry B*, **2009**; 113, 13536-13544.
67. R. Obeid, E. Maltseva, A. F. Thünemann, F. Tanaka, F. M. Winnik; *Macromolecules*, **2009**; 42, 2204.
68. G. Volet, L. Auvray, C. Amiel; *Macromolecules*, **2005**; 38, 5190-5197.
69. S. W. Provencher; *Die Makromolekulare Chemie*, **1979**; 180, 201-209.
70. A. G. Dal Bó, V. Soldi, F. C. Giacomelli, C. Travelet, B. Jean, I. Pignot-Paintrand et al. S. Fort; *Langmuir*, **2012**; 28, 1418-1426.

71. K.-F. Arndt, G. Müller; *Polymercharakterisierung*, Hanser, Munich, 1996 (in German).
72. P. Cifra, T. Bleha; *Macromolecular Theory and Simulations*, **2007**; 16, 501-512.
73. T. Norisuye; *Progress in Polymer Science*, **1993**; 18, 543-584.
74. P. Ball; *Designing the molecular world: chemistry at the frontier*. Princeton University Press, Princeton (USA) **1994**.
75. A. Macchioni, G. Ciancaleoni, C. Zuccaccia, D. Zuccaccia; *Chemical Society Reviews*, **2008**; 37, 479-489.
76. C. Travelet, G. Schlatter, P. Hébraud, C. Brochon, A. Lapp, G. Hadziioannou; *Langmuir*, **2009**; 25, 8723-8734.
77. C. Bouilhac, C. Travelet, A. Graillet, S. Monge, R. Borsali, J.-J. Robin; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 2756-2767.
78. K. Yoshida, N. Matubayasi, M. Nakahara; *The Journal of Chemical Physics*, **2008**; 129, 214501.



Chapitre 3

Chapitre 3 : Polyoxazolines amphiphiles triblocs photo-induites

1. Introduction

Les polyoxazolines amphiphiles diblocs photosensibles, présentées dans le chapitre précédent, s'organisent en milieu aqueux sous forme de nanoparticules sphériques. Malheureusement, la présence de chromophores coumarine à l'intérieur du cœur de la nanoparticule ainsi qu'en périphérie, liée à leur hydrophobie partielle entraîne un phénomène d'agrégation des nanoparticules lors de leur photo-irradiation.

L'alternative proposée dans ce troisième chapitre consiste à d'abord photo-dimériser les chromophores coumarine présents sur les amorceurs nommés **CoumOTs** dans le chapitre précédent et désignés ici **CmTs**. La dimérisation de **CmTs** génère alors un amorceur hydrophobe bifonctionnel nommé **CmTs₂**, à partir duquel vont croître les chaînes POx de part et d'autre et générer un copolymère amphiphile tribloc A-B-A, où A représente les chaînes hydrophiles polyoxazoline et B le bloc hydrophobe aliphatique dimérisé (Figure 3-1).

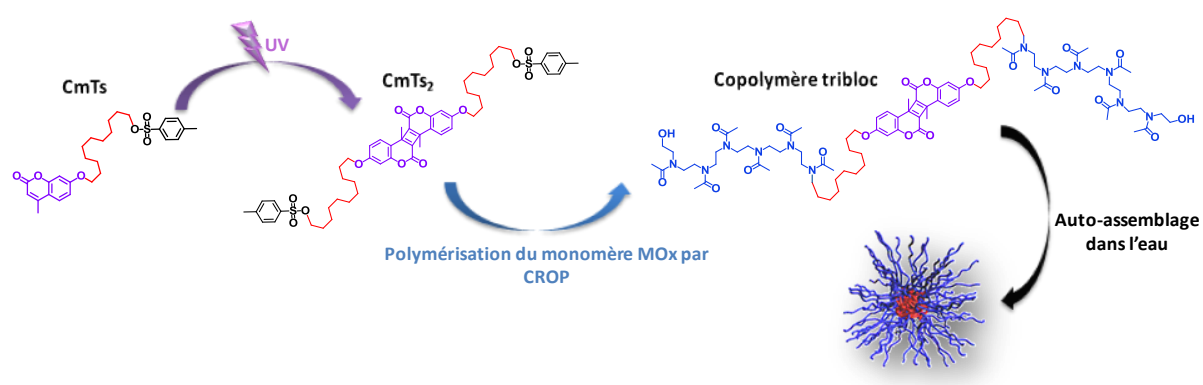


Figure 3-1 : Illustration schématique de la formation des copolymères triblocs amphiphiles à base de POx par pré-dimérisation de l'amorceur hydrophobe coumarine CmTs.

Ce chapitre a pour objectif de mettre en évidence les avantages de cette stratégie dite « tribloc » par rapport à celle dite « dibloc » en montrant la singularité des copolymères triblocs photo-induits dans le domaine de l'auto-assemblage en solution des polymères amphiphiles. L'étude de la morphologie des nano-objets, l'organisation des chaînes polymères au sein de ces derniers (cœur-couronne, vésicule...) ainsi que leur caractère cristallin ou amorphe seront autant de points importants étudiés dans ce chapitre.

2. Stratégies de synthèse des copolymères amphiphiles triblocs ABA

Les copolymères triblocs A-B-A peuvent être obtenus par trois grandes voies de synthèse comme illustrées sur la Figure 3-2.¹⁻³ L'**addition séquentielle de monomères (a)** consiste à polymériser les blocs polymères les uns après les autres en alternant la polymérisation du monomère A puis du monomère B et enfin du monomère A. Pour cela, la polymérisation doit être contrôlée et vivante afin d'obtenir des longueurs de blocs bien définies et d'avoir une extrémité de chaîne propageante stable qui permette la polymérisation du second monomère après consommation totale du premier. Cela mène très souvent, de manière inéluctable, à une faible symétrie des blocs. Enfin, cette stratégie se limite à des monomères réagissant selon le même processus de polymérisation.

La seconde voie de synthèse consiste en un **couplage polymère-polymère (b)** qui requiert des blocs polymères pré-synthétisés possédant en extrémité de chaîne des fonctions chimiques complémentaires, capables de réagir selon des couplages spécifiques (Huisgen, thiol-ène, thiol-yne...). Un intérêt de cette stratégie est de pouvoir coupler des blocs polymères de natures chimiques très différentes, obtenus selon des processus de polymérisation variés (radicalaire, ionique...). L'inconvénient majeur est la faible réactivité des extrémités de chaîne et ceci d'autant plus dans le cas de copolymères à blocs amphiphiles car l'un est hydrophile alors que l'autre est hydrophobe. Cela a pour conséquence la difficulté de séparation, des blocs de départ n'ayant pas réagi, du copolymère formé.

La dernière voie, celle qui sera développée ici, est la voie du **macro-amorceur (c)** bifonctionnel de type B capable de faire croître, de part et d'autre du bloc central, les blocs externes de type A. Les avantages sont nombreux à commencer par la rapidité de synthèse avec une seule étape pour accéder aux copolymères A-B-A, la symétrie de longueurs des blocs externes, la diversité des blocs que l'on peut associer (comme lors des couplages polymère-polymère), la réactivité élevée des extrémités de chaîne du bloc central avec un monomère antagoniste.

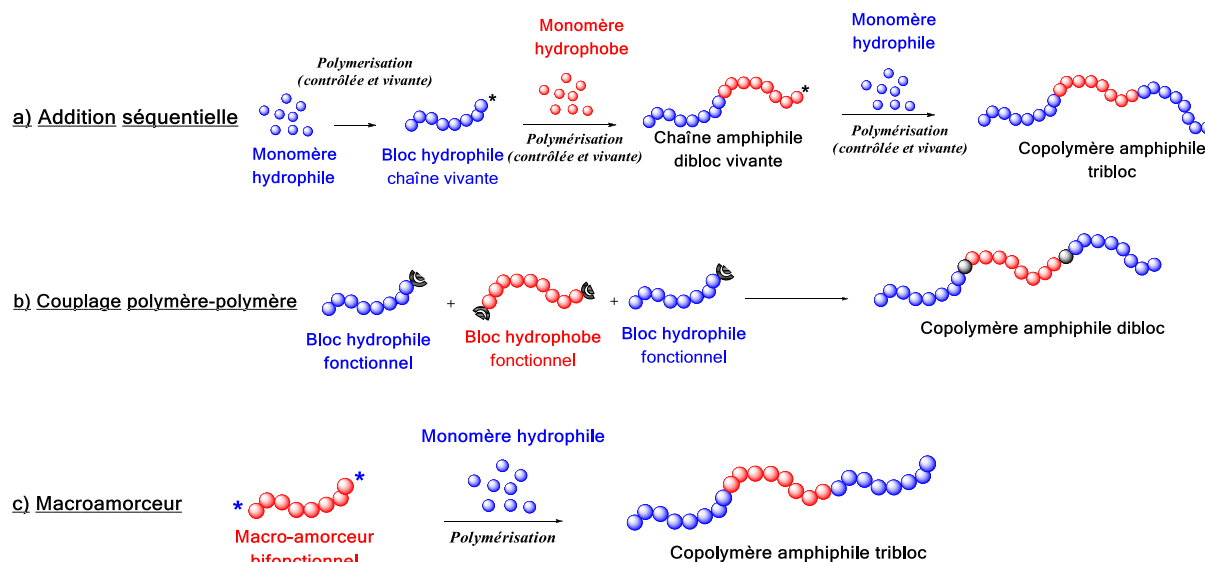


Figure 3-2 : Voies de synthèse des copolymères triblocs A-B-A.

Les copolymères amphiphiles triblocs nommés ici T_x^x ont été synthétisés selon la **stratégie du macroamorceur**. La synthèse des copolymères triblocs se fait en une seule étape après photodimérisation des amorceurs coumarine CmTs en CmTs₂. Ce dernier est un amorceur hydrophobe bi-fonctionnel constitué d'un bloc central B capable d'amorcer la CROP du monomère MOx à chacune de ses extrémités et permet de générer des copolymères triblocs amphiphiles A-B-A aux blocs externes A composés de POx.

3. Auto-assemblage des copolymères amphiphiles triblocs ABA

Tout comme les copolymères diblocs, les copolymères triblocs ABA sont capables de s'auto-organiser sous forme de nano-objets structurés. Comme le montre la Figure 3-3, lorsqu'ils sont dissouts dans un solvant sélectif des blocs externes A, ils peuvent s'organiser de manière à former des **nanoparticules micellaires dites étoilées** ou encore des **vésicules** selon la flexibilité et la longueur des blocs. Ces auto-assemblages deviennent plus complexes lorsque le solvant est sélectif du bloc central B. La concentration en copolymère et la longueur des blocs A et du bloc B s'avèrent être alors des paramètres essentiels lors de la structuration en solution. Leur variation pourra entraîner la formation de nanoparticules originales dites **micellaires de type « fleur »** impossible à obtenir à partir de copolymères diblocs.⁴⁻⁸

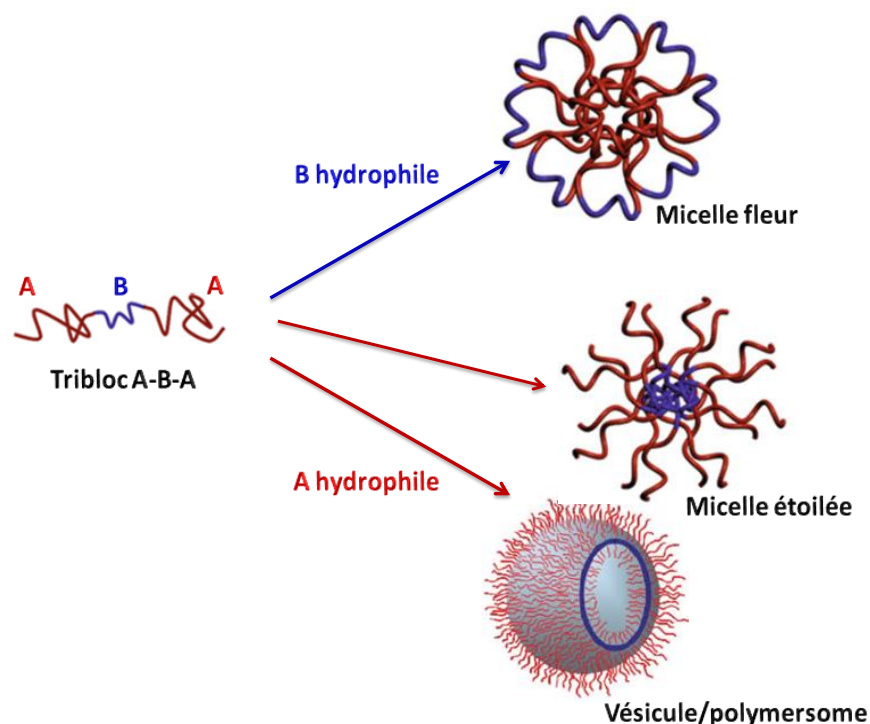


Figure 3-3 : Auto-assemblages de copolymères amphiphiles triblocs A-B-A.

4. Publication

Les travaux présentés ci-après mettent en évidence la synthèse et l'auto-assemblage dans l'eau des copolymères triblocs amphiphiles photo-induits. En effet, les nanoparticules obtenues présentent des particularités provenant de l'étape de pré-dimérisation. La publication a été soumise à *European polymer journal* le 15 juillet 2016 (special issue Polyoxazoline).

Amphiphilic Photo-Induced Triblock Polyoxazoline Through Coumarin Dimerization: Efficient Synthetic Tool for Nanoparticles

Laetitia Korchia, Cécile Bouilhac, Jean-Jacques Robin, Vincent Lapinte*

Institut Charles Gerhardt - UMR 5253 CNRS/UM/ENSCM - Ingénierie et Architectures
Macromoléculaires, Université Montpellier, Bâtiment 17, Place Eugène Bataillon, F-34095
Montpellier Cedex 5, France

Abstract

Amphiphilic photo-induced triblock copolymers were successfully prepared by photo-dimerization of a photo-active initiator bearing coumarin moieties (CmTs₂) before synthesizing various lengths of polyoxazoline block by cationic ring-opening polymerization (CROP). The DLS and TEM studies of the triblock copolymers self-assembly in water revealed that over 99% of the nanoparticles have a D_H-value of 10 nm. The total photo-activity of the coumarin units permitted π -stacking interactions in the nanoparticle core and further its crystallization as demonstrated by DSC and X-ray diffractometry. An original non-spherical morphology of the nanoparticles resulted with an elongated shape.

Introduction

Amphiphilic copolymers are particularly interesting for their ability to self-assemble in selective solvents.^{6, 9-13} The stability of polymeric micellar systems is a crucial condition for some applications such as the encapsulation of active compounds.^{14, 15} Various approaches have been proposed to stabilize polymeric micelles. Among them, the core-crosslinked micelle and the shell-crosslinked micelle are attractive ways to maintain the structural integrity of micellar object whatever the external conditions such as the dilution or thermal changes.¹⁶⁻²⁵ To prepare core-crosslinked polymeric micelles, numerous approaches have

already been described including free-radical reaction, condensation,^{17, 26} sol-gel or click chemistry.^{27, 28} Nevertheless, these routes require some additives or initiators and produce by-products.²⁹⁻³¹ An attractive alternative is the photo-crosslinking as a : rapid, efficient, non-toxic and cost-effective process.^{15, 32-36} Among the current photo-crosslinkers employed (cinnamate,³⁷ thymine,³⁸ benzophenone³⁹ or anthracene⁴⁰), we focus on the coumarin analogues *inter alia* used in medicine, biology, and material science.^{30, 41} Coumarin photo-dimerizes into cyclobutane ring *via* a $[2\pi + 2\pi]$ cycloaddition under UV-irradiation at $\lambda > 310$ nm, and the resulting dimer can be reversibly dissociated into the two precursor unimers at $\lambda < 260$ nm.^{15, 41-46} Recently, the reversible photo-dimerization of coumarin has been explored for designing photo-controllable micelles especially used in pharmaceutical applications.^{15, 35, 47, 48} For example, Luo *et al.* prepared photo-crosslinked dendrimeric micelles containing stable coumarin units under physiological media.⁴⁹ Otherwise, Ji *et al.* described a dual photo- and pH-responsive polymers bearing coumarin units avoiding unfavorable premature release of loaded drugs.⁵⁰

Furthermore, polyoxazolines (POx)s represent valuable bioinspired polymers considered as an alternative to PEG. The pseudo-peptidic structure leads to biocompatibility, biodistribution, blood clearance and protein adsorption properties.^{51, 52} Well-defined POx are easily prepared by cationic ring-opening polymerization (CROP) of the corresponding 2-R-2-oxazolines. The properties of the POx depend on the nature of the R pendant chain (Me, Et, Pr, etc.). Many macromolecular architectures have already been described using hydrophilic and/or hydrophobic 2-oxazoline monomers or coupled to other polymer blocks.⁵³ The POx could be also combined to other polymerization processes.⁵⁴ All these strategies explained the keen interest of the manifold investigations on the decoration of POx using functional terminating agents⁵⁵ or initiators.⁵⁶⁻⁶¹ Recently, we described the synthesis of amphiphilic diblock polyoxazolines (CoumC₁₁-POx_n) bearing an UV-sensitive coumarin end-group (Figure 3-4, top route) as well as their self-assembly in water into spherical nanoparticles and finally their photo-dimerization.⁶²

In this contribution, we report on an alternative pathway where the dimerization of the coumarin moieties is performed prior to the polymerization of 2-methyl-2-oxazoline and finally the self-assembly in water of the resulting symmetrical triblock copolymers (Figure 3-4, down route).⁶² Herein, the influence of the triblock copolymers route onto the size and the shape of the resulting nano-objects are discussed.

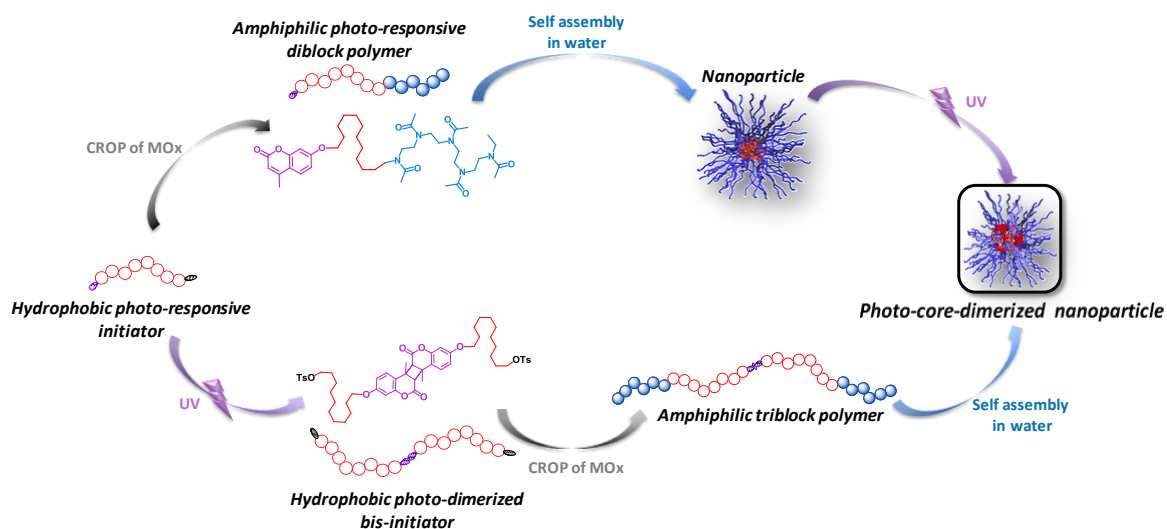


Figure 3-4: Triblock copolymer synthesis and the self-assembly in water relative to that of the diblock copolymer

Results and discussion

Synthesis of the triblock copolymers T_x^X

The photo-dimerization of the lipophilic UV-sensitive initiator, CmTs, into the corresponding bis-functional initiator, CmTs₂, prior to the polymerization of 2-methyl-2-oxazoline was investigated (Figure 3-4, down route). The starting compound, CmTs, reacted both as a tosylated initiator and a photo-dimerizable system by the coumarin unit. To reach an optimal photo-conversion rate, CmTs was first dimerized into CmTs₂ under UV-irradiation at $\lambda = 350$ nm giving a hydrophobic bis-initiator for the cationic ring-opening polymerization (CROP) of 2-methyl-2-oxazoline (Figure 3-5). The $[2\pi+2\pi]$ photo-reaction was monitored by UV spectroscopy using the UV-absorbance band of the coumarin unit at $\lambda = 320$ nm (Figure SI3-1). The photo-dimerization rate was confirmed by ¹H NMR spectroscopy regarding the shift of the characteristic signals of the unimer (H₂, H₆, H₇ and H₉) into the cyclobutane dimer (H₂*, H₆*, H₇* and H₉*) (Figure 3-6). A maximum of dimerization rate of 88% was achieved after one hour whereas a duration of 1 or 2 days was required in the literature for another polymeric structures bearing the similar photo-active unit.^{63, 64} The residual unimer CmTs was removed by recrystallization giving only CmTs₂ as illustrated by comparison between CmTs and CmTs₂ SEC traces (Figure SI3-2).

The CROP of 2-methyl-2-oxazoline was performed under microwaves as regard to the low thermal stability of CmTs₂. Indeed, 50 % of de-dimerization was observed after several hours at 80 °C. Even though higher temperature was used (140 °C) under microwaves, this technique drastically reduced the reaction time (30 min *versus* 15 h) avoiding the scission by de-dimerization of the polymer chains into amphiphilic diblock copolymers (CoumC₁₁-POx_n). After the termination step in the presence of potash, three photo-induced amphiphilic and symmetric triblock copolymers (T_x^X) were prepared knowing that the degree of polymerization of each POx block (X) ranged from 6 to 24, as reported in Table 3-1.

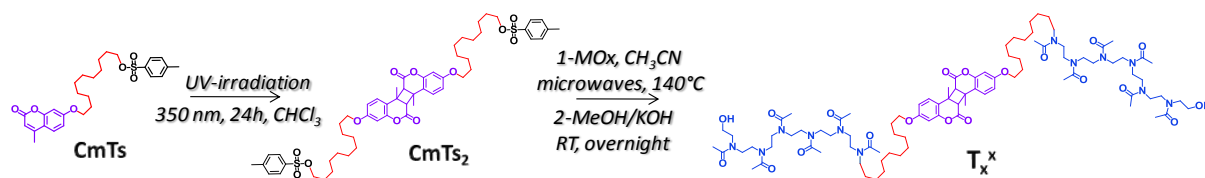


Figure 3-5: Synthesis of the amphiphilic triblock copolymers (e. g. T_6^6).

The characteristic signals of the POx block, alkyl chain and dimerized coumarin units were detected by ^1H NMR as illustrated in Figure 3-6. The dimerized coumarin protons at 7.0, 6.6 and 5.9 ppm corresponded respectively to H_2^* , H_7^* , H_9^* and H_6^* . The absence the coumarin unimer signals demonstrated that no de-dimerization occurred during the CROP process under microwaves. Additionally, the occurrence of POx protons H_a , H_b and H_d at 2.2-1.8 and 3.7-3.2 ppm as well as the peculiar alkyl chain signals H_{11-21} at 4.0, 3.5, 2.25 and 1.7-1.2 ppm attested to the triblock copolymer structure.

Besides, by size exclusion chromatography (SEC), the monomodal traces indicated that only ABA amphiphilic copolymers were obtained without unintended de-dimerization leading to the formation of diblock copolymers (Figure SI3-3). The low molecular weights of the resulting copolymers T_6^6 , T_{12}^{12} and T_{24}^{24} ranged from 2100 to 5200 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ with a high hydrophilic ratio of 67, 83 and 87 %, corresponding to $M_{\text{hydrophilic}}/M_{\text{hydrophobic}}$ ratio of 2, 4.9 and 6.7, respectively. Thus, POx-based triblock copolymers bearing dimerized coumarin units have been successfully synthesized in a one-pot route, without traces of residual undimerized chains.

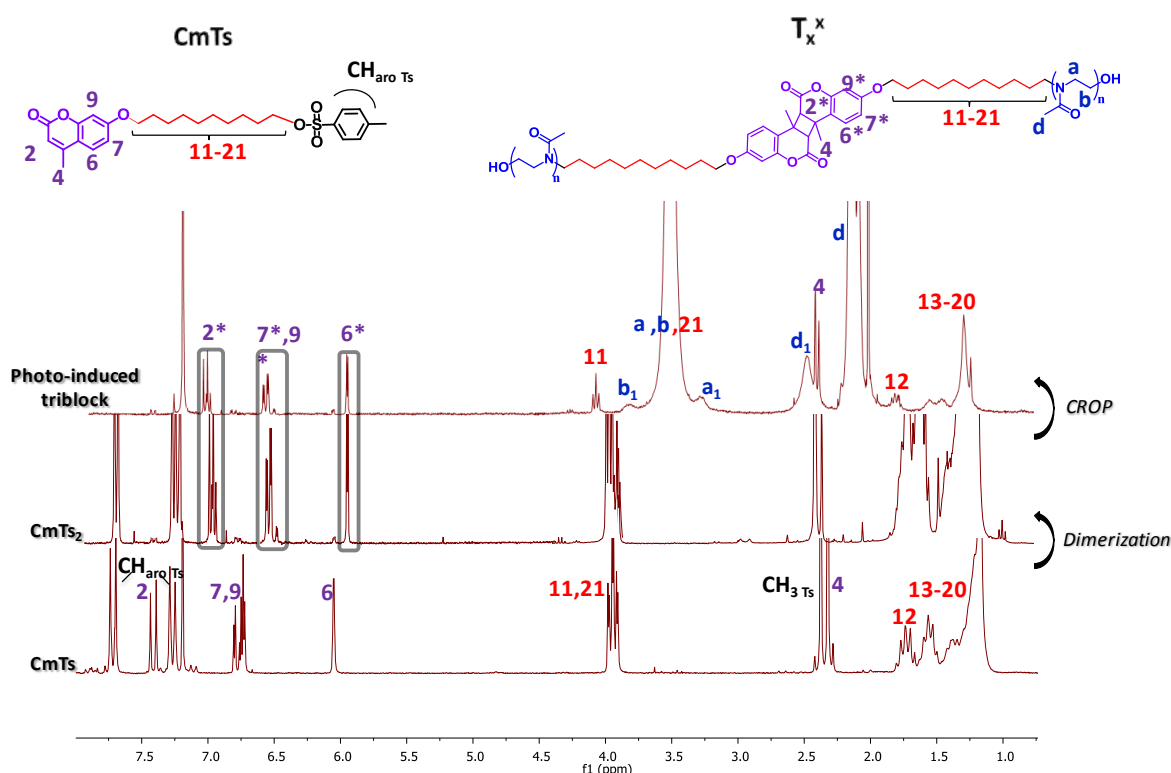


Figure 3-6: ^1H NMR spectra (300 MHz, CDCl_3) of CmTs , CmTs_2 and T_6^6 .

Self-assembly of the photo-induced amphiphilic triblock copolymers

The ability of the photo-induced amphiphilic triblock copolymers T_X^X to self-assemble in water into ordered nanostructures was investigated by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). In all cases, the nano-objects were spontaneously shaped by direct dissolution of the copolymers in aqueous media (4 mg.mL^{-1}) without any filtration. For T_6^6 , T_{12}^{12} and T_{24}^{24} , two distributions co-existed with a hydrodynamic diameter (D_H) of around 11 and 300 nm as shown in Figure 3-7 and summarized in Table 3-1. They can reasonably be attributed to micellar nanoparticles and larger aggregates. We noted that the D_H -values of the smaller nanoparticles determined by DLS were consistent with those of TEM, except for T_{12}^{12} (nanoparticles twice larger by TEM). By DLS measurements, the length of the POx blocks seemed to have a little impact on the nanoparticle size and similar D_H -values than the corresponding photo-active diblock copolymer, CoumC₁₁-POx_n, and un-photoactive diblock copolymer, C₁₈-Pox_n as previously reported.⁶⁵ Moreover, as CoumC₁₁-POx_n, an inexplicable maximum in size was observed for the intermediate length of POx, T_{12}^{12} .⁶² The DLS measurements being much more sensitive to the bigger objects than smaller ones,⁶⁵ the percentage of small nanoparticles was calculated related to the big ones according to the calculation described in the previous work on diblock copolymers. For instance, for T_6^6 at 90°, we obtained $N_{\text{small}} = 1009 N_{\text{big}}$ meaning that the small nanoparticles represent 99.90% of the nanoparticles in number. The same calculation gave 99.94 and 99.76% for T_{12}^{12} and T_{24}^{24} , respectively. The small amount of aggregates was confirmed on TEM images.

Table 3-1: Characteristics of triblock copolymers (T_X^X).

Sample	DP_n^{POx} ^b	M_n SEC ^c (g.mol ⁻¹)	$\bar{D}$ ^c	D_H ^d (nm)		$N_{\text{small}}/N_{\text{big}}$ ^d	D_{TEM} ^e (nm)
				Small	Big		
T_6^6 ^a	6+6	2100	1.47	10.6	353	1009	12
T_{12}^{12} ^a	12+12	4000	1.51	12.8	272	1711	24
T_{24}^{24} ^a	24+24	5200	1.44	9.6	308	416	10

^a: CROP initiated by CmTs₂ performed in a microwave reactor at 140 °C in CH₃CN during 30 min. ^b: Determined by ¹H NMR in CDCl₃. ^c: Determined by SEC in DMAc (PMMA standards). ^d: Determined by dynamic light scattering using CONTIN method. ^e: Determined from TEM image with statistical treatment carried out on more than 300 objects.

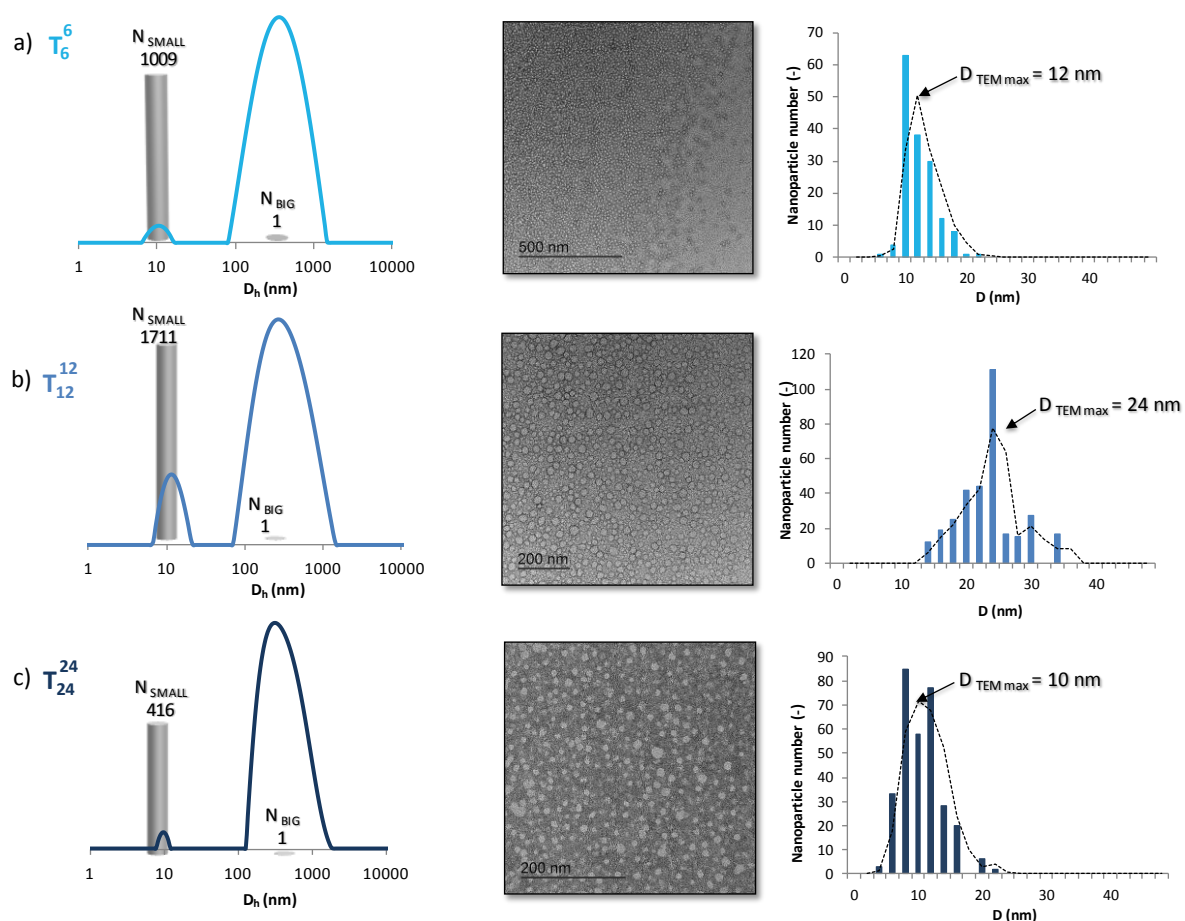


Figure 3-7: DLS traces and N_{small}/N_{big} (bar) calculated from CONTIN analysis as well as TEM images and the corresponding statistical treatment carried out on more than 300 objects for a) T₆⁶, b) T₁₂¹² and c) T₂₄²⁴.

The efficiency of UV-irradiation for the crosslinking of the nanoparticles has been proved by Zhao.¹⁵ This methodology is suitable for the both core-⁶⁶ and shell-¹⁸ crosslinked of the nanoparticles using amphiphilic grafted copolymers bearing pendent chains with UV-active species. By contrast, the photo-dimerization of the nanoparticle core employing amphiphilic diblock copolymers has been little studied. In our case, for T_x^x, the UV-dimerization of coumarin units occurring before self-assembling, the light-induced destabilization of the nanoparticles has been avoided.

A deeper observation of the TEM images of T_x^x revealed a non-spherical shape of the nanoparticles (Figure 3-8). Whatever the size, an elongated shape was observed with a diameter around 0.8-0.9 time smaller than that of the corresponding spherical nanoparticles. The original shape was illustrated with T₁₂¹² giving the larger nanoparticles. Such morphology

has already been described for amphiphilic copolymers containing very hydrophobic⁶⁷ or fluorinated⁶⁸ blocks. Jordan *et al.*⁶⁹ have also recently reported the same trend for hydrophilic/fluorophilic poly(2-oxazoline) diblock copolymers in water.

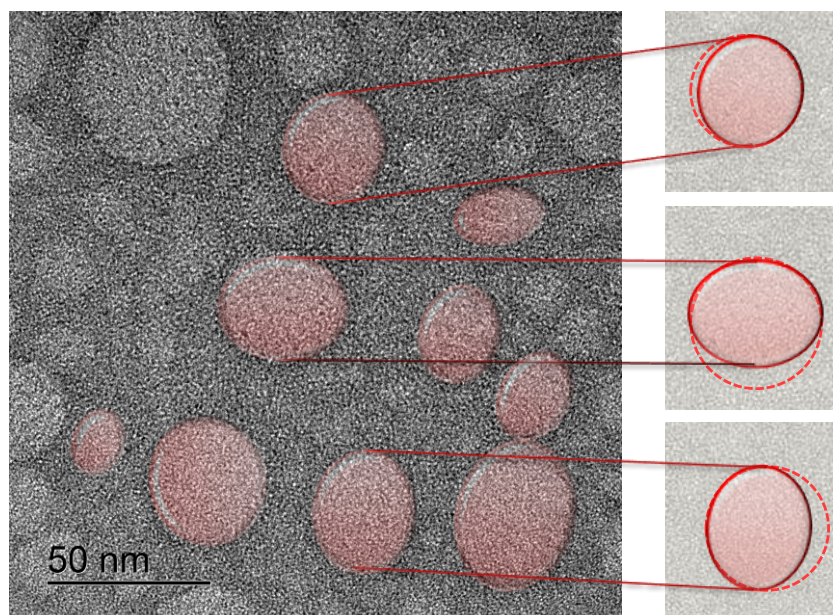


Figure 3-8: TEM image of non-spherical nanoparticles of T_{12}^{12} after direct dissolution in water (full line: contour of elongated nanoparticle and dotted line: corresponding spherical nanoparticle).

To explain this nanoparticle elongation, we proposed the crystallization of the coumarin units inducing an internal stress and a preferential orientation of the triblock copolymers. Indeed, the coumarin units are well-known to act as crystallization promoters by charge transfer complex and $\pi-\pi$ interactions caused by their photo-induced alignment. To check the crystallization of the nanoparticle core, a comparative DSC analysis was realized on the photo-induced triblock copolymers (T_6^6 , T_{12}^{12} and T_{24}^{24}) and their precursor CmTs₂ (Figure SI3-4 and Table 3-2). Preliminarily to the study of the triblock copolymers, CmTs₂ was investigated and shown a T_g -value of -20 °C and a T_m -value of 88 °C. The copolymers T_x^x crystallized with an increase of the melting temperature (T_m) with the length of polyoxazoline block (91 °C for T_6^6 to 135 °C for T_{24}^{24}). The phase segregation between the hydrophilic and the hydrophobic blocks was confirmed with two T_g values corresponding approximatively to those of CmTs₂ (T_{g1}) and polyoxazoline (T_{g2}). Lastly, note that the melting enthalpy of the

triblock copolymers was higher than that of CmTs₂ (-45 J.g⁻¹) and exceeded -95 J.g⁻¹ demonstrating the higher crystalline character of T_x^x.

Table 3-2: DSC values (10 °C/min under nitrogen atmosphere) and XRD data of CmTs₂, T₆⁶, T₁₂¹² and T₂₄²⁴

Sample	T _{g1} (°C)	T _{g2} (°C)	T _m (°C)	ΔH _m (J.g ⁻¹)	χ _c ^c (%)
CmTs ₂	-20	- ^a	88	-45	- ^d
T ₆ ⁶	5	53	91	-95	26
T ₁₂ ¹²	4	57	94	- ^b	13
T ₂₄ ²⁴	-10	44	135	-84	14

^a: Glass transition not visible. ^b: None value by overlapping between the glass transition and melting phenomena. ^c: Determined by XRD. ^d: Not calculated.

The crystalline phase of T₆⁶, T₁₂¹² and T₂₄²⁴ was confirmed by X-ray diffraction (XRD) analysis (Figure 3-9). Thanks to Bragg's law: $n\lambda = 2d\sin\theta$, where n represented an integer (here, $n_{\text{air}} = 1$), λ the wavelength of the beam and θ the incident angle, each diffraction peak allowed to deduce the distance between diffracting planes, d (Å). In addition, to a broad diffusion peak between 4 and 6 Å, a high sharp peak was detected at 3.2 Å for each T_x^x. Additional peaks at 5.7, 5.1, 4.5, 4.1 and 3.5 Å, characteristic to long distance interactions and spaced with the same gap (0.6 Å), were observed for the triblock with shorter POx chains (T₆⁶) that demonstrated its higher ability to crystallize. XRD and DSC analyses were in good agreement and gave the same evolution of the crystallinity with the length of POx block. Besides, the crystallization phenomenon was lower for T₂₄²⁴ than for T₆⁶ since only the high sharp peak at 3.2 Å was observed. The crystallization was disturbed by the longer POx chains as evidenced by the measurement of the crystallinity ratio (χ_c) ranging from 13 to 26% (Table 3-2). Furthermore, the DSC thermograms also confirmed this tendency since the highest melting temperature (T_m = 135 °C) was measured for the longest triblock copolymer T₂₄²⁴.

Thus, the architecture of the POx-based amphiphilic copolymers bearing coumarin units has a real impact on their physico-chemical properties. The photo-dimerization of coumarin groups before self-assembly favoured the crystallization and further the segregation between

hydrophobic and hydrophilic blocks of T_x^x . This crystallization seemed to occur according to a preferential direction producing non-spherical nanoparticles by π -stacking interactions between aromatics rings of coumarin dimmers.

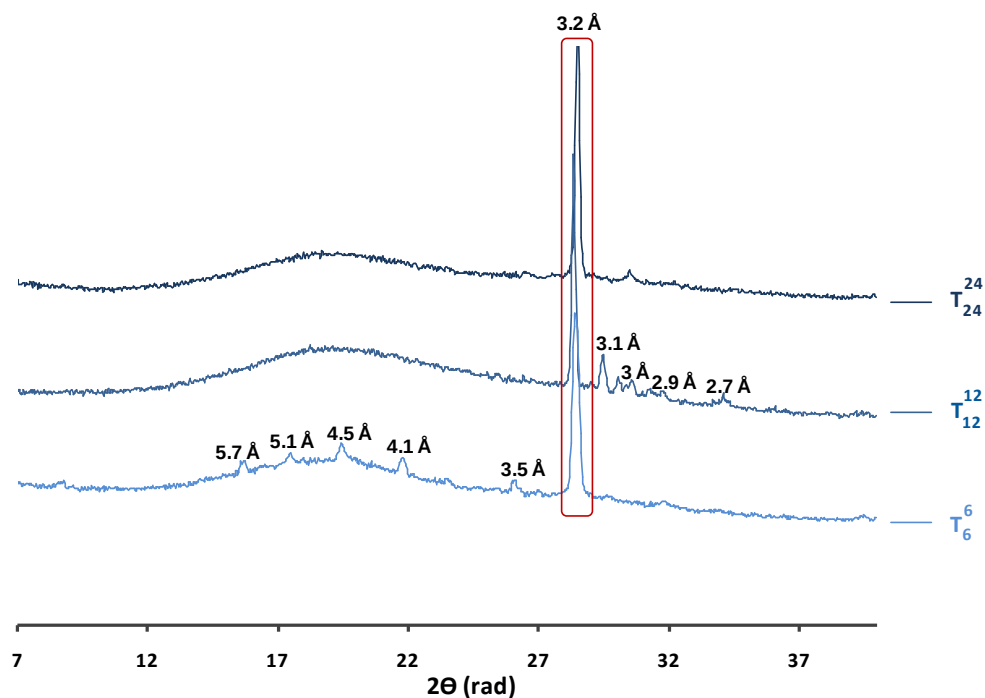


Figure 3-9: X-ray diffraction patterns measured by powder method for T_6^6 , T_{12}^{12} and T_{24}^{24} .

Experimental

Materials

2-Methyl-2-oxazoline (MOx) was dried and distilled from CaH_2 and stored under dry nitrogen atmosphere. CoumC₁₁OTs called here CmTs were synthesized according to a procedure previously described.⁵⁵ Anhydrous acetonitrile, diethylether, ethanol, methanol, MgSO_4 and potash (KOH) were commercial products (Sigma Aldrich) and used without further purification.

Measurements

The UV-dimerization of the CmTs was performed in a cylindrical photochemical reactor “Rayonnet RPR-200” equipped with 16 symmetrically placed lamps with emission in 350 nm (UV-B). The samples were irradiated in quartz flasks placed on a circular rotating holder. The polymerization reactions were performed in capped reaction vials specially designed for the single-mode microwave. The microwave reactor system used was a Monowave 300 from Anton-Paar. These hot vials, allowed to cool to room temperature, and filled with argon prior to use. All experiments were performed on 30 mL solutions; the polymerization reactions were terminated by adding methanolic potash to the reaction mixture at room temperature outside the microwave system. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a NMR BrukerAvance I 300 MHz or on a BrukerAvance III 600 MHz spectrometers. The chemical shifts were in part per million (ppm) where (s) means a singlet, (d) a doublet, (t) a triplet, (m) a multiplet and (dd) a doublet of doublet. Chemical shifts (^1H NMR) were referenced to the peak of residual CHCl_3 at 7.26 ppm. Size exclusion chromatography (SEC) with N,N-dimethylacetamide (DMAc) (with 0.1 w/w% LiCl) as eluent at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} , calibrated with poly(methylmethacrylate) (PMMA) standards, was performed on a PL-GPC 50 Plus equipped with a Varian model 410 autosampler. The SEC apparatus comprised a refractive index detector and was filled with a 8 μm PolarGel-M pre-column (7.5 $\times$ 50 mm) and two 8 μm PolarGel-M columns (7.5 $\times$ 300 mm) thermostated at 50°C. Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed using an ALV/CGS-8FS/N069 apparatus (from ALV) equipped with an ALV/LSE-5004 multiple τ digital correlator with a 125 ns initial sampling time (from ALV) and a 35mW red He-Ne linearly polarized laser operating at a wavelength of 632.8 nm (from JDSU). The copolymer suspensions in water were obtained by direct copolymer dissolution in Milli-Q water

(characterized by a resistivity of 18.2 MΩ.cm) at a concentration of 4 mg.mL⁻¹ without filtration, loaded in 10 mm diameter cylindrical cells and then maintained at a constant temperature of 25.0 ± 0.1 °C prior to measurement. In DLS, the relaxation time distribution was obtained using CONTIN analysis of the autocorrelation function ($g^{(2)}-1$). Sample preparation for TEM analysis was done as follows: 10 µL of aqueous copolymer suspensions concentrated at 0.04 mg.mL⁻¹ were dropped onto glow discharged carbon-coated copper grids (Agar scientific, Cu-300) and the excess liquid was blotted thanks to filter paper. Then, 10 µL of a 4 w/v % aqueous uranyl acetate negative stain solution was added. After 30 seconds, the excess of liquid was again blotted. TEM imaging was performed using a JEOL, JEM – 2200FS microscope operating at 200kV. Calorimetric analyses were carried out at 10 °C/min under nitrogen atmosphere using a Star1 differential scanning calorimeter (DSC) from Mettler Toledo. X-ray diffraction (XRD) analysis were performed on a X-pert powder diffractometer with a 10 mm mask, a divergent fente of 1/4° on silicium surface to avoid noise signal. UV-visible analyses were conducted with a Perkin Elmer – lambda 35 UV/Vis spectrometer equipped with PTP-1+1 Peltier System in vial quartz (l=1cm).

Dimerized initiator: CmTs₂

In a quartz closed flask, a solution of the initiator CmTs (10 g, 20 mmol) in chloroform (30 mL) was exposed to UV irradiation at λ=350 nm (UV-B) for one day in cylindrical photochemical reactor. The dimer was separated to the corresponding unimer by recrystallization from ethanol (four times). The white powder corresponding to the unimer was removed giving CmTs₂ in a 72% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.8 (d, 4H, CH_{aroTs}), 7.3 (d, 4H, CH_{aroTs}), 7.0 (d, 2H, H_{2*}), 6.6 (m, 4H, H_{7*} and H_{9*}), 5.8 (s, 2H, H_{6*}), 3.9 (m, 4H, CH₂-O-), 3.5 (m, 8H, H₁₁ and H₂₁), 2.4 (s, 6H, CH_{3Ts}), 2.3 (s, 6H, H₄), 1.8 (m, 4H, H₁₂), 1.5-1.2 (m, 32H, H₁₃-H₂₀). m_p = 80°C

Linear triblock copolymers: T_x^x

A typical procedure for the synthesis of T₁₂¹² with a targeted molecular weight of 4000 g.mol⁻¹ was described here. The dimerized initiator CmTs₂ (2.44 g, 3 mmol) and MOx (10 g, 118 mmol) were dissolved in 30 mL of dry acetonitrile in a quartz closed vial. The solution was vigorously stirred under microwave conditions at 140 °C for 30 min at constant pressure. The

polymerization was terminated by addition of an adequate amount of methanolic potassium hydroxide (0.7 g, 13 mmol, 5M). The flask was maintained at 30 °C for 4 h. After cooling, the polymer was isolated by slow precipitation into cold diethylether and dried under vacuum overnight.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.0 (d, 2H, H_{2*}), 6.6 (dxd, 4H, H_{7*} and H_{9*}), 5.9 (s, 2H, H_{6*}), 4 (t, 4H, H_{11}), 3.7-3.2 (m, 8nH, H_a and H_b), 3.5 (m, 4H, H_{21}), 2.5 (s, 6H, H_{d1}), 2.25 (s, 6H, H_4), 2.2-1.8 (m, 6nH, H_d), 1.75-1.2 (m, 36H, H_{12} - H_{20}).

Conclusion

This study demonstrates the potential interest of the photo-dimerization of amphiphilic linear copolymers related to the photo-crosslinking of nanoparticle core using amphiphilic grafted copolymers. Otherwise, the benefits of the self-assembly of amphiphilic triblock copolymers previously prepared by photo-dimerization can be summarized as follows: i) high photo-conversion of coumarins without any unfavourable de-dimerization and retro-formation of diblock copolymers during the CROP process, ii) few aggregations of nanoparticles showing a sharp segregation phase between hydrophilic and hydrophobic blocks, and iii) original morphology of nanoparticles with non-spherical shape that can be attributed to the crystallization of the coumarin moieties until 26%. More studies are underway in our laboratory to demonstrate the difference in term of stability, loading and release of active molecules between different nano-objects based on polyoxazoline and coumarin (photo-dimerized spherical nanoparticles using the diblock route, photo-dimerized ovalic nanoparticles using the triblock route and photo-crosslinked spherical nanoparticles using grafted copolymers).

Acknowledgements

The authors thank the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” and the “Centre National de la Recherche Scientifique” for financial support. They are thankful to Dr. Erwan Oliviero from ICGM technical platform for TEM imaging, to Dr. Joel Couve for DSC measurements and Dr. Bernard Fraisse for XRD analysis. They also thank Dr. Redouane Borsali from the CERMAV in Grenoble who permitted DLS experiments in his team.

5. Etude détaillée de la photo-dimérisation de l'amorceur CmTs

Comme vu précédemment en chapitre 2, la photo-dimérisation des chaînes polymères CoumPOx terminées par un groupement coumarine s'est avérée partielle (67 %) en raison de l'enchevêtrement des chaînes peu propice à la mobilité des unités coumarine et à la rencontre des chromophores. Pour optimiser cette dimérisation, une stratégie alternative a été envisagée ici et consiste, comme le montre la publication précédente, à dimériser au préalable l'amorceur CmTs en un amorceur bifonctionnel photo-induit CmTs₂.

Dans le cas des chaînes CoumPOx, il a été montré que la dimérisation peut être quantifiée par spectroscopie UV et par spectrofluorimétrie mais pas par spectroscopie RMN ¹H, pour des raisons encore non expliquées. De façon surprenante, la pré-photo-dimérisation de l'amorceur CmTs en CmTs₂, a pu être suivie, en plus des techniques UV et fluorimétrique, par spectroscopie RMN ¹H et par chromatographie d'exclusion sphérique (SEC). Afin de s'assurer d'une totale dimérisation, il est crucial de pouvoir mettre en évidence la formation des dimères et de les isoler des précurseurs unimères qui donneraient lieu à la formation de copolymères diblocs lors de l'élaboration des triblocs. Pour cela, l'irradiation UV de CmTs à une longueur d'onde de 350 nm dans l'acétonitrile (solvant de polymérisation) a été étudiée par RMN ¹H et mise en évidence par un *shift* des signaux des protons aromatiques de la coumarine CmTs (7,4 ; 6,7 et 6,1 ppm) donnant ceux du dimère CmTs₂ (respectivement à 7,0 ; 6,6 et 6,0 ppm) (Figure 3-10). Les taux de dimérisation calculés en RMN s'avèrent être en adéquation avec les valeurs obtenues par spectroscopie UV. Après une heure sous exposition UV, le maximum de dimérisation, à savoir 90%, est atteint ($\%_{\text{Dimérisation}} = \frac{I_{(6,0 \text{ ppm})}}{[I_{(6,0 \text{ ppm})} + I_{(6,1 \text{ ppm})}]}$) et témoigne de l'efficacité de la photo-dimérisation de l'amorceur CmTs. Cela peut s'expliquer par la proximité des groupements coumarine les uns des autres favorisant ainsi leur photo-cycloaddition.

Par ailleurs, afin de s'assurer de la formation de copolymères triblocs uniquement, les dimères CmTs₂ ont été séparés du précurseur CmTs par recristallisation et caractérisés par RMN ¹H (page 103) et par GPC (Figure 3-11). Cette dernière caractérisation n'a pu être réalisée dans le cas des CoumPOx, ces derniers s'auto-assemblant dans les différents solvants GPC dont nous disposons (DMAc, eau, chloroforme). En revanche, les unimères CmTs et les dimères CmTs₂ peuvent clairement être distingués par leur volume hydrodynamique.

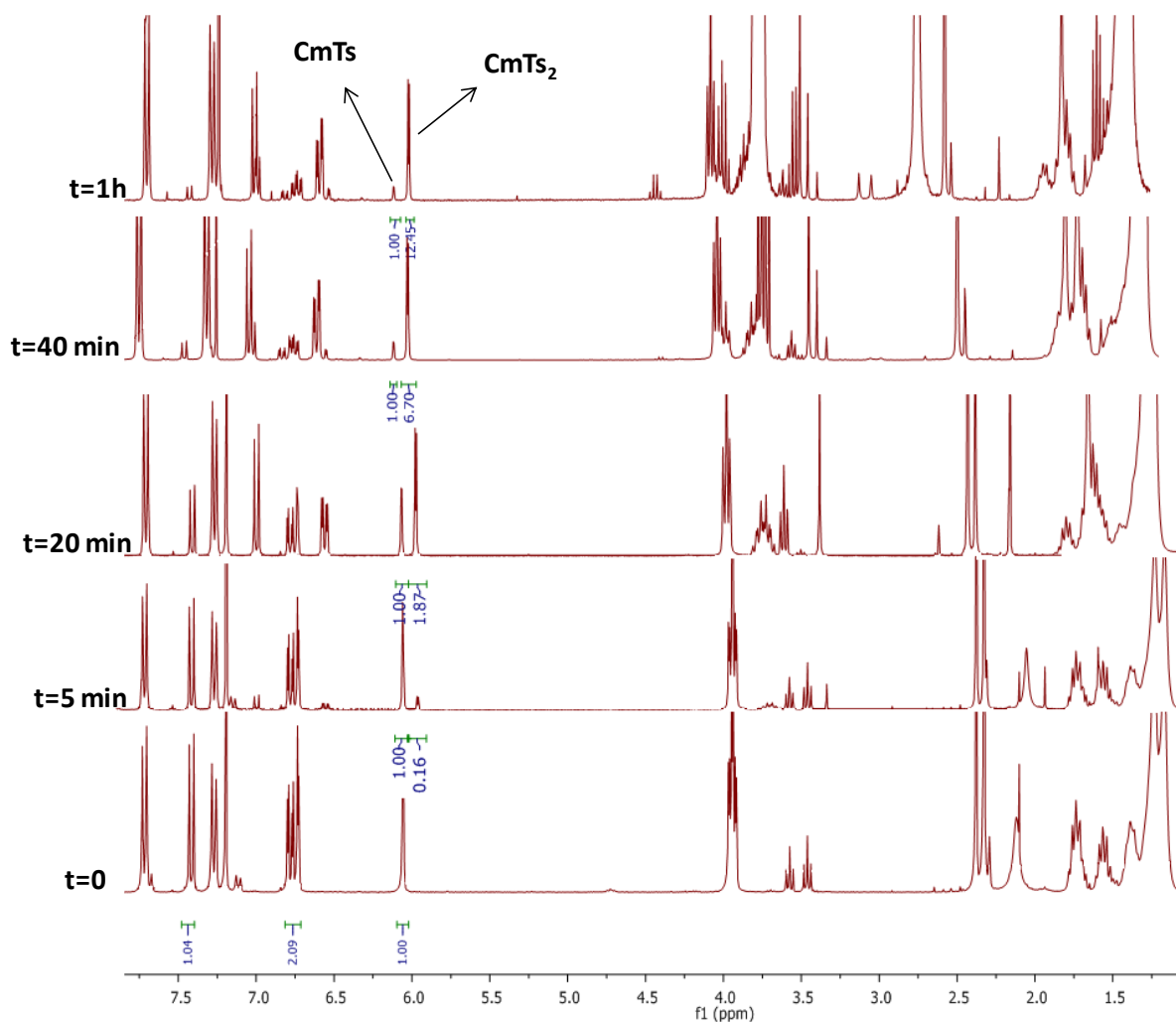


Figure 3-10 : Suivi RMN ^1H de la dimérisation de l'amorceur CmTs en CmTs_2 .

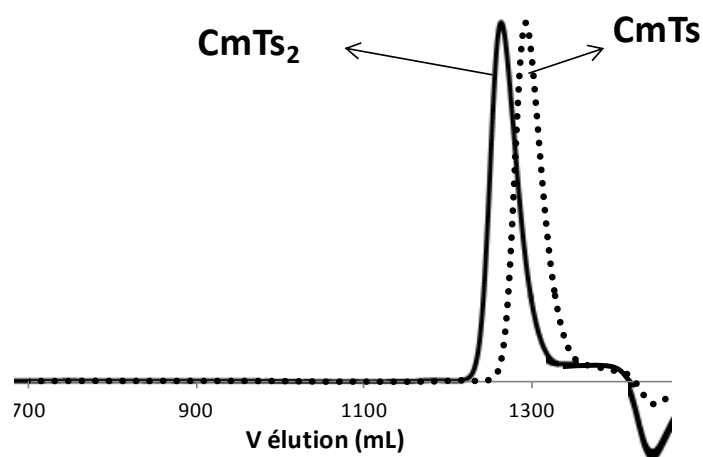


Figure 3-11 : Traces GPC dans le DMAc des amorceurs CmTs et CmTs_2 .

6. Conclusion

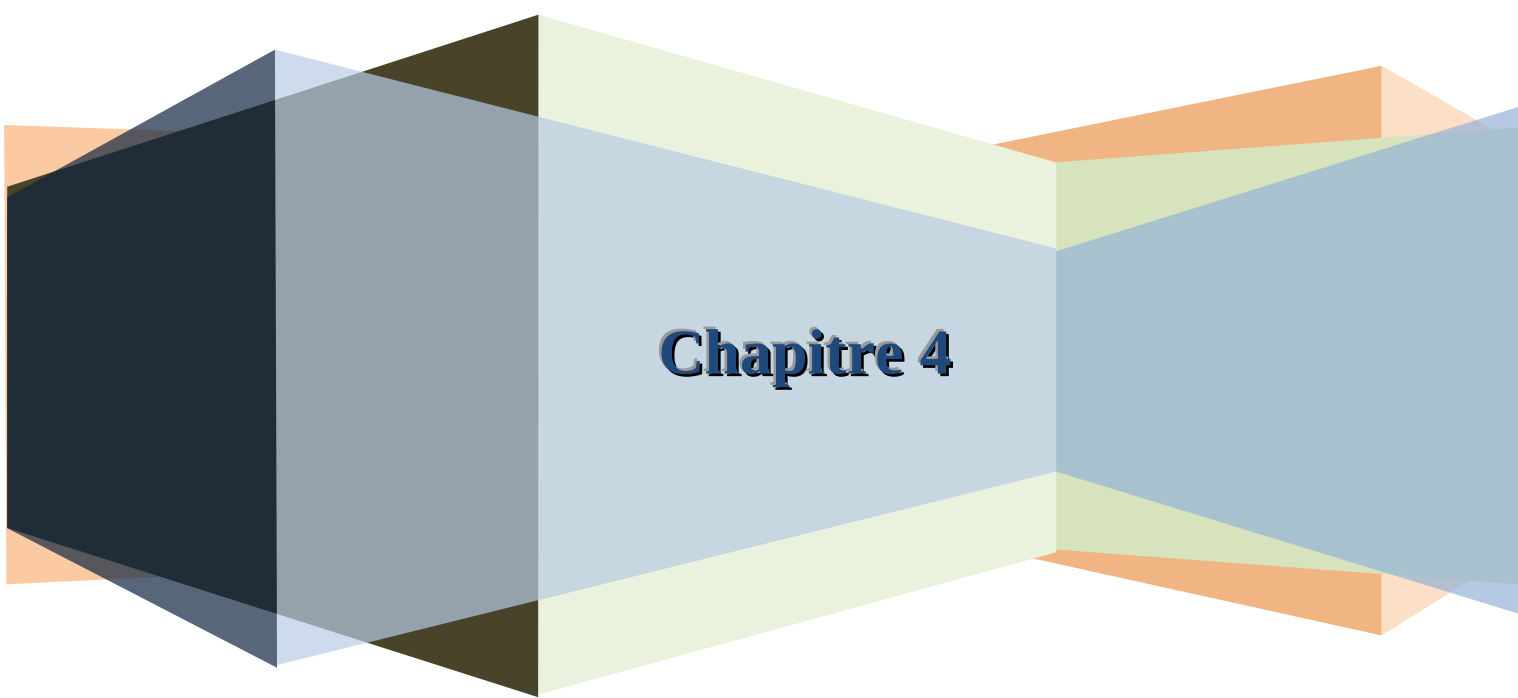
Dans ce chapitre, des copolymères triblocs amphiphiles photo-induits par pré-dimérisation de CmTs en CmTs₂ ont été développés. Leur synthèse aisée, en une seule étape, a permis d'accéder à une gamme de copolymères aux blocs PMOx de longueurs variées T₆⁶, T₁₂¹² et T₂₄²⁴. **L'absence de copolymères diblocs** lors de la formation des copolymères triblocs, observée par RMN et GPC (Figures 3-6 et SI3-3), démontre l'absence initiale de résidus CmTs et la non dé-dimérisation de la coumarine lors de la polymérisation CROP de la MOx sous micro-ondes.

L'étude de l'auto-assemblage des copolymères triblocs par DLS et TEM a mis en évidence la présence de **nano-objets d'environ 10 nm** de diamètre tels que les copolymères CoumC₁₁-POx_n et C_mPOx_n. La taille des nano-objets est, de façon peu surprenante, peu dépendante de la taille des blocs polyoxazoline. Par ailleurs, la stratégie tribloc n'a pas permis d'éviter la formation d'une **très faible proportion d'agrégats aux environs de 300 nm**. Ainsi, la photo-illumination avant (dans le cas des triblocs) et après (pour les diblocs) auto-assemblage dans l'eau revient au même en terme de taille et de répartition des nano-objets. En revanche, une différence de morphologie des nanoparticules est apparue. Ici, les nano-objets ont une **morphologie non sphérique (ovale)** qui est à relier à la **cristallisation** de leur cœur, comme montré en DRX et en DSC. Celle-ci est vraisemblablement due à des interactions coumarine-coumarine de type π -stacking. Le phénomène de cristallisation semble être favorisé par des chaînes polyoxazoline courtes allant jusqu'à un taux de cristallisation voisin de 25%.

Références

1. D. Taton; Y. Gnanou, ed. *In Block Copolymers in Nanoscience*. Co, W. V. G., Ed. , ed. W.V.G. Co, Ed. 2006. 9-35.
2. G. Lu, S. Zhang, X. Huang; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2006**; 44, 5438-5444.
3. H. Schmalz, A. Böker, R. Lange, G. Krausch, V. Abetz; *Macromolecules*, **2001**; 34, 8720-8729.
4. G. Riess; *Progress in Polymer Science*, **2003**; 28, 1107-1170.
5. C. Charbonneau, M. M. De Souza Lima, C. Chassenieux, O. Colombani, T. Nicolai; *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2013**; 15, 3955-3964.
6. C. Giacomelli, V. Schmidt, K. Aissou, R. Borsali; *Langmuir*, **2010**; 26, 15734-15744.
7. C. Chassenieux, T. Nicolai, L. Benyahia; *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2011**; 16, 18-26.
8. J. Zhu, Y. Jiang, H. Liang, W. Jiang; *The Journal of Physical Chemistry B*, **2005**; 109, 8619-8625.
9. Y. Mai, A. Eisenberg; *Chemical Society Reviews*, **2012**; 41, 5969-5985.
10. T. P. Lodge; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2003**; 204, 265-273.
11. C. Bouilhac, E. Cloutet, D. Taton, A. Deffieux, R. Borsali, H. Cramail; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2009**; 47, 197-209.
12. C. Travelet, C. Bouilhac, J.-J. Robin, R. Borsali; *Soft Matter*, **2014**; 10, 7545-7557.
13. G. Lopez, M. Guerre, J. Schmidt, Y. Talmon, V. Ladmiral, J.-P. Habas, B. Ameduri; *Polymer Chemistry*, **2016**; 7, 402-409.
14. C. De Las Heras Alarcon, S. Pennadam, C. Alexander; *Chemical Society Reviews*, **2005**; 34, 276-85.
15. J. Jiang, B. Qi, M. Lepage, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2007**; 40, 790-792.
16. J. Tao, G. Liu; *Macromolecules*, **1997**; 30, 2408-2411.
17. J. Zhang, X. Jiang, Y. Zhang, Y. Li, S. Liu; *Macromolecules*, **2007**; 40, 9125-9132.
18. E. S. Read, S. P. Armes; *Chemical Communications*, **2007**; 3021-3035.
19. S. Fujii, Y. Cai, J. V. M. Weaver, S. P. Armes; *Journal of the American Chemical Society*, **2005**; 127, 7304-7305.
20. X. Jiang, S. Luo, S. P. Armes, W. Shi, S. Liu; *Macromolecules*, **2006**; 39, 5987-5994.
21. A. Guo, G. Liu, J. Tao; *Macromolecules*, **1996**; 29, 2487-2493.
22. F. Henselwood, G. Liu; *Macromolecules*, **1997**; 30, 488-493.
23. J. Ding, G. Liu; *Chemistry of Materials*, **1998**; 10, 537-542.
24. G. Wang, F. Henselwood, G. Liu; *Langmuir*, **1998**; 14, 1554-1559.
25. J. Tao, S. Stewart, G. Liu, M. Yang; *Macromolecules*, **1997**; 30, 2738-2745.
26. V. Bütün, N. C. Billingham, S. P. Armes; *Journal of the American Chemical Society*, **1998**; 120, 12135-12136.
27. X. Jiang, G. Zhang, R. Narain, S. Liu; *Soft Matter*, **2009**; 5, 1530-1538.
28. S. Mavila, O. Eivgi, I. Berkovich, N. G. Lemcoff; *Chemical Reviews*, **2016**; 116, 878-961.
29. Y. Chen, A. E. Tavakley, T. M. Mathiason, T. A. Taton; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2006**; 44, 2604-2614.
30. G. Kaur, P. Johnston, K. Saito; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 2171-2186.
31. S. Chatani, C. J. Kloxin, C. N. Bowman; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 2187-2201.
32. Y. Huang, R. Dong, X. Zhu, D. Yan; *Soft Matter*, **2014**; 10, 6121-6138.
33. J. S. Kim, J. H. Youk; *Polymer*, **2009**; 50, 2204-2208.
34. Q. G. Ma, E. E. Remsen, T. Kowalewski, K. L. Wooley; *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**; 123, 4627.
35. J. He, X. Tong, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2009**; 42, 4845-4852.
36. S.-I. Yusa, M. Sugahara, T. Endo, Y. Morishima; *Langmuir*, **2009**; 25, 5258-5265.
37. J. Tao, G. Liu, J. Ding, M. Yang; *Macromolecules*, **1997**; 30, 4084-4089.
38. W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernández, V. N. Swaminathan et al. B. Kohler; *Science*, **2007**; 315, 625-629.
39. D. Wang, X. Wang; *Progress in Polymer Science*, **2013**; 38, 271-301.
40. Y. Shi, R. M. Cardoso, C. F. Van Nostrum, W. E. Hennink; *Polym. Chem.*, **2015**; 6, 2048-2053.
41. S. R. Trenor, A. R. Shultz, B. J. Love, T. E. Long; *Chemical Reviews*, **2004**; 104, 3059-3078.

42. J. Babin, M. Lepage, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2008**; 41, 1246-1253.
43. S. Dahmane, A. Lasia, Y. Zhao; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2008**; 209, 1065-1072.
44. T. Wolff, H. Gerner; *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2004**; 6, 368-376.
45. J.-O. Joswig, T. Lorenz, G. Seifert; *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **2014**; 228.
46. K. Iliopoulos, O. Krupka, D. Gindre, M. Sallé; *Journal of the American Chemical Society*, **2010**; 132, 14343-14345.
47. J. He, Y. Zhao; *Dyes and Pigments*, **2011**; 89, 278-283.
48. J. He, L. Tremblay, S. Lacelle, Y. Zhao; *Soft Matter*, **2011**; 7, 2380-2386.
49. G. Xu, C. Shi, D. Guo, L. Wang, Y. Ling, X. Han, J. Luo; *Acta Biomaterialia*, **2015**; 21, 85-98.
50. Q. Jin, X. Liu, G. Liu, J. Ji; *Polymer*, **2010**; 51, 1311-1319.
51. R. Hoogenboom, H. Schlaad; *Polymers*, **2011**; 3, 467.
52. R. Hoogenboom; *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**; 48, 7978-7994.
53. D. Rayeroux, V. Lapinte, P. Lacroix-Desmazes; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2012**; 50, 4589-4593.
54. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2013**; 51, 1118-1128.
55. C. Alexis, C. Charnay, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Progress in Organic Coatings*, **2013**; 76, 519-524.
56. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Macromolecules*, **2010**; 43, 5964-5970.
57. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Macromolecular Rapid Communications*, **2012**; 33, 1600-1612.
58. C. L. Giardi, V.; Charnay, C.; Robin, J. J.; *React. Funct. Polym.*, **2009**; 69, 643-649.
59. C. Giardi, V. Lapinte, F. Nielloud, J.-M. Devoisselle, J.-J. Robin; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2010**; 48, 4027-4035.
60. M. Stemmelen, C. Travelet, V. Lapinte, R. Borsali, J.-J. Robin; *Polymer Chemistry*, **2013**; 4, 1445-1458.
61. C. Travelet, M. Stemmelen, V. Lapinte, F. Dubreuil, J.-J. Robin, R. Borsali; *Journal of Nanoparticle Research*, **2013**; 15.
62. L. Korchia, C. Bouilhac, V. Lapinte, C. Travelet, R. Borsali, J.-J. Robin; *Polymer Chemistry*, **2015**; 6, 6029-6039.
63. Z. S. Kean, G. R. Gossweiler, T. B. Kouznetsova, G. B. Hewage, S. L. Craig; *Chemical Communications*, **2015**; 51, 9157-9160.
64. H. S. a. T. Tamura; *US Pat.*, **2012**; US 8,258.
65. K. Loos, A. Böker, H. Zettl, M. Zhang, G. Krausch, A. H. E. Müller; *Macromolecules*, **2005**; 38, 873-879.
66. Y. Zhao; *Macromolecules*, **2012**; 45, 3647-3657.
67. J. Q. Zhao, E. M. Pearce, T. K. Kwei, H. S. Jeon, P. K. Kesani, N. P. Balsara; *Macromolecules*, **1995**; 28, 1972-1978.
68. W. F. Edmonds, Z. Li, M. A. Hillmyer, T. P. Lodge; *Macromolecules*, **2006**; 39, 4526-4530.
69. R. Ivanova, T. Komenda, T. B. Bonné, K. Lüdtkke, K. Mortensen, P. K. Pranzaset al.C. M. Papadakis; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2008**; 209, 2248-2258.



Chapitre 4

Chapitre 4 : Copolymères hétérogreffés : assemblage photo-réticulable et nano-structuration complexe

1. Introduction

Après avoir étudié des copolymères amphiphiles di- et triblocs photo-actifs, nous nous intéresserons ici aux copolymères amphiphiles hétérogreffés de mêmes entités structurales : chaîne polyoxazoline, motif photo-sensible coumarine et chaîne alkyle. Ces architectures macromoléculaires sont obtenues par copolymérisation de monomères de type méthacrylate porteurs de chaîne polyoxazoline et de chaîne alkyle en C₁₁ possédant en son extrémité un motif coumarine (Figure 4-1).

Dans un premier temps, il s'agira d'étudier leur capacité d'auto-assemblage dans l'eau en fonction leur balance hydrophile/hydrophobe ou encore la longueur du squelette principal. Ces architectures sont également connues pour être capables de s'organiser en solution sous forme de nano-objets de morphologies originales comme des nanofibres ou des micelles cylindriques. Par conséquent, la deuxième partie de cette étude focalisera sur la recherche de nano-objets de morphologies originales et la mise en évidence de l'intérêt de l'association polyoxazoline-coumarine dans l'élaboration d'une structuration à grande échelle.

Ces copolymères ont également un caractère photo-sensible qui au regard du nombre de motifs coumarine par chaîne assure la photo-réticulation du cœur des nanoparticules lorsqu'elles sont sous forme sphérique. Il sera par la suite (chapitre 5) intéressant de comparer la photo-activité de ces nanoparticules à celles des nanoparticules obtenues à partir des copolymères linéaires di- et triblocs capables de photo-dimérisation du cœur.

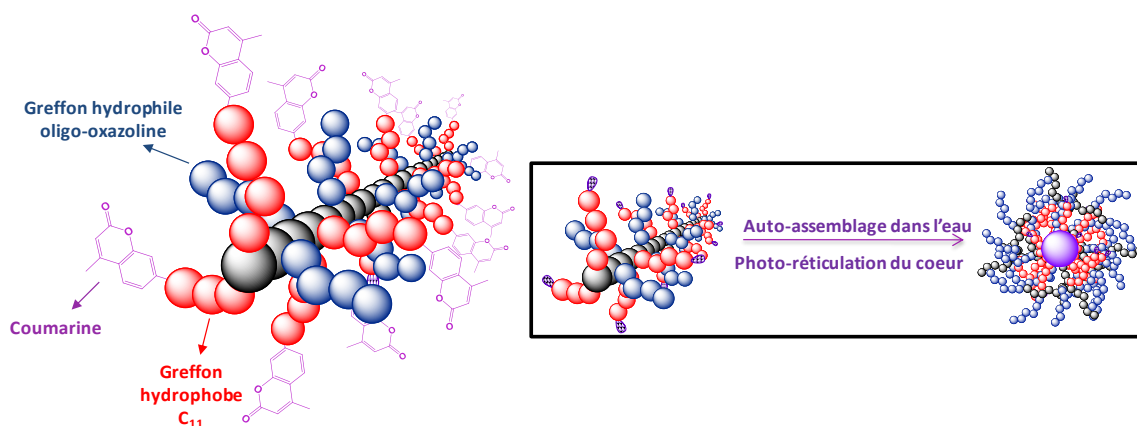


Figure 4-1 : Copolymère amphiphile hétérogreffé à base de greffons polyoxazoline et de greffons hydrophobes porteurs d'unités coumarine terminales et principe d'auto-assemblage en des nano-objets au cœur photo-réticulable.

2. Bibliographie sur les copolymères amphiphiles hétérogreffés

2.1. Généralités sur la synthèse de copolymères hétérogreffés

La chimie macromoléculaire est un outil essentiel pour la création de nouveaux matériaux aux fonctionnalités et aux propriétés novatrices.¹ Ceci se traduit par le *design* de topologies bien définies qui permettent de moduler ces propriétés.² Les **copolymères greffés**, possédant des chaînes latérales chimiquement liées à un squelette principal linéaire, sont dotés de propriétés singulières de part leur structure confinée et compacte en comparaison aux copolymères linéaires.^{3,4, 5} Ces structures se caractérisent par des paramètres structuraux modulables à savoir la longueur du squelette principal, la longueur des chaînes latérales, la densité de greffage ou encore la composition chimique. Grâce à la maîtrise des processus de polymérisation libres ou vivants et contrôlés, trois principales **stratégies de synthèse** peuvent être employées afin d'accéder à des copolymères greffés⁶⁻⁸ comme illustré dans la Figure 4-2.^{3, 9}

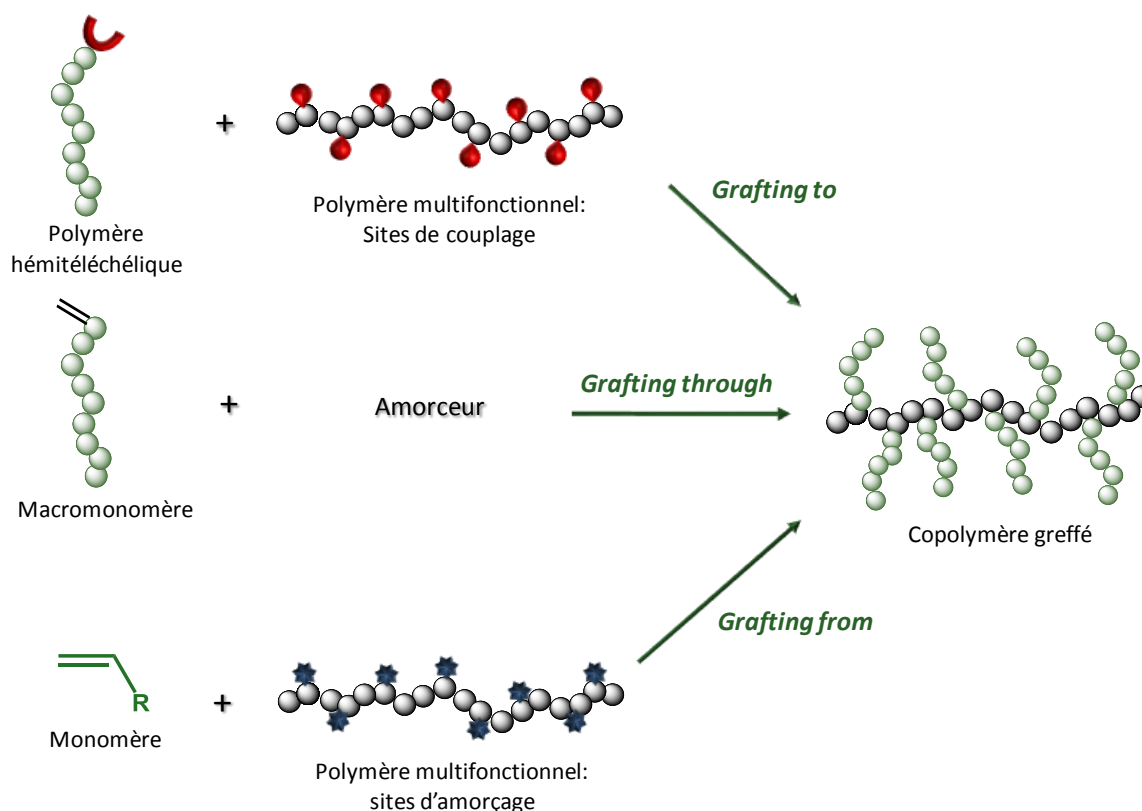


Figure 4-2 : Stratégies de synthèse des copolymères greffés.

- Le *grafting to* (ou *onto*) consiste à lier de manière covalente les chaînes polymères latérales, préalablement synthétisées, au squelette de la chaîne principale, également préalablement synthétisé, par des réactions de couplage. Pour cela, le squelette possède des sites de couplage

répartis tout au long de la chaîne polymère. Les greffons sont quant à eux des polymères hémitélchéliques possédant à leur extrémité de chaîne une fonction capable de se greffer aux sites de couplage. Cette méthode requiert toutefois une efficacité de couplage élevée et l'élimination des chaînes latérales n'ayant pas réagi,

- Le *grafting through* repose sur la copolymérisation de macromonomères. Ainsi, la longueur des chaînes latérales, le degré de polymérisation du squelette principal, la densité de greffage et la composition peuvent être facilement contrôlés et ajustés. En raison de ces caractéristiques attractives, de nombreux copolymères greffés sont synthétisés par cette approche tout comme les copolymères greffés présentés dans cette étude,

- Le *grafting from* se distingue enfin par la croissance des chaînes latérales à partir de sites d'amorçage présents sur le squelette de la chaîne principale. Ce macro-multiamorceur peut être directement obtenu par l'utilisation de monomères contenant des sites d'amorçage ou par l'introduction de groupes amorceurs sur le squelette précurseur. Cette approche est généralement utilisée pour la polymérisation des greffons par voie contrôlée telle que la RAFT ou l'ATRP. Bien qu'une faible concentration du milieu réactionnel soit nécessaire pour éviter toute réaction secondaire de couplage ou de terminaison, la croissance graduelle des chaînes latérales permet de diminuer l'effet d'encombrement stérique inévitable dans les deux voies précédentes et d'éviter toute étape d'élimination d'amorceur ou de greffons n'ayant réagi. Cependant, par cette approche, l'utilisation d'un macro multi-amorceur induit la formation de greffons dont la taille s'avère être difficilement contrôlable.

La variation des nombreux paramètres structuraux des copolymères greffés a une influence directe sur leur **auto-assemblage**. Par exemple, lorsque les longueurs des greffons et du squelette principal sont du même ordre de grandeur, les nano-objets formés en solution sont généralement de morphologie sphérique. En revanche, lorsque la longueur du squelette est significativement supérieure à celle des greffons, celle-ci peut s'avérer de type *wormlike*, tubulaire ou nanofibre. De plus, une forte densité de greffage combinée à une importante longueur du squelette peut conduire à des structures dites *bottle brush* capables de s'organiser en solution de façon unimoléculaire.¹⁰ Leurs propriétés physiques diffèrent donc de celles des polymères linéaires ordinaires de par la présence des chaînes latérales et peuvent conduire à des nanostructures originales (Figure 4-3).³

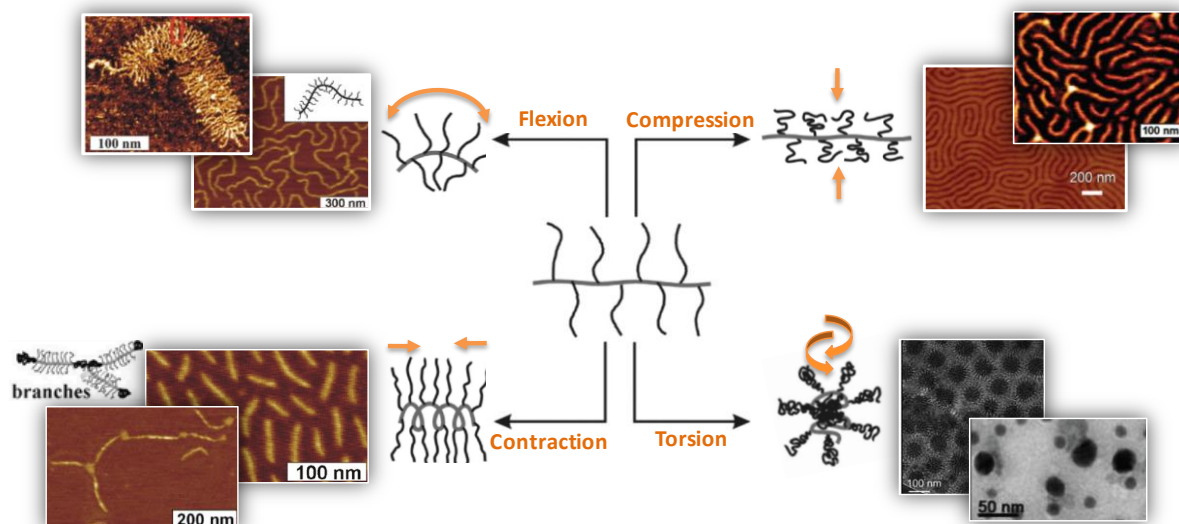


Figure 4-3 : Nanostructures originales obtenues à partir de copolymères greffés en fonction des paramètres structuraux.

Les **copolymères greffés amphiphiles** peuvent présenter différents agencements. Dans ce cas, l'amphiphilie est obtenue par l'utilisation soit i) de greffons hydrophiles sur une chaîne principale hydrophobe ou inversement soit ii) de greffons eux mêmes amphiphiles.¹¹⁻¹⁵ A ces derniers s'ajoute la famille des **copolymères hétérogreffés amphiphiles**, caractérisés par "l'alternance" de greffons de nature différente à savoir hydrophile ou hydrophobe. Ces copolymères sont généralement synthétisés par copolymérisation de macromonomères hydrophiles et hydrophobes préalablement synthétisés (*grafting through*).^{16, 17} Dans ce cas, il est possible de faire varier la longueur des chaînes pendantes, celle du squelette principal mais également de jouer sur la balance hydrophile/hydrophobe en faisant varier la composition en macromonomères (Figure 4-4).

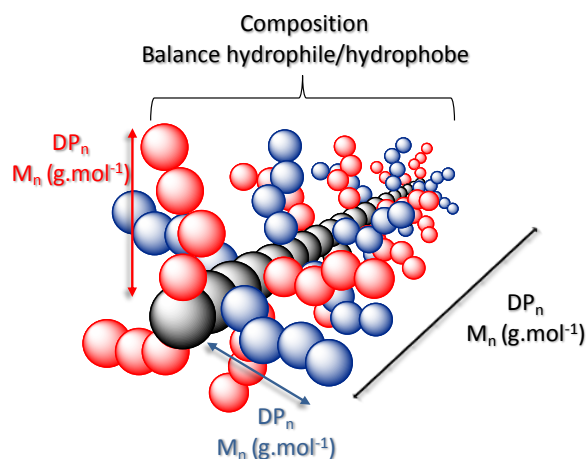


Figure 4-4 : Paramètres caractéristiques des copolymères hétérogreffés amphiphiles.

Ces structures hétérogreffées amphiphiles sont généralement constituées de poly(éthylèneglycol), polymère hydrophile, associé le plus couramment à des polymères hydrophobes de type poly(styrène),¹⁷ poly(lactide)¹⁵ ou poly(acrylate de butyle)¹⁶ et rattachés à un même squelette à base de poly(méthacrylate) tel que le décrit Matyjazowski.¹⁸ Pour cela, leur copolymérisation se fait le plus souvent par polymérisation radicalaire contrôlée type RAFT ou ATRP afin d'obtenir des longueurs de squelette contrôlées et de faible dispersité.¹⁹

La suite de ce chapitre se focalisera sur l'étude de copolymères hétérogreffés amphiphiles à base de polyoxazoline rendues photo-sensibles par l'insertion d'unités coumarine au sein de ces structures.

2.2. Polyoxazolines hétérogreffées photo-sensibles

De nombreux copolymères greffés à base de polyoxazoline sont répertoriés dans la littérature. Parmi eux se trouvent les ***copolymères amphiphiles greffés***, développés notamment par Schmidt avec l'élaboration de structures possédant des chaînes latérales hydrophiles polyoxazoline liées à un même squelette hydrophobe à base de poly(méthacrylamide).²⁰ Notre groupe a également élaboré des architectures constituées d'un squelette poly(ϵ -caprolactone) sur lequel sont couplés des greffons polyoxazoline.^{21, 22} Dans la plupart des structures étudiées, l'amphiphilie réside dans l'association de greffons polyoxazoline à une même chaîne hydrophobe. Concernant les ***copolymères hétérogreffés amphiphiles à base de polyoxazoline***, ces dernières ont principalement été développées par l'équipe de Schubert avec notamment des structures alternant des greffons poly(2-éthyl-2-oxazoline) hydrophile et poly(2-nonyl-2-oxazoline) hydrophobe.²³⁻²⁶

Un prolongement possible à ces structures consiste à leur associer un groupement photo-actif comme la coumarine, conduisant ainsi à un ***copolymère amphiphile hétérogreffé photo-actif***. Zhao a décrit un exemple associant des greffons hydrophiles poly(éthylèneglycol) ou N,N-diméthylaminoéthyle associés à des greffons hydrophobes 4-méthyl-[7-(méthacryloyl)oxy-éthoxy]coumarine rattachés à un même squelette poly(méthacrylate de méthyle).²⁷⁻³⁰ En revanche, comme nous l'avons vu au chapitre 1, bien que des études aient déjà été réalisées sur des polyoxazolines photo-sensibles, aucune d'entre elles ne porte sur des copolymères hétérogreffés amphiphiles à base de polyoxazoline associés à des coumarines.

3. Architecture des copolymères hétérogreffés amphiphiles étudiés

Ce quatrième chapitre porte sur l'élaboration et l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles hétérogreffés photo-stimulables associant pour la première fois les polyoxazolines au chromophore coumarine. Ces derniers sont obtenus par *grafting through* en copolymérisant des macromonomères de type méthacrylate, l'un hydrophile constitué d'un "oligomère oxazoline" (MOMOx) et l'autre hydrophobe composé d'une chaîne alkyle en C₁₁ terminées par une unité coumarine (MCm) (Figure 4-5). Une gamme de copolymères variée en terme de composition et de longueur de squelette principal est présentée dans cette étude. Ces paramètres structuraux ont été modulés afin d'évaluer l'influence du nombre de coumarines sur l'auto-assemblage. Il est à noter que la longueur du bloc MOMOx est maintenue fixe dans cette étude. Trois compositions en macromonomères ont été étudiées : i) une correspondant à un copolymère faiblement hydrophobe et donc très peu chargée en coumarine (30%), ii) une correspondant à un copolymère riche en coumarine (85 %) et très hydrophobe et iii) une composition intermédiaire (50%). Pour accentuer ces effets de balance hydrophile/hydrophobe et de nombre de coumarines par chaîne, deux gammes de masses molaires, faibles masses (5 000 g/mol) nommées Cm^j-OMOX^k (LM) et fortes masses (20 000 g/mol) nommées Cm^j-OMOX^k (HM) ont été visées pour chaque composition.

Dans cette optique, la copolymérisation simultanée par voie radicalaire contrôlée (RAFT) a été entreprise mais n'a pas permis d'accéder à des copolymères de fortes masses molaires, limitation à 10 000 g/mol. En raison de l'encombrement stérique occasionné par l'utilisation de macromonomères, leur polymérisation radicalaire contrôlée n'atteint pas des conversions élevées et des réactions de transfert et de terminaison sont observées au fur et à mesure de la conversion. C'est pourquoi, afin d'obtenir les deux gammes de masses molaires, la polymérisation par voie radicalaire libre a été privilégiée bien que celle-ci mène à des dispersités élevées de par le non contrôle de la croissance des chaînes. Cette étude se focalise essentiellement sur les copolymères statistiques Cm^j-s-OMOX^k, où les greffons sont répartis de manière aléatoire le long du squelette principal.

Cependant, afin de comparer ces architectures statistiques aux copolymères diblocs analogues, le copolymère dibloc Cm⁵⁰-b-OMOX⁵⁰ a été élaboré. Ce dernier, a été obtenu par copolymérisation successive des deux macromonomères MCm et MOMOx selon le processus RAFT (Figure 4-5). Dans ce cas, bien que le procédé RAFT soit ici limité à des masses molaires de l'ordre de 10 000 g/mol, l'association d'un bloc hydrophile homo-

poly[oligo(oxazoline)] (HOMOx) à un bloc hydrophobe d'homopolymère porteur de coumarines en extrémité de chaînes pendantes (HCm) permet d'accéder à un copolymère dibloc de masse molaire équivalente à celles des copolymères statistiques (HM). Pour cela, dans un premier temps, le macromonomère hydrophile MOMOx est polymérisé par RAFT (masse molaire visée 10 000 g/mol) donnant ainsi un bloc hydrophile, HOMOx, servant de macro-agent de transfert pour la polymérisation RAFT du second bloc hydrophobe (masse molaire visée 10 000 g/mol). Le copolymère greffé dibloc $\text{Cm}^{50}\text{-b-OMOx}^{50}$ possède ainsi une masse molaire de l'ordre de 20 000 g/mol comparable à son homologue statistique de composition $\text{Cm}^{55}\text{-s-OMOx}^{45}$ voisine (Tableau 4-1).

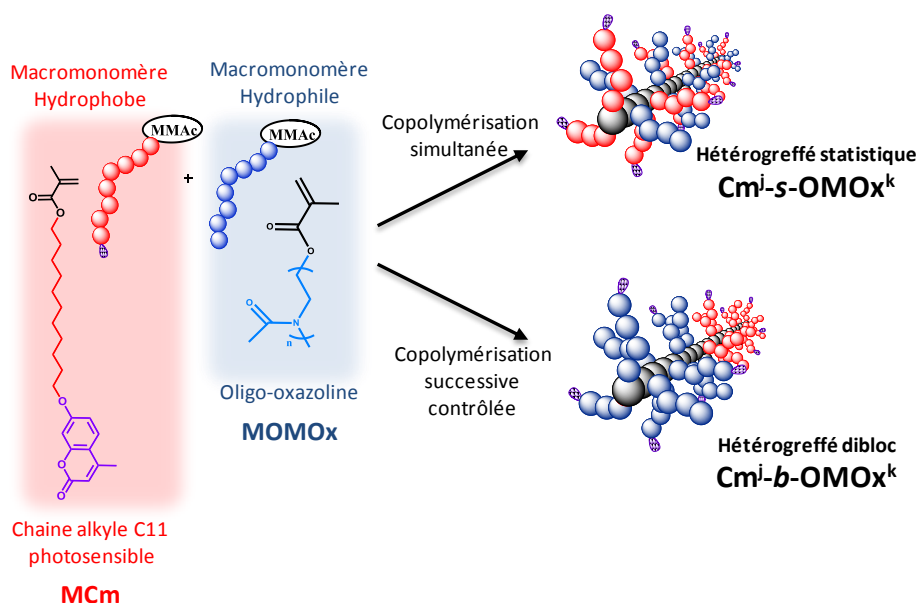


Figure 4-5 : Stratégies de synthèse des copolymères hétérogreffés amphiphiles photo-sensibles à base de polyoxazoline.

Tableau 4-1 : Récapitulatif des copolymères $\text{Cm}^i\text{-s-OMOx}^k$ (LM), (HM) et $\text{Cm}^i\text{-b-OMOx}^k$ synthétisés.

Macromonomères	$n\text{CH}_2^a$ [-]	$\text{DP}_{\text{nPOx}}^b$ [-]	M_n^c [g mol ⁻¹]	$\bar{D}^c$ [-]	Copolymères heterogreffés	M_n^c [g mol ⁻¹]	$\bar{D}^c$ [-]	Cm : POx^d [%]	$\text{DP}_{\text{nPOx}}^b$ [-]	DP_{nCm}^b [-]	$M_{\text{POx}} / M_{\text{Cm}}^e$ [-]
Hydrophobe MCm	11	-	380	1	$\text{Cm}^{85}\text{-POx}^{15}$ (LM)	5100	2,6	85:15	2	11	0.2
					$\text{Cm}^{49}\text{-POx}^{51}$ (LM)	5200	2,4	49:51	6	7	1
					$\text{Cm}^{30}\text{-POx}^{70}$ (LM)	4 800	2,5	30:70	8	4	2.3
Hydrophile MPOx	-	4	430	1,2	$\text{Cm}^{85}\text{-POx}^{15}$ (HM)	22 000	2,8	85:15	7	45	0.2
					$\text{Cm}^{55}\text{-POx}^{45}$ (HM)	22 400	2,8	53:47	25	31	0.9
					$\text{Cm}^{29}\text{-POx}^{71}$ (HM)	20 000	2,6	29:71	36	16	2.5
					$\text{Cm}^{50}\text{-b-POx}^{50}$ (HM)	19 000	1,5	50:50	24	25	1.1

4. Publication: UV-responsive amphiphilic grafted polyoxazoline

Cette publication a pour objectif d'étudier par DLS l'influence de la balance hydrophile/hydrophobe et de la longueur de la chaîne principale du copolymère sur son auto-assemblage dans l'eau ainsi que l'effet de la photo-irradiation sur les nanoparticules.

UV-responsive amphiphilic grafted copolymers based on coumarin and polyoxazoline

Laetitia Korchia,^a Cécile Bouilhac,^{a,*} Christophe Travelet,^{b,c} Redouane Borsali,^{b,c} Jean-Jacques Robin^a and Vincent Lapinte^a

^a Institut Charles Gerhardt - UMR 5253 CNRS/UM/ENSCM - Ingénierie et Architectures Macromoléculaires, Université Montpellier, Bâtiment 17, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier Cedex 5, France

^b Université Grenoble Alpes, CERMAV, F-38000 Grenoble, France

^c CNRS, CERMAV, F-38000 Grenoble, France

Abstract

A series of amphiphilic photo-responsive heterografted copolymers has been successfully synthesized. The random copolymers were composed of a methacrylate backbone, with various compositions of hydrophilic oligomeric 2-methyl-2-oxazoline side chain (OMOx) and hydrophobic long alkyl chain terminated by a coumarin moiety (Cm). Using dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM), their self-assembling behavior was studied in water *using* the nanoprecipitation method. Depending on the systems, one, two or three particle populations co-exist in solution. However, DLS-measurements showed that monomodal and slightly polydisperse self-assemblies were obtained with the more hydrophobic copolymers (*i.e.*, 85% of hydrophobic monomers based on a long alkyl chain terminated by a coumarin moiety, MCm, per molecule) with hydrodynamic diameters ranging from 131 to 302 nm. Morphological informations on these self-assembly structures were obtained using static light scattering (SLS): a Gaussian behavior has thus been evidenced. Finally, these heterografted copolymers were illuminated upon UV-light at $\lambda = 350$ nm inducing the photo-crosslinking of the coumarin units. The influence of the UV-illumination on the so-formed nanoparticles was investigated by carrying out complementarily DLS-measurements and UV spectroscopy.

Introduction

Nowadays, the advancements in the field of modern synthetic polymer chemistry provided a useful toolbox for the synthesis of manifold polymeric architectures and promoted a considerable interest to the polymers having nonlinear architectures with different compositions and topologies such as star, graft, hyperbranched, dendrimer, and cyclic structures.^{23, 31-33 34, 35} More precisely, grafted polymers are characterized by side chains connected to a backbone of different natures. Next to “simple” grafted polymers, a range of more advanced architectures has been realized with diblock or even triblock copolymer side chains. However, there are only few examples of grafted polymers containing two different kinds of side chains, namely “heterografted” copolymers. These types of copolymers are highly interesting for both synthetic and physical polymer sciences. In particular, the combination of two types of side chains with different properties that are connected to the same polymer backbone might lead to new insights into the area of macromolecules as well as materials with exceptional properties. Grafted copolymers can be obtained by three general routes: (i) grafting-onto, in which side chains are preformed, then grafted to the backbone; (ii) grafting-from, in which the monomer is polymerized from the backbone; and (iii) grafting-through, in which the macromonomers are copolymerized.³ However, both grafting-from or grafting-onto approaches can guarantee full functionalization in side chains and the well-defined distribution of the side chains along the backbone. In view of this background, it seems to be favorable to copolymerize two different macromonomers. By this way, the copolymerization of a hydrophobic and an hydrophilic macromonomers reaches an amphiphilic heterograft copolymer capable of self-assembling into a selective solvent. This unusual architecture leads to a number of novel, unique and potentially useful properties.¹⁰ For example, unlike linear block copolymers, the heterograft copolymers can self-assemble into a large domain size (up to several hundred nanometers),³ or micelles having a much lower critical micelle concentration than that of linear diblock copolymers or surfactants.³⁶ Such behavior enables applications such as detection or sensing in biological media that require dilute conditions. Besides, the functionalization of the grafted side-chains can be useful for recognition, imaging or drug delivery in aqueous environment.⁴ Recent works have explored the diverse properties and functions of heterograft copolymers in solution,¹¹ film,³⁷ and melt,³⁸ and their applications in photonic materials, films for lithographic patterning, drug delivery, tumor detection and imaging.¹⁵ An interesting approach consists in photo-activating these heterograft structures with the functionalization of the side chains by a photo-chromic

moiety. Among photo-chromic units, coumarin and its numerous derivatives represent attractive molecules. They have been widely used in a variety of functional polymeric materials including liquid crystals, electro-optical polymers and biomaterials^{29, 39} as summarized in a comprehensive review written by Trenor *et al.*⁴⁰ Through their photo-chemical and photo-physical properties, coumarins are particularly interesting for their ability to dimerize reversibly upon absorption of photons according to the wavelength used. Indeed, an UV-exposure of two coumarin units at 310 nm allows the formation of a cyclobutan dimer by photo-cycloaddition. They are then able to de-dimerize and recover their initial state under an irradiation of 254 nm by photo-cleavage. In this way, such photo-responsive units have been inserted within heterograft copolymers in order to improve the stability of their self-assemblies in solution. Numerous studies reported the photo-cross-linking of nanoparticles obtained from amphiphilic heterograft copolymers bearing photo-coumarin units at the extremities of hydrophobic side chains. Zhao and *al.* used coumarins for designing light-responsive or photo-controllable polymer particles in solution.²⁷ These copolymers were mainly based on poly(ethyleneglycol) (PEG) or, in a few examples, on N,N-dimethylaminoethyl methacrylate as hydrophilic side chains associated to hydrophobic side chains constituted of 4-methyl-[7-(methacryloyl)oxy-ethyl-oxy]coumarin linked to a same poly(methylmethacrylate) backbone giving nanoparticles with diameters from 100 to 300 nm.^{27, 29, 41, 42} As linked to the hydrophobic part of the copolymers, the coumarin moieties were located in the inner part of the nanoparticles after self-assembly in aqueous solution. These nanoparticles having a photo-responsive core were able to reversibly photo-crosslink under external UV-exposure.

Furthermore, polyoxazolines, an emerging class of polymers, obtained by cationic ring-opening polymerization (CROP), represent an interesting alternative to PEG due to their specific properties. Indeed, from their peptide structure analogy, those polymers are known for their high hydrophilicity, biocompatibility and furtivity. Their properties can be adjusted by the variation of the substituent in 2-position of the monomer ring. However, to date, none study on amphiphilic heterograft copolymers composed of polyoxazolines and long hydrophobic side chains bearing coumarins at their extremities was reported. In a previous work, we reported the first example of amphiphilic diblock based-polyoxazoline polymers bearing at the hydrophobic block extremity the photo-responsive unit coumarin.⁴³ The presence of only one coumarin moiety per chain leads, after self-assembly in water, to nanoparticles able to core-photo-dimerized under UV-exposure at 350 nm.

In this contribution, we report on the synthesis of statistical copolymers composed of a poly(methacrylate) backbone from which hydrophilic and hydrophobic side chains are pending. The hydrophilic side-chains are constituted of oligo(2-methyl-2-oxazoline) (OMOx) whereas the hydrophobic ones are based on long alkyl chains terminated by a photo-responsive coumarin moiety. As mentioned above, the literature does not depict examples of photo-responsive heterograft copolymers associating OMOx and photo-sensitive coumarin group located at the extremity of a long alkyl chain. In addition, the copolymers were capable of self-assembling in solution and their ability of cross-linking under UV-irradiation was investigated.

Experimental

Materials

2-Methyl-2-oxazoline (MOx, Sigma Aldrich, 99%) was dried over CaH_2 , distilled at reduced pressure and stored under dry nitrogen atmosphere. 7-(11-hydroxyundecyloxy)-4-methylcoumarin (CmOH) was synthesized according to our procedure previously reported by our research group.⁴³ Methyl *p*-toluenesulfonate (MeOTs, Sigma Aldrich, 97.0%), methacrylic acid (MAA, Alfa Aesar, 99%), triethylamine (Et_3N , Sigma Aldrich, 98%), methacryloyl chloride (MACl, Sigma Aldrich, 99%), 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN, Sigma Aldrich, 99%), anhydrous acetonitrile (Sigma Aldrich, 99.9%), anhydrous N,N-dimethylformamide (DMF, Sigma Aldrich, 99%), anhydrous acetone (Sigma Aldrich, 98%), diethylether, anhydrous chloroform (Sigma Aldrich, 99%), dichloromethane, ethanol, methanol, magnesium sulfate (MgSO_4), potash (KOH) and potassium carbonate (K_2CO_3) were commercial products and used without further purification. Dialysis membranes Spectra/Por® - MWCO 1.5 kDa were purchased from Spectrum Laboratories.

Measurements

^1H nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectra were recorded at room temperature on a NMR BrukerAvance I 300 MHz or on a BrukerAvance III 600 MHz in deuterated chloroform (CDCl_3). The chemical shifts are in part per million (ppm), where (s) means a singlet, (d) a doublet, (t) a triplet and (m) a multiplet. Chemical shifts (^1H NMR) were referenced to the peak of residual CHCl_3 at $\delta = 7.26$ ppm.

Size exclusion chromatography (SEC) with N,N-dimethylacetamide (DMAc) (with 0.1 w/w% LiCl) as eluent at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} , calibrated with poly(methylmethacrylate) (PMMA) standards, was performed on a PL-GPC 50 Plus equipped with a Varian model 410 autosampler. The SEC apparatus comprised a refractive index detector and was filled with a $8 \mu\text{m}$ PolarGel-M pre-column ($7.5 \times 50 \text{ mm}$) and two $8 \mu\text{m}$ PolarGel-M columns ($7.5 \times 300 \text{ mm}$) thermostated at 50°C .

Light scattering measurements were performed using an ALV/CGS-8FS/N069 apparatus (from ALV) equipped with an ALV/LSE-5004 multiple τ digital correlator with a 125 ns initial sampling time (from ALV) and a 35 mW red helium-neon linearly polarized laser operating at a wavelength of 632.8 nm (from JDSU). After being loaded in a 10 mm diameter cylindrical cell, the polymer suspension was immersed in a toluene bath and thermostated at a temperature of $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ prior to measurement. Data were collected at different scattering angles ranging from 20 to 150° (i.e. $4.59 \times 10^{-3} \leq q = (4\pi n/\lambda) \sin(\Theta/2) \leq 2.56 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ in pure water where q represents the scattering vector modulus, n the refractive index of the pure solvent, λ the wavelength of the incident light *in vacuo* and Θ the observation angle relative to the transmitted beam) by step of 1° for a counting time of typically 60 s using the digital ALV correlator control software. In dynamic light scattering (DLS), the relaxation time distribution was obtained using CONTIN analysis of the autocorrelation function $(g^{(2)}-1)$.^{44, 45} In static light scattering (SLS), the scattering intensity was corrected by the solvent signal and normalized by the toluene signal. The scattering volume change with observation angle was also taken into account.

Transmission electron microscopy (TEM) was performed using a JEOL, JEM – 2100F microscope operating at 200 kV. $10 \mu\text{L}$ of aqueous copolymer suspension concentrated at 0.04 mg mL^{-1} was dropped onto glow-discharged carbon-coated copper grids (Agar scientific, Cu-300) and the excess liquid was blotted with filter paper. Then, $10 \mu\text{L}$ of a 4 w/v% aqueous uranyl acetate negative stain solution was added. After 30 s, the excess of liquid was again blotted.

The UV-dimerization of the heterograft copolymers was performed in a cylindrical photochemical reactor “Rayonnet RPR-200” equipped with 16 symmetrically placed lamps with emission maximum at 350 nm (UV-B). The samples were irradiated in quartz cuvettes placed on a circular rotating holder. UV-visible analyses were conducted with a Perkin Elmer lambda 35 UV/Vis spectrometer equipped with PTP-1+1 Peltier system in vial quartz (length = 1 cm).

Synthesis of oligo(2-methyl-2-oxazoline) methacrylate (MOMOx)

To a 100 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar, MeOTs (5.5 g, 29 mmol) and MOx (9.9 mL, 118 mmol) were added and dissolved in 30 mL of anhydrous acetonitrile. After 15 min bubbling under nitrogen, the solution was vigorously stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. The resulting polymer was then quenched by the quick addition of a solution of methacrylic acid (3.7 mL, 43 mmol) and triethylamine (7.8 mL, 60 mmol). The flask was maintained at 80 °C for 24 h. After cooling, the reaction mixture was concentrated, then dissolved in chloroform and washed with brine and a saturated sodium carbonate solution (3 times). The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The macromonomer MOMOx was isolated in 70% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.1 (t, 1H, H_i), 5.6 (t, 1H, H_j), 4.3 (m, 2H, H_{b'}), 3.6 (m, 2H, H_{a'}), 3.5-3.1 (m, 16H, H_a and H_b), 3 (s, 3H, H_e), 2.3 (s, 3H, H_{d'}), 2.2-2 (m, (12H, H_d), 1.9 (s, 3H, H_h).

SEC (DMAc, RI detection, PMMA calibration): M_n = 430 g mol⁻¹, Đ = 1.2; degree of polymerization = 4.

Synthesis of 7-(11-methacryloyloxyundecyloxy)-4-methylcoumarin (MCm)

In a three-necked flask equipped with a magnetic stir bar, a solution of methacryloyl chloride (5.9 mL, 61 mmol) in 19 mL of anhydrous chloroform was added dropwise to CmOH (10 g, 29 mmol) in the presence of triethylamine (8.5 mL, 63 mmol) and 100 mL of anhydrous chloroform. The reaction vessel was cooled down in an ice bath during the addition and the reaction mixture was left under stirring at room temperature for 24 h. The reaction mixture was filtered and concentrated. Then, dichloromethane was added and the solution was washed three times with brine. The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. A recrystallization from ethanol gave MCm as a white powder in 84% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.4 (d, 1H, H₂), 6.8-6.7 (m, 2H, H₇ and H₉), 6.1 (s, 1H, H₆), 6 (t, 1H, H₂₃), 5.5 (t, 1H, H₂₄), 4.1 (t, 2H, H₂₁), 3.9 (t, 2H, H₁₁), 2.3 (s, 3H, H₄), 1.9 (t, 2H, H₂₂), 1.5-1.2 (m, 18H, H₁₂-H₂₀).

SEC (DMAc, RI detection, PMMA calibration): M_n = 380 g mol⁻¹, Đ = 1.1.

Synthesis of the amphiphilic photo-responsive heterografted copolymers (Cm^j-OMOX^k)

A typical procedure for the synthesis of Cm⁴⁹-OMO⁵¹ (LM) is described here. A dry round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar was charged with MPOx₄ (1.0 g, 2.33 mmol), MCm (0.88 g, 2.33 mmol), AIBN (0.061 g, 0.37 mmol) and 15 mL of anhydrous DMF. The mixture was degassed by three freeze-pump-thaw cycles and immersed in an oil bath thermostatted at 80 °C under nitrogen flux for 4 h. The reaction mixture was then washed with water to remove by filtration the remaining water-insoluble MCm. The residual macromonomer MOMOX was then eliminated by dialysis in water using a MWCO 1.5 kDa cut-off. After concentration under reduced pressure and drying under vacuum overnight, the heterografted copolymer Cm⁴⁹-OMOx⁵¹ was isolated in 65% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.4 (d, 1H, H₂), 6.8-6.7 (m, 2H, H₇ and H₉), 6.1 (s, 1H, H₆), 4 (m, 302H, H_{A'}, H₁₁ and H₂₁), 3.7-3.2 (m, 192H, H_A and H_B), 3 (m, 147H, H_E), 2.3 (m, 300H, H₄ and H_{D'}), 2.2-1.8 (m, 144H and 102H, H_D and H₂₄), 1.7-0.8 (m, 1065H, H_h and H₁₂-H₂₀).

SEC (DMAc, RI detection, PMMA calibration): M_n = 5200 g mol⁻¹, Đ = 2.4.

Particle preparation

The particle preparation was carried out following three different manners:

- “*direct copolymer dissolution*”: the heterograft copolymer was directly mixed with the solvent (1 mg mL⁻¹) and magnetically stirred at 500 rpm for one day at room temperature before physico-chemical characterization,
- “*direct nanoprecipitation method*”: the heterograft copolymer was mixed with the organic solvent (*i.e.* acetone) (1 mg mL⁻¹), magnetically stirred at 500 rpm for one day at room temperature and then either let settle for 5 days or filtered through a 0.22 μm hydrophilic PTFE syringe filter (from Millipore). 1 mL of this mixture was slowly added to 1 mL of water using a syringe pump at a rate of 0.254 cm³.h⁻¹, while magnetically stirred at 500 rpm. 4 mL of water was subsequently added and the sample was magnetically stirred at 500 rpm for 2 hours. The organic solvent was completely removed out of the suspension under vacuum using a rotavapor. The final mixture was magnetically stirred at 500 rpm before physico-chemical characterization,

- “*inverse nanoprecipitation method*”: A similar process as the one exposed above was applied, with the difference that, in this case, 1 mL of water was slowly added to 1 mL of the copolymer suspension in organic solvent,

Results and discussion

Synthesis of amphiphilic photo-responsive heterografted copolymers

The first step of the amphiphilic photo-responsive heterograft copolymer synthesis comprises the preparation of the two macromonomers. The methacrylate-based hydrophobic macromonomer bearing a coumarin unit in the terminal position of a long alkyl chain was obtained by the nucleophilic substitution of bromine from 11-bromo-1-undecanol with 7-hydroxy-4-methylcoumarin forming 4-methyl[7-(11-hydroxy)-undecyl-oxy]coumarin, followed by its acylation with methacryloyl chloride (Figure 4-6 (a)).

The oligo(2-methyl-2-oxazoline) based hydrophilic macromonomer (MOMOx) was synthesized in one-pot. So as to work with comonomers having similar molecular weights, the degree of polymerization of the OMOx pending chain was set to 4 using the adequate ratio of monomer to initiator for the cationic ring opening polymerization (CROP) of 2-methyl-2-oxazoline (MOx). The introduction of the polymerizable methacrylate end-group was achieved by end-functionalization of the living oxazolinium species with *in situ* deprotonated methacrylic acid (Figure 4-6 (b)).

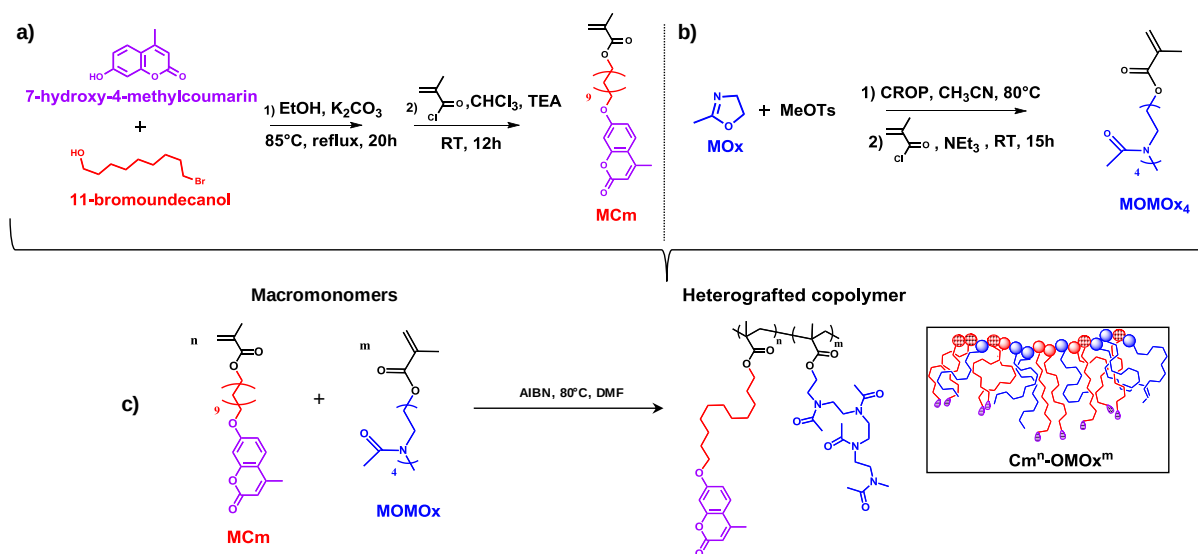


Figure 4-6: Synthesis of the amphiphilic coumarinated heterografted polyoxazoline-based copolymer Cm^j-OMOx^k by free copolymerization of MOMOx and MCm.

1H NMR analyses confirm the formation of both macromonomers with the signals of the acrylic protons at $\delta = 6.1$ and 5.6 ppm (Figure 4-7). Moreover, the signals of the coumarin aromatic protons are visible at $\delta = 7.4$, 6.7 and 6.0 ppm together with those of the methylenes in α -position of the coumarin group at $\delta = 3.8$ ppm on one hand, and of the acyl group at $\delta =$

4.2 ppm on the other hand. The signals associated to the protons of the alkyl chain are visible in the range of $\delta = 2.0$ to 1.2 ppm. As regards the MOMOx macromonomer, ^1H NMR spectrum reveals the presence of the methylene protons of the OMOx pending chains between $\delta = 4.4$ and 3.5 ppm whereas those attributed to the $-\text{CH}_3$ groups are present between $\delta = 2.5$ and 2.0 ppm. Besides, the MOMOx chains degree of polymerization (DP_n) of 4 was verified according to Equation 1:

$$\text{DP}_n(\text{MOMOx}) = \frac{1}{4} \left(\frac{I_{a'+b+a}}{I_j} - \frac{I_{b'}}{I_j} \right) \quad (1)$$

where $I_{a'+b+a}$ and $I_{b'}$ correspond to the integrals associated to the protons $\text{H}_{a'}$, H_b , H_a and $\text{H}_{b'}$ from the OMOx pending chain, and I_j corresponds to the integral of the acrylic proton H_j .

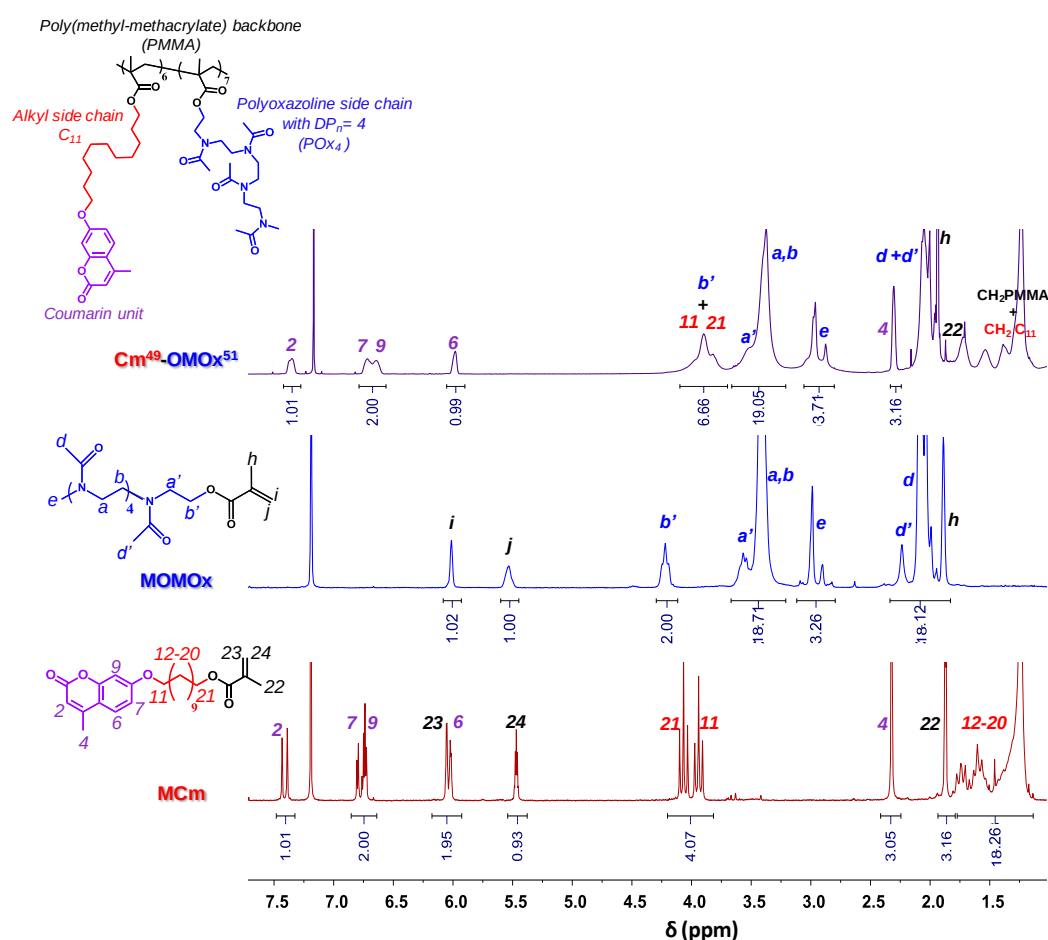


Figure 4-7 : ^1H NMR spectra (300 MHz, CDCl_3) of macromonomers MOMOx and MCm and the heterografted copolymer Cm⁴⁹-OMOX⁵¹.

The macromonomers were randomly copolymerized to give the amphiphilic photo-responsive heterografted copolymers. It is important to notice that, most often, the long pending chain induces interesting properties to the monomer but also considerably decreases its reactivity. This phenomenon was confirmed by preliminary studies that have shown that reverse addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of such macromonomers only leads to copolymers with low molecular weights and poor control of polymerization (data not given here). As in dynamic light scattering (DLS), the shortest main chains exhibit a quite distinct behaviour compared to longer ones (in terms of dynamics of exchange for instance). So, free radical polymerization, giving access to higher molecular weights, was preferred. Statistical amphiphilic copolymers were thus synthesized by free radical polymerization of the two macromonomers in DMF at 80 °C in the presence of AIBN as initiator (Figure 4-6 (c)). The polymerization reaction was monitored by ^1H NMR spectroscopy, following the disappearance of the signals of the acrylic protons of both macromonomers. Furthermore, the ^1H NMR spectrum of the final copolymer clearly shows the presence of the characteristic signals of each macromonomer unit (Figure 4-7). In particular, the signals corresponding to the protons of the coumarin groups are present together with those of the OMOx pending chains, which confirms the successful heterografted copolymer synthesis. The percentage of each macromonomer unit was determined according to Equation 2:

$$k = \frac{\frac{I''_{a'+b+a}}{18.71}}{\frac{I''_{7+9}}{2} + \frac{I''_{a'+b+a}}{18.71}} \quad (2)$$

where k is the percentage of OMOx monomers in the copolymer, 18.71 corresponds to the integral-value of MOMOx associated to the protons $\text{H}_{a'+a+b}$, 2 is the integral-value of MCm associated to the protons H_{7+9} and $I''_{a'+a+b}$, and I''_{7+9} are the integrals of the corresponding protons in the copolymer. Two molecular weight ranges were targeted: one around 5000 g mol $^{-1}$ (named low molecular weight (LM)) and the other one around 20000 g mol $^{-1}$ (named high molecular weight (HM)). In both cases, three macromonomer ratios were obtained, namely 20, 50 and 70% of MCm, *i.e.*, of hydrophobic monomer MCm per molecule. Results for the different statistical copolymers are collected in Table 4-2. They are named $\text{Cm}^j\text{-OMOx}^k$ where j and k represent the percentage of MCm and MOMOx monomers per molecule, respectively.

Size exclusion chromatography (SEC) exhibits monomodal traces with quite high dispersities ($2.4 \leq D \leq 2.8$), as expected in free radical polymerization (Figure 4-8).

Table 4-2 : Statistical heterograft amphiphilic copolymers Cm^j-OMOX^k .

Macromonomer	nCH_2^a [-]	DP_{OMOX}^b [-]	M_n^c [g mol ⁻¹]	$\bar{D}^c$ [-]	Heterografted copolymer	M_n^c [g mol ⁻¹]	$\bar{D}^c$ [-]	$Cm:OMOX^d$ [%]	DP_{OMOX}^b [-]	DP_{Cm}^b [-]	M_{OMOX}/M_{Cm}^e [-]
Hydrophobic MCm	11	-	380	1	$Cm^{85}-OMOX^{15}$ (LM)	5100	2.6	85:15	2	11	0.2
					$Cm^{49}-OMOX^{51}$ (LM)	5200	2.4	49:51	7	6	1.0
					$Cm^{30}-OMOX^{70}$ (LM)	4800	2.5	30:70	8	4	2.3
Hydrophilic MOMOX	-	4	430	1.2	$Cm^{85}-OMOX^{15}$ (HM)	22000	2.8	85:15	7	45	0.2
					$Cm^{55}-OMOX^{45}$ (HM)	22400	2.8	55:45	25	31	0.9
					$Cm^{29}-OMOX^{71}$ (HM)	20000	2.6	29:71	36	16	2.5

* Free radical polymerization in DMF at 80 °C in the presence of AIBN. ^a Synthesized from the starting molecule bromo-undecanol. ^b Determined by ¹H NMR. ^c Evaluated by SEC in DMAc using PMMA standards. ^d Composition in MCm and MOMOX monomer. ^e Hydrophilic/hydrophobic balance.

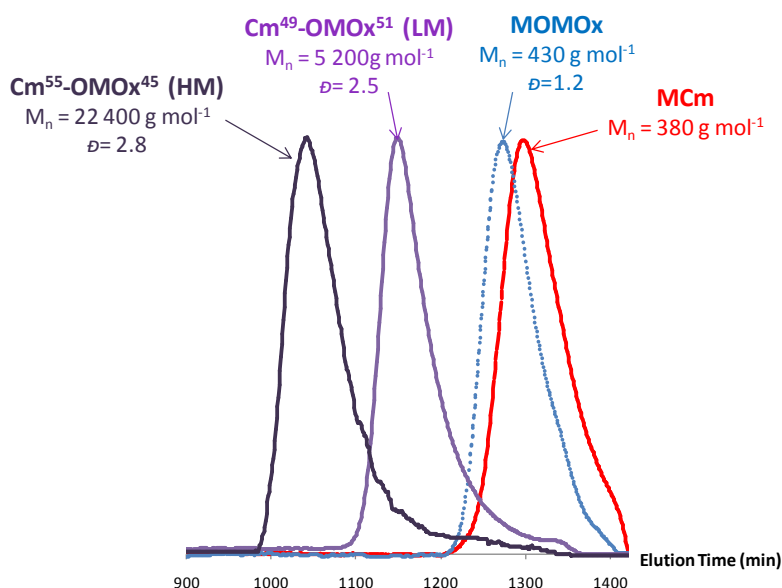


Figure 4-8: SEC traces of macromonomers MCm and MOMOX and copolymers Cm^j-OMOX^k of high and low molecular weight

Self-assembly of the amphiphilic photo-sensitive heterografted copolymers in solution

Six UV-sensitive coumarinated heterografted copolymers have been successfully synthesized by free radical polymerization. The copolymers differ not only by their backbone molecular weight but also by their content of hydrophobic MCm monomers randomly dispersed in the

copolymer structure (*i.e.*, 30, 50 and 85% of MCm monomers per molecule). These heterografted copolymers being amphiphilic, their ability to spontaneously self-assemble in aqueous solution into ordered nanostructures was investigated by DLS.

Direct dissolution of the heterografted copolymers

Apart from the two less hydrophobic copolymers, when directly dissolved in water, heterografted copolymers show the formation of self-assemblies with large characteristic sizes, between 20 to more than 1300 nm. The nanoprecipitation technique was thus preferred. In this method, the first step consists in selecting a solvent which is thermodynamically appropriate for both macromonomers, in order to dissolve the heterografted copolymers as single chains. Accordingly, the solubility tests were carried out dissolving the most hydrophobic copolymers Cm⁸⁵-OMOX¹⁵ (LM) (85% of hydrophobic groups per molecule) in four selected organic solvents (dioxane, acetonitrile, dimethylformamide (DMF), and acetone) at a concentration of 1 mg mL⁻¹. When directly dissolved in a given solvent, DLS measurements show that such copolymer spontaneously self-assemble into particles with characteristic diameters between 4 and 1570 nm as illustrated in Figure 4-9 (a) at a scattering angle of 90°.

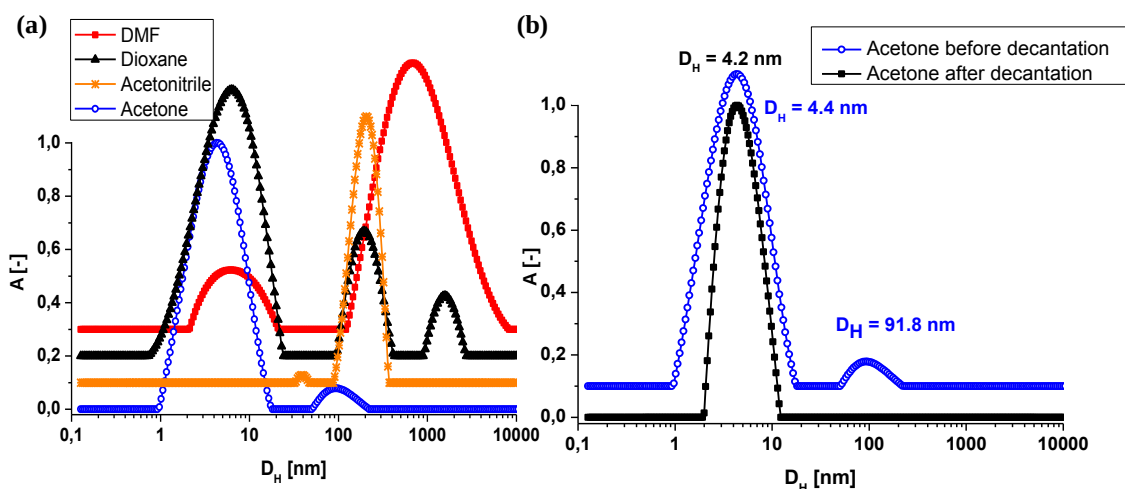


Figure 4-9: DLS: Hydrodynamic diameter (D_H) distribution at a scattering angle of 90° after direct copolymer dissolution at 1 mg mL⁻¹ for Cm⁸⁵-OMOX¹⁵ (LM) (a) as a function of the organic solvents, and (b) in acetone before and after sedimentation for 5 days.

Although the hydrodynamic diameter distributions obtained from self-assembled Cm⁸⁵-OMOX¹⁵ (LM) reveal the presence of two or three populations of objects for all the evaluated

organic solvents, the amount of each self-assembly is strongly dependent on the nature of the considered organic solvent. Figure 4-9 (a) shows that, in DMF and acetonitrile, the peaks corresponding to the biggest aggregates (with D_H -values of 712 and 214 nm, respectively) have the largest relative surface area. On the contrary, when $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) was dissolved in acetone, the first peak (appearing as the fast relaxation mode) has a surface area larger than the second peak (slow relaxation mode). Knowing that DLS is much more sensitive to the presence of bigger aggregates than smaller micellar nanoparticles,⁴⁶ these smallest objects, with $D_H = 4.2$ nm, are actually preponderant in terms of number and weight under these conditions. Besides, only these smallest objects remain visible after 5 days of sedimentation in the cell, as illustrated in Figure 4-9 (b) for acetone. This experimental hydrodynamic diameter of 4.2 nm is consistent with the theoretical diameter of gyration of 3.1 nm, calculated using Equation 3, valid in the case of comb and centipede polymers:^{47, 48}

$$D_G = \sqrt{D_{G_{side}}^2 + D_{G_{main}}^2} \quad (3)$$

with:

$$D_{G_{side}}^2 = \frac{4(f-2)p}{L_t^2} \left\{ L_S^2 \left[\frac{L_S}{6\lambda_S} - \frac{1}{4\lambda_S^2} + \frac{1}{4\lambda_S^3 L_S} - \frac{1}{8\lambda_S^4 L_S^2} (1 - e^{-2\lambda_S L_S}) \right] \right. \\ \left. + L_S(L_t - L_S) \left[\frac{L_S}{2\lambda_S} - \frac{1}{2\lambda_S^2} + \frac{1}{4\lambda_S^3 L_S} (1 - e^{-2\lambda_S L_S}) \right] \right\}$$

and:

$$D_{G_{main}}^2 = \frac{4}{L_t^2} \left\{ \frac{L^3}{6\lambda} - \frac{L^2}{4\lambda^2} + \frac{L}{4\lambda^3} - \frac{1}{8\lambda^4} (1 - e^{-2\lambda L}) \right. \\ \left. + (f-2)L_S \left[\frac{2p+1}{p+1} \frac{pL^2}{6\lambda} - \frac{pL}{2\lambda^2} + \frac{p}{2\lambda^3} - \frac{1}{2\lambda^3} \frac{e^{-2\lambda L_C}}{1 - e^{-2\lambda L_C}} (1 - e^{-2\lambda L_C p}) \right] \right. \\ \left. + (f-2)^2 L_S^2 \left[p(p-1) \left(\frac{L}{6\lambda} - \frac{1}{4\lambda^2} \right) + \frac{1}{2\lambda^2} \frac{e^{-2\lambda L_C}}{1 - e^{-2\lambda L_C}} \left(p - \frac{1 - e^{-2\lambda L_C p}}{1 - e^{-2\lambda L_C}} \right) \right] \right\}$$

where f is the functionality ($f = 3$ for comb polymers), p is the number of junction points ($p = \text{DP}_n$), L_t is the total contour length ($L_t = (f-2)pL_S + (p+1)L_C$), L_S corresponds to the contour length of the side chains, λ_S^{-1} is the Kuhn segment length of the side chains, λ^{-1} is the Kuhn segment length of the main chains, L is the contour length of the main chains ($L = (p+1)L_C$) and L_C is the contour length of the macromonomer main chain.

The similarity between the experimental and theoretical values (4.2 vs 3.1 nm) confirms the dissolution of $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) almost single chains in acetone (actually between one and two chains per structure). For all these considerations, acetone is the best candidate as starting organic solvent for the nanoprecipitation method. Note that, as DLS measurements exhibit similar results if the copolymer suspension in acetone was allowed to settle several days or filtered through a 0.22 μm hydrophilic PTFE syringe filter, the filtration method was preferred for commodity reasons.

Self-assembly of the heterografted copolymers using the nanoprecipitation method

The ability of the photo-active amphiphilic heterografted copolymers to spontaneously self-assemble into ordered nanostructures was investigated by DLS using the nanoprecipitation method. As previously, experiments were firstly performed on $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM). In order to optimize the formation of controlled self-assemblies of the heterografted copolymers in water, two approaches were investigated. On the one hand, the inverse-phase nanoprecipitation process consists in the addition of water into the organic phase (acetone in this case) containing the copolymer. DLS-measurements show the presence of three populations of particles with D_H -values equal to 45, 264 and 1640 nm (data not shown here). On the other hand, in the direct nanoprecipitation process, acetone containing $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) was dropped into water. With the diffusion of organic solvent into aqueous solution, the intransient self-assemblies were formed and the organic solvent was then removed by evaporation. From DLS experiments, performed at various observation angles, the autocorrelation functions ($g^{(2)}-1$), shown at scattering angles of 60, 90 and 120° together with their corresponding relaxation time distributions obtained using CONTIN analysis, exhibit monomodal and slightly polydisperse relaxation time distributions (Figure 4-10 (a)). Proportional relationships between the relaxation frequency ($1/\tau$) and the squared scattering vector modulus (q^2) were obtained and attributed to the Brownian diffusive motion of particles resulting from the heterografted copolymer self-assembly (Figure 4-10 (c)). The value of the slope is equal to the diffusion coefficient (D) of the particles from which the hydrodynamic diameter (D_H) is calculated for each sample using the Stokes-Einstein relation.⁴⁹

DLS measurements performed using the nanoprecipitation method (starting from acetone at a concentration of 1 mg mL⁻¹ and finishing in water after the evaporation step) exhibited a calculated D_H -value of 131 nm.

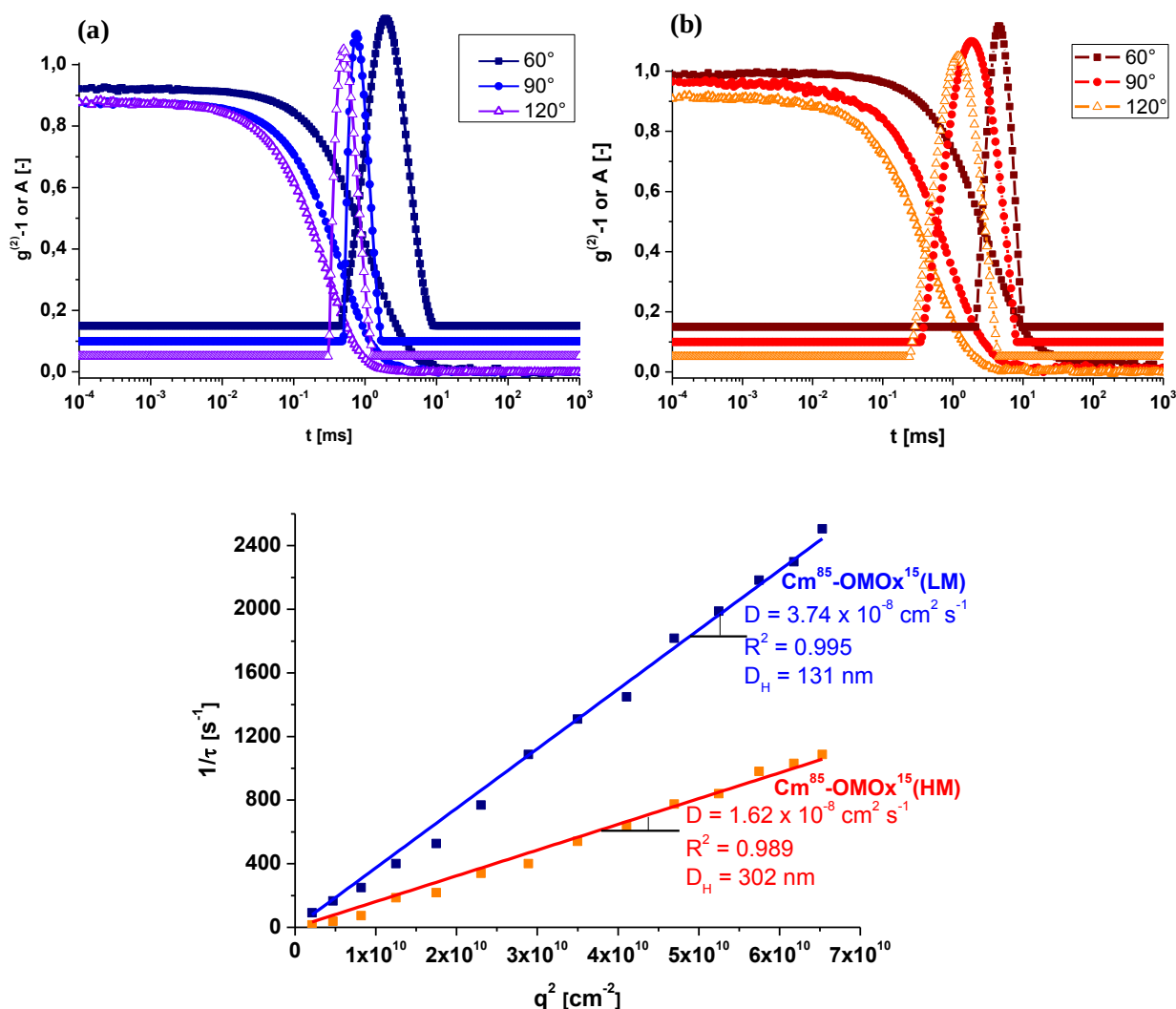


Figure 4-10: DLS: autocorrelation function ($g^{(2)}-1$) as a function of time (t) and relaxation time distribution at scattering angles of 60° , 90° and 120° for (a) $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM), and (b) $\text{Cm}^{85}\text{-OMPOx}^{15}$ (HM), and (c) relaxation frequency ($1/\tau$) as a function of squared scattering vector modulus (q^2) between 20° and 150° by step of 10° after the direct nanoprecipitation method for: $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) and $\text{Cm}^{85}\text{-OMPOx}^{15}$ (HM).

As the direct nanoprecipitation process enabled the formation of monomodal self-assemblies, this method was preferred and applied to the particle preparation of all the photo-sensitive amphiphilic heterografted copolymers. Copolymers $\text{Cm}^j\text{-OMOX}^k$ were then studied by DLS at various scattering angles. Whatever the scattering angle, the relaxation time distributions obtained from the autocorrelation functions exhibit a monomodal, bimodal or trimodal behavior depending on copolymer molecular weight and hydrophobicity (*i.e.*, percentage of MCm monomers per molecule). Results are presented in Figure 4-10 (b) and 4-11 (a), (b) and (c) for the copolymers with high molecular weight. The D_H -values at a scattering angle of 90° of all the heterografted copolymer self-assemblies are collected in Figure 4-11 (d).

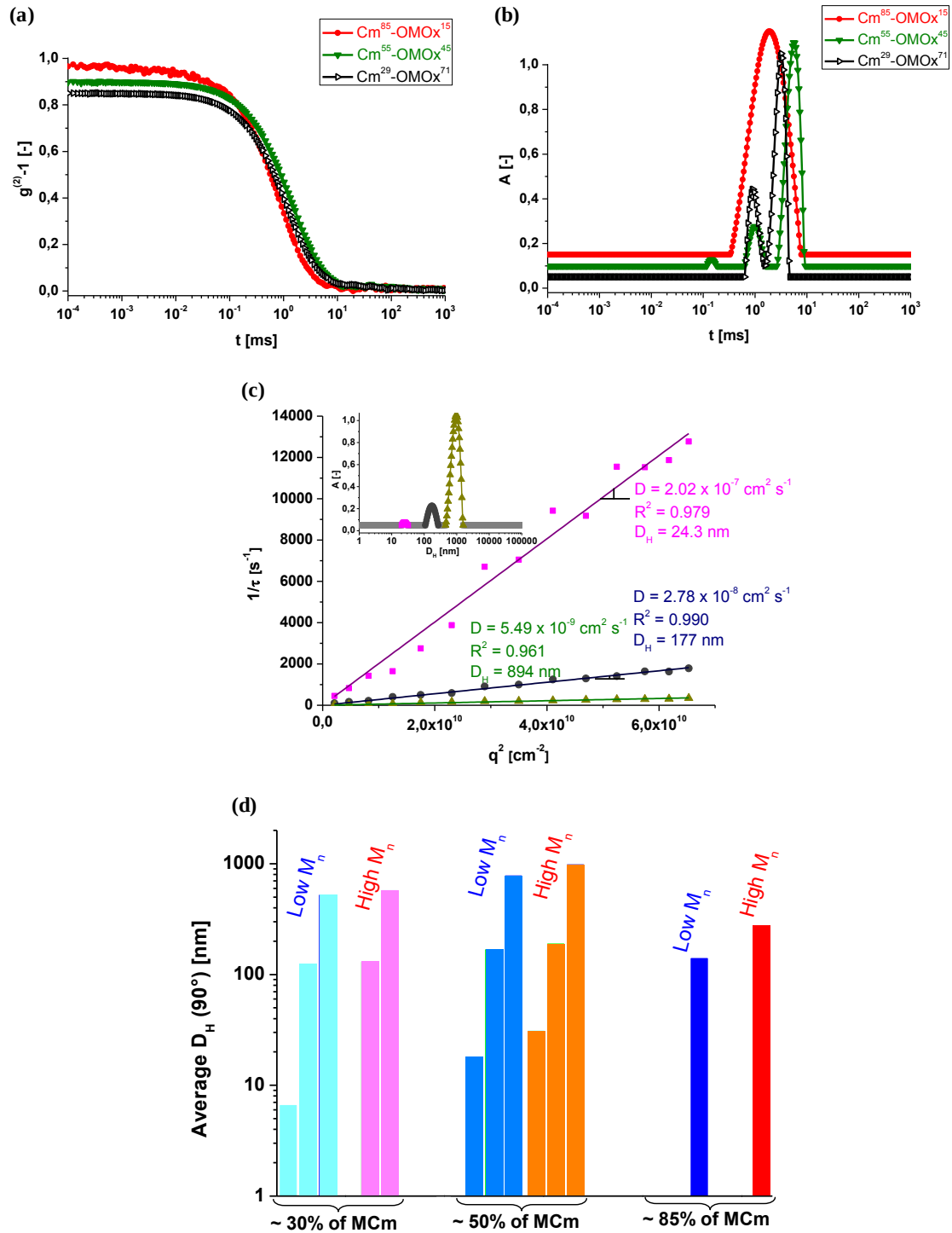


Figure 4-11: DLS: (a) autocorrelation function ($g^{(2)}-1$) as a function of time (t), (b) relaxation time distribution at a scattering angle of 90° for copolymers $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$, $\text{Cm}^{55}\text{-OMOX}^{45}$ and $\text{Cm}^{29}\text{-OMOX}^{71}$ with higher molecular weight, (c) relaxation frequency ($1/\tau$) as a function of squared scattering vector modulus (q^2) between 20 and 150° by step of 10° after the direct nanoprecipitation method for $\text{Cm}^{55}\text{-OMOX}^{45}$ (HM) and inset hydrodynamic diameter (D_H) distribution at a scattering angle of 90° for copolymer $\text{Cm}^{55}\text{-OMOX}^{45}$ (HM), (d) D_H determined by DLS as a function of the molecular weight (M_n) and percentage of MCm monomers.

According to the copolymer molecular weight, it clearly appears that three populations of nanoparticles coexist in water for the copolymers with low molecular weight and 30 and 49% of MCm monomers ($\text{Cm}^{30}\text{-OMOX}^{70}$ and $\text{Cm}^{49}\text{-OMOX}^{51}$ (LM)) whereas only one population is detected for the copolymer $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) with 85% of MCm monomers. The same behaviour was observed for copolymers with high molecular weight except for $\text{Cm}^{29}\text{-OMOX}^{71}$ (HM) where only two nanoparticle populations are visible in this case. It is worth noting that the D_H -value related to the smallest population observed for $\text{Cm}^{30}\text{-OMOX}^{70}$ (LM) were about 6.6 nm, revealing the presence of a few gathered unimers. The disappearance of these smallest nanoparticules for $\text{Cm}^{29}\text{-OMOX}^{71}$ (HM) was due to the increase of the molecular weight, which favors the organization of copolymers into bigger self-assemblies. With regards to copolymers with *ca.* 50% of MCm monomers, the first population (fast relaxation mode), with D_H -values of 18 nm for $\text{Cm}^{49}\text{-OMOX}^{51}$ (LM) and 31 nm for $\text{Cm}^{55}\text{-OMOX}^{45}$ (HM) can be attributed to micellar nanoparticles. Therefore, more hydrophilic copolymers enabled the stabilization of smaller self-assemblies in water. Furthermore, DLS measurements show monomodal and slightly polydisperse self-assemblies with hydrodynamic diameters equal to 131 and 302 nm when $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) and $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM) were dissolved in water *via* the nanoprecipitation method. Such a size distribution may be explained by the fact that these more hydrophobic copolymers necessitate a higher aggregation number to assure an efficient stabilization by the hydrophilic chains.^{43, 50}

After all, the question then arises about the object sizes controlled by the polymer molecular weight or by the percentage of coumarin monomers. After calculation, when doubling the polymer molecular weight, the size of all populations increases in average by 20% whereas when doubling the percentage of MCm monomers, the size increases in average by 48%. This shows undoubtedly that the size of the self-assemblies is mainly controlled by the percentage of MCm monomers.

Form factor

With low copolymer concentration (estimated to be around 0.2 mg mL^{-1}), quite high D_H -values (131 and 302 nm, respectively) and especially monomodal and slightly polydisperse relaxation time distributions, copolymers $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) and $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM) are good candidates for form factor determination *via* static light scattering (SLS) experiments. Indeed, under these conditions, the scattering intensity is proportional to the non-trivial form factor of one type of self-assemblies. For both systems, the results show in the reciprocal space a q^{-2} -dependence together with the beginning of the plateau at low q -values (Figure 4-12 (a)).

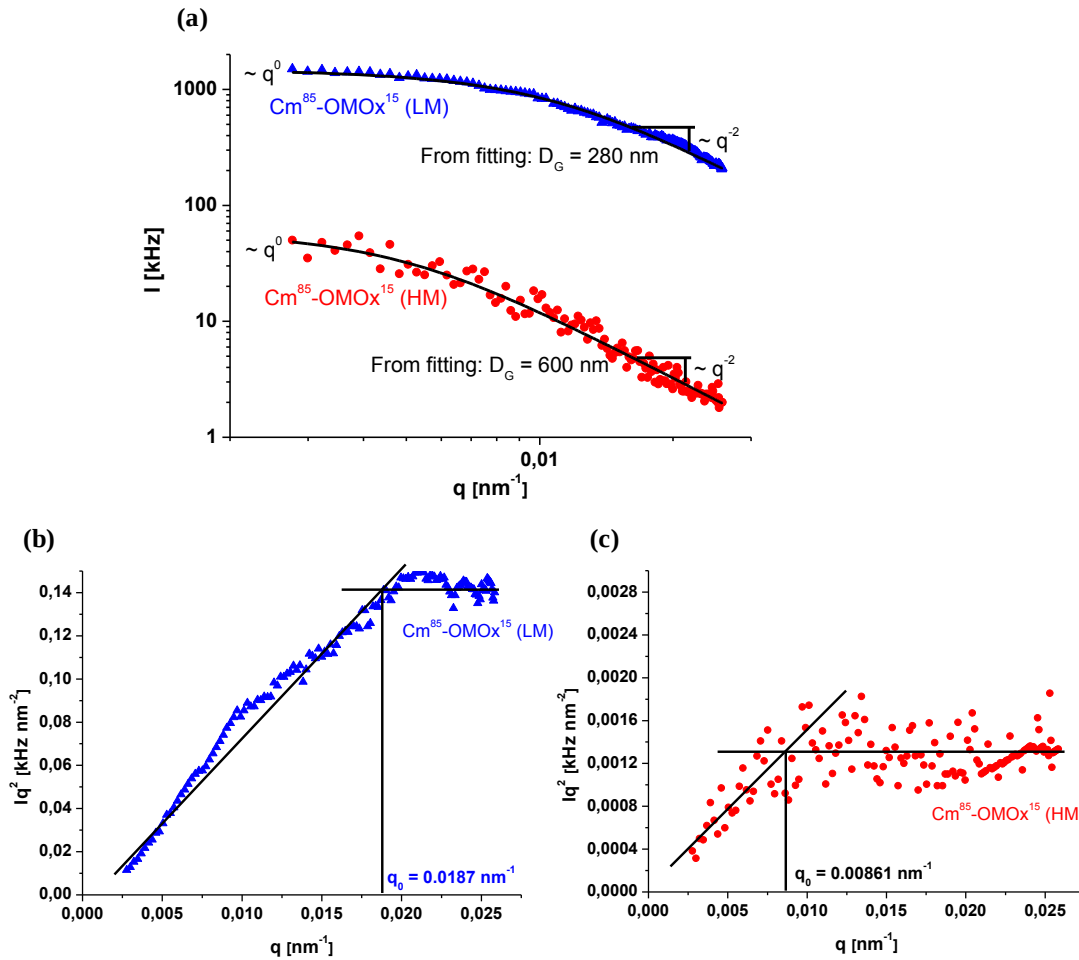


Figure 4-12: SLS: (a) scattering intensity (I) as a function of scattering vector modulus (q) between 20 and 150 by a step of 1 after the nanoprecipitation method for $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) and $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM), and corresponding Kratky-like plot for (b) $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) and (c) $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM)

The breaking between these two regimes is emphasized by the Kratky-like plots⁵¹ pictured with a well-chosen exponent of two along the y-axis (Figure 4-12 (b) and (c)). In addition, as

illustrated in Figure 4-12 (a), this q^{-2} -behaviour can be modeled by the Gaussian form factor using Equation 4:

$$P(q) \propto \frac{\exp\left(-q^2 \frac{D_G^2}{4}\right) + q^2 \frac{D_G^2}{4} - 1}{q^4 D_G^4} \quad (4)$$

where q is the scattering vector modulus and D_G corresponds to the diameter of gyration.⁵² A diameter of gyration $D_G = 280$ nm was obtained after fitting for $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) whereas a D_G -value equal to 600 nm was obtained for $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM). These values are coherent with those estimated by the Kratky-like plot (Figure 4-12 (b) and(c)) considering the $2\pi/q_0$ -ratio (where q_0 is the particular q -value corresponding to the intercept of the two regimes clearly appearing on the Kratky-like plot). It is noteworthy that the D_G -ratio obtained from the fit ($600/280 = 2.14$) is very close to the q_0 -ratio obtained from the Kratky-like plot ($0.0187/0.00861 = 2.17$). A more precise idea on the morphology of the objects present in the system was given by the characteristic ratio $\rho = D_G/D_H = 280/131 \approx 2.1$ for $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) and $\rho = D_G/D_H = 600/302 \approx 2.0$ for $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM). These tabulated values correspond to “random coil, linear chains, slightly polydisperse”.⁵³ All these data confirm that, for both systems, the copolymers self-assemble in a random manner and the nano-objects are not compact but swollen by water.

TEM

TEM images obtained from the copolymer solutions prepared by direct nanoprecipitation method show well-defined spherical nanoparticles (Figure 4-13). Statistical treatment of the images carried out on more than 300 objects gives the main diameter $D_{\text{TEM}} = 24$ nm for copolymer $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) and $D_{\text{TEM}} = 33$ nm for copolymer $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM). Therefore, for a similar percentage of MCm monomers, the main TEM-diameter increases with the molecular weight of the copolymers. Furthermore, it is noteworthy that the diameters obtained from TEM images analyses were considerably lower than those estimated by DLS measurements in water. This value was *ca.* 5 times less than the D_H -value found by DLS in aqueous media for the copolymers with the lowest molecular weight and *ca.* 9 times less than that obtained by DLS for the copolymers with the highest molecular weight. This diminishing of the nanoparticle diameters upon drying suggests a highly swollen character of the nanoparticles in water, which is in good agreement with the q^{-2} -behaviour observed by SLS.

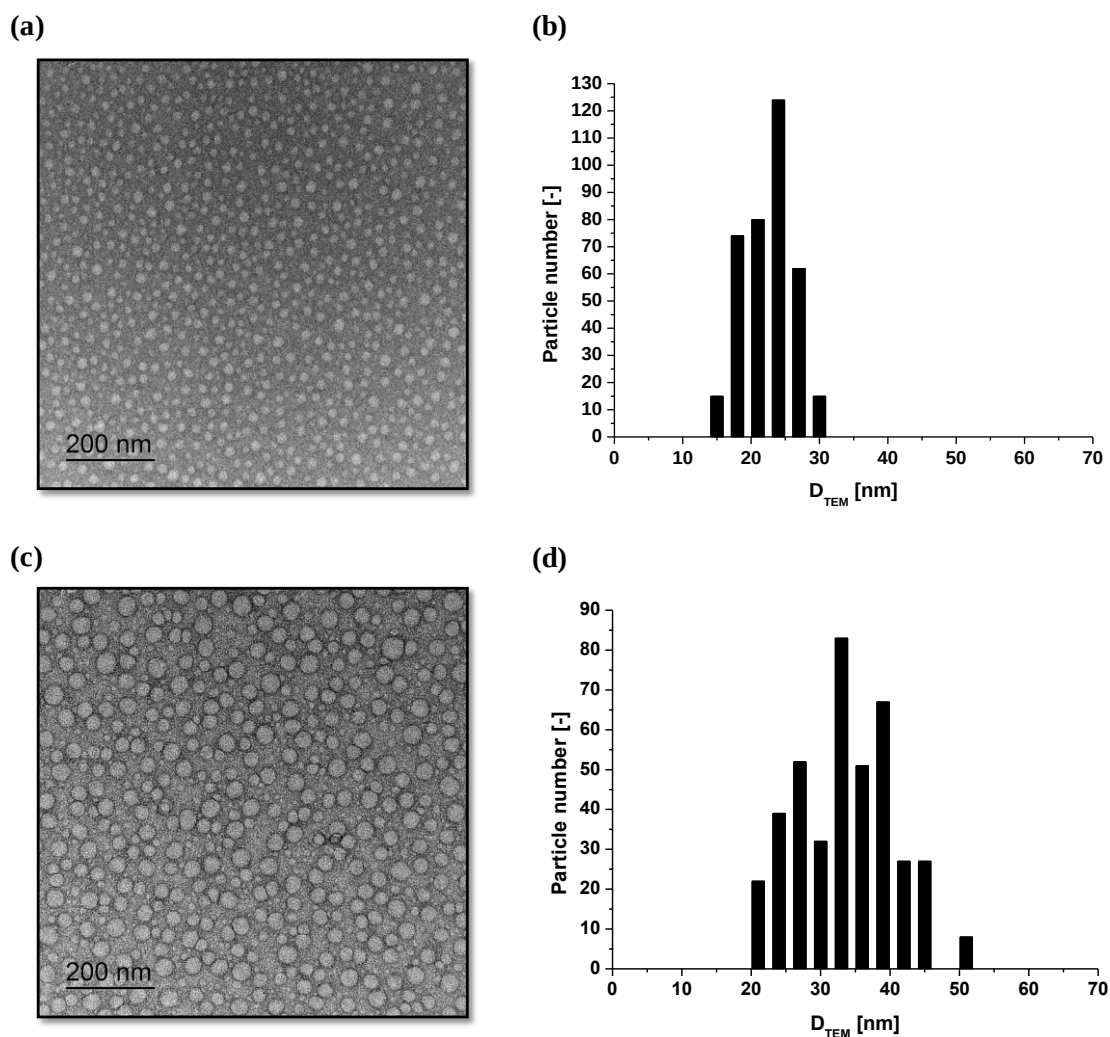


Figure 4-13: TEM: image and corresponding diameter (D_{TEM}) distribution over 300 self-assemblies for (a) and (b) Cm^{85} -OMOX¹⁵ (LM), and (c) and (d) Cm^{85} -OMOX¹⁵ (HM) after the nanoprecipitation method dropped onto a glow-discharged, carbon-coated copper grid in the presence of uranyl acetate for contrast enhancement.

Photo-crosslinking of the self-assembled amphiphilic heterografted copolymers

Coumarin moieties are known to be able to undergo a reversible [2 + 2] photocycloaddition upon UV irradiation, leading to the formation of a cyclobutane ring.^{27, 39, 40, 54-59} Therefore, photo-cross-linking of the amphiphilic heterografted copolymers bearing a coumarin moiety at the end of each hydrophobic pending chain was triggered by irradiating the self-assemblies at a wavelength of 350 nm. Among the photo-sensitive amphiphilic heterografted copolymers available, two of them (*i.e.*, Cm^{85} -OMOX¹⁵ (LM) and Cm^{85} -OMOX¹⁵ (HM)) have shown to be able to self-assemble in water into monomodal and slightly polydisperse distributions. The

evolution of the so-formed nanoparticles under UV-irradiation at $\lambda = 350$ nm was then monitored by DLS at a scattering angle of 90° , and, in a parallel way, the $[2\pi+2\pi]$ photo-reaction was verified by UV spectroscopy, following the decrease of intensity of the coumarin moiety UV-absorbance band at $\lambda = 320$ nm. After one hour of irradiation, the maximum photo-cross-linking was achieved ($\approx 80\%$) (Figure 4-14 (c)). The two self-assembled heterografted copolymers exhibit a distinct behavior under UV-exposure (Figure 4-14 (a,b)).

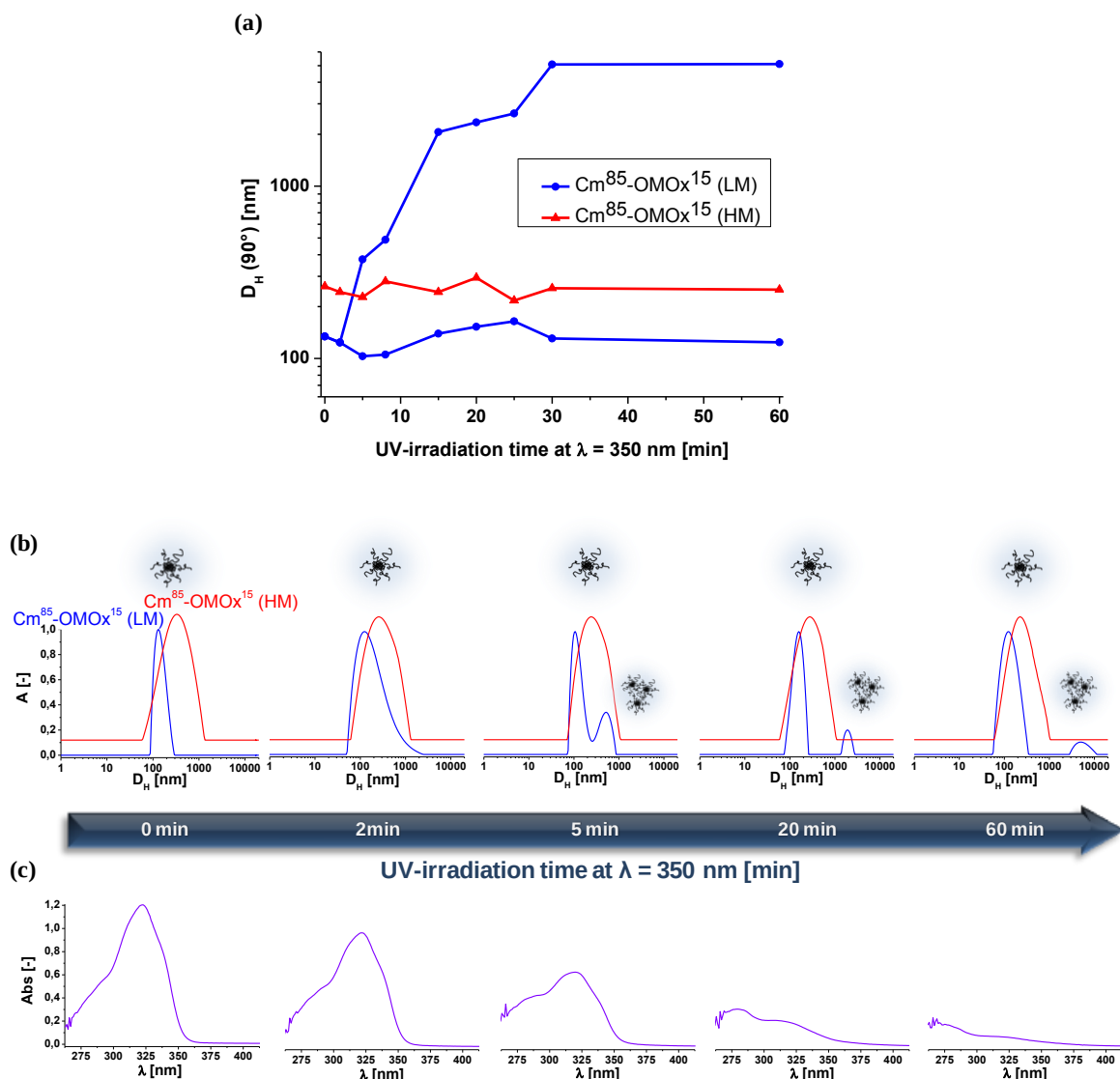


Figure 4-14: DLS: (a) hydrodynamic diameters (D_H) at a scattering angle of 90° , (b) hydrodynamic distribution at a scattering angle of 90° , (c) evolution of the UV-absorbance band of coumarin as a function of UV-irradiation time at $\lambda = 350$ nm after the nanoprecipitation method.

Whatever the irradiation time, a monomodal hydrodynamic diameter distribution was observed for $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM) (Figure 4-14 (a and b)). In addition, apart from the presence of some oscillations, the corresponding D_H -value remains quasi unchanged with time (from $D_H = 262$ nm at $t = 0$ to $D_H = 256$ nm at $t = 30$ min and $D_H = 251$ nm at $t = 60$ min) with a slight decrease of 4% after one hour of irradiation. With a relatively pronounced hydrophobic character (85% of MCm monomers per molecule), this heterografted copolymer has low chain mobility within the self-assemblies in aqueous solution. Besides, the longer backbone ($M_n = 22000$ g mol⁻¹) may enable a better tangle of the grafts leading to coumarin end-groups more confined in the inner part of the nanoparticles, which limits the possible re-organizations. Moreover, the dimerization of the so-located coumarin moieties may urge this shrinking tendency.

In contrast, a second population of nanoparticles appeared after 5 min under UV-exposure for the copolymer $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM). If the size of the smallest nanoparticles remains close to that of the system in its initial state ($D_H = 134$ nm at $t = 0$ and $D_H = 124$ nm at $t = 60$ min, *i.e.*, a decrease in size of *ca.* 7.5%), a drastic increase of the characteristic size of the biggest objects (from $D_H = 134$ to more than 2500 nm) was observed during the first 30 min of irradiation. Although the size reached after 60 min was similar to the one after 30 min, we assume that this result corresponds to a kinetic equilibrium as we cannot assert that the thermodynamic equilibrium was achieved and that the system would not change anymore. A lower compactness enabling, to a certain extent, some mobility or re-organization of the copolymers within the suspended nanoparticles in water may be possible owing to the presence of shorter backbone ($M_n = 5100$ g mol⁻¹). With less tangled chains, the possibility of having coumarin moieties located in the outer part of the self-assemblies may increase. As a consequence, covalent binding *via* dimerization of coumarin groups belonging to different primary self-assemblies may be promoted, implying an inter-particle cross-linking. Weak interactions (π -interactions) between the self-assemblies may also occur. However, it has to be noticed that these inter-particle interactions or cross-linking remain scarce. Indeed, as already mentioned (*vide supra*), DLS is much more sensitive to the presence of bigger aggregates than smaller nanoparticles and the surface area of the second peak (slow mode of relaxation) is lower than that of the first peak (fast relaxation mode).⁴⁶

Conclusion

Despite the difficulty brought by the steric hindrance of the macromonomers, statistical polymethacrylate-based heterografted copolymers composed of oligomeric 2-methyl-2-oxazoline hydrophilic side chains, and having a photo-responsive coumarin unit at the end of each hydrophobic long pending chain have been successfully synthesized by free radical polymerization. They are characterized by different molecular weights and percentage of hydrophobic chains (*ca.* 30, 50 and 85%). The ability of such copolymers to spontaneously self-assemble in solution into ordered nanostructures was investigated by DLS using the direct nanoprecipitation method from acetone to water. DLS-measurements enabled to evidence that the size of the self-assemblies was controlled by the percentage of coumarinated hydrophobic monomers. In particular, monomodal and slightly polydisperse self-assemblies with D_H -values of 131 and 302 nm were observed by DLS for the most hydrophobic copolymers (*i.e.*, $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) and $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM)), respectively. Morphological information was complementarily obtained using SLS, exhibiting a Gaussian q^{-2} -dependence of the scattering intensity. TEM images show the spherical shape of the nanoparticles and confirm the swollen behavior regarding to the lower D_h related to that of sustained by SLS. Lastly, the self-assemblies originating from copolymer $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM), having a high hydrophobic character and a high molecular weight, were relatively stable under UV-illumination. Indeed, a monomodal distribution of nanoparticles, with similar D_H -values, was observed before and after cross-linking of the pending coumarin units.

Aknowledgements

The authors thank the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” and the “Centre National de la Recherche Scientifique” for financial support. They are thankful to Erwan Olivieiro at the “Plateforme d’Analyse et de Caractérisation – PAC Balard” at the University of Montpellier for TEM imaging.

5. Polyoxazoline-coumarine : structuration à longue distance

5.1. Prélude sur les interactions polyoxazoline-coumarine

Outre leurs capacités photo-stimulantes, les chromophores coumarine peuvent donner lieu à de nombreuses interactions et de ce fait jouer un rôle moteur dans la nanostructuration de copolymères en solution. En effet, il a été montré que ***l'association des coumarines à des peptides conduisait à des assemblages spécifiques et à des structurations à longue distance donnant lieu à la croissance de nanofibres***^{60, 61} ou encore des ***nanostructures hélicoïdales***.^{62, 63} Ceci est rendu possible par des interactions (liaisons hydrogène, π -stacking,...) entre les coumarines et les fonctions amide contenues au sein des polypeptides et conduit à des phénomènes de cristallisation.⁶⁴ Or, comme vu en chapitre 1 (partie 5.5.), les polyoxazolines, de par leur analogie peptidique s'avèrent être de remarquables agents de structuration grâce aux nombreuses possibilités d'interactions, notamment des liaisons hydrogène et des interactions dipôle-dipôle.^{65, 66} De plus, les copolymères hétérogreffés étant connus pour engendrer des architectures complexes et sophistiquées,⁶⁷⁻⁷⁰ la combinaison de ces trois facteurs semble idéale pour une nanostructuration à longue distance.

5.2. Publication: Single stranded superhelices driven by crystallization between polyoxazoline and coumarin units

Les copolymères amphiphiles hétérogreffés précédemment décrits s'organisent dans l'eau sous forme de nano-objets sphériques de tailles variées. Cependant, dans la littérature, il a déjà été montré que dans de petites fenêtres de composition, des morphologies plus complexes avec des organisations à grande échelle sont possibles. Le rapport hydrophile/hydrophobe le plus courant étant de 50/50 nous avons choisi d'étudier plus en détail par microscopie MET haute résolution le copolymère Cm⁵⁵-OMOX⁴⁵ (HM), appelé dans la publication suivante Cm-s-OMOX, afin de regarder de plus près ce que nous avons considéré comme agrégats dans la publication précédente (Figure 4-11) Son homologue dibloc de même masse molaire et de même composition, Cm-b-OMOX, synthétisé par RAFT, a également été étudié afin d'examiner les interactions polyoxazoline-coumarine et leur rôle lors dans la nanostructuration des copolymères. Cette étude est la première mettant en évidence la formation d'hélices mono-brins à partir de copolymères hétérogreffés amphiphiles achiraux. En effet, les seules études se rapprochant de ce travail reportent des doubles hélices ou bien des mono-hélices obtenues à partir de copolymères amphiphiles diblocs ou chiraux.

Single Stranded Superhelices Driven by Crystallization Between Polyoxazoline and Coumarin Units

Korchia, L.; Bouilhac, C.; Oliviero, E.; Robin, J. J.; Lapinte, V.*

Abstract

To prepare high ordered morphology of nanoparticles, amphiphilic heterografted copolymers based on a polymethacrylate backbone bearing oligo-oxazoline and coumarin pending chains were synthesized. Their self-assembly in water gradually evolved from spherical nanoparticle to worm and finally steady single stranded helicoidal nanofibers. The crystallization promoted by oligo(oxazoline)-coumarin interactions is the driving force of this highly hierarchical self-assembly as demonstrated by WAXS and DSC. HR-TEM microscopy provided insight into the size and the evolution of the nanoparticle morphology. To our knowledge, this is the first example of helicoidal nanofiber based on polyoxazoline and the first single stranded superhelix based on amphiphilic achiral random heterografted copolymers.

Introduction

The amphiphilic copolymers were deeply studied for their ability to self-assemble in solution into various supramolecular morphologies including spherical and cylindrical micelles, vesicles and finally more sophisticated morphologies.^{67-69, 71} Moreover, many architectures of amphiphilic copolymers have been developed going from linear shapes (di-, tri- or multiblocks) to ramified structures (stars, branched copolymers or dendrimers) and especially the grafted copolymers. They constitute an interesting type of macromolecular architecture for the elaboration of highly hierarchical self-assemblies such as nanofibers.^{33, 36} An ambitious challenge is the manufacturing of helicoidal nanofibers as firstly described with proteins⁷⁰ then with some synthetic amphiphilic polymers.^{72, 73} The potential applications extend from biomedical area^{74, 75} to molecular recognition or (macro)molecular scaffolds.⁷⁶ The superhelices are usually elaborated from chiral polymers like polypeptides⁶² even if some examples of achiral polymers are also reported. In the latter case, helical polymers such as the polymethacrylates bearing bulky side groups are described for their ability to self-organize in

stable helical conformation.⁶³ Herein we focus on the single stranded superhelices prepared from amphiphilic copolymers. Only few examples in the literature have been reported on block and grafted copolymers self-organized into this morphology of nano-objects. These amphiphilic heterografted copolymers based on PEO as hydrophilic block and achiral hydrophobic block such as polyallene or polyphenyllene are gathered in Table 4-3.^{33, 67, 77, 78}

Table 4-3: Characteristics of single stranded super helices self-assembled from amphiphilic copolymers.

Copolymer structure	Hydrophilic block	Hydrophobic block	Chiral polymer	P ^(a) (nm)	d ^(b) (nm)	D ^(c) (nm)	ref
block	peptide	PS	yes	110	55	180	79
	PEO	PPMC ^(e)	yes	48	ng ^(d)	123	80
	PEO	PBLG ^(f)	yes	80	ng	140	62
	PAA	PMA- <i>b</i> -PS	no	45-58	20	50	81
graft	PEO	Polyallene	no	250	ng	150	77
	PEO	polyphenyllene	no	280-136	15	44	78

^(a) Screw pitch of the helix; ^(b) diameter of the helix stranded; ^(c) diameter of the helix; ^(d) not given; ^(e) poly(*N*-1-phenethyl-*N'*-methylcarbodiimide); ^(f) poly(γ -benzyl-L-glutamate).

In this study, we investigated an alternative to PEO with polyoxazoline (POx).⁸² Based on their hemocompatibility, biocompatibility, high stability in temperature, the POx appear as potential candidates for biomedical applications.⁸³ Another interesting aspect of POx for highly hierarchical self-assemblies comes from the hydrogen bond acceptor character of the amide repetitive units as craftily used by Schlaad to elaborate untwisted nanofibers using polyoxazoline bearing sugar in the pending chains.^{60, 61} Schubert also investigated polyoxazoline based triblock copolymers able to self-assemble into vesicular and original spiral-like micellar aggregates.⁶⁵ More recently, Lecommandoux described untwisted nanofibers using the crystallization of poly(2-isopropyl-2-oxazoline).⁶⁶ In the present work, we investigated the most representative POx, poly(2-methyl-2-oxazoline) (PMOx) with an amorphous character, without LCST temperature unlike the other members of this polymer family. POx was not functionalized to produce specific interactions but was associated to

appropriate candidates to elaborate highly hierarchical self-assemblies as demonstrated by Jin in the case of POx stars starting from a benzenic core.⁶⁴

Otherwise, coumarin derivatives are well-known as crystallization additives,⁸⁴ associated to peptides to produce untwisted nanofibers⁸⁵ or helical secondary structures.⁸⁶ An interesting work described the synergy between the coumarin derivatives and amide groups of dipeptides to produce gelating materials⁸⁷ but they have never been coupled to synthetic polyamide structure.

We previously investigated amphiphilic polyoxazolines based on various hydrophobic blocks including alkyl chains, fatty chains,⁸⁸⁻⁹¹ alkyl chains decorated by coumarin units to give diblock⁴³ or triblock copolymers. Recently, we investigated the self-assembly in water of amphiphilic heterografted copolymers named (Cm-s-OMOX) with a polymethacrylate backbone bearing both coumarin units and oligo-polyoxazoline chains in various ratio ranging from 80/20 to 30/70 (Figure 4-15). In the present study, we focus on the Cm-s-OMOX having a 50/50 hydrophilic hydrophobic ratio due to its ability to self-organize into well-defined single stranded superhelices.

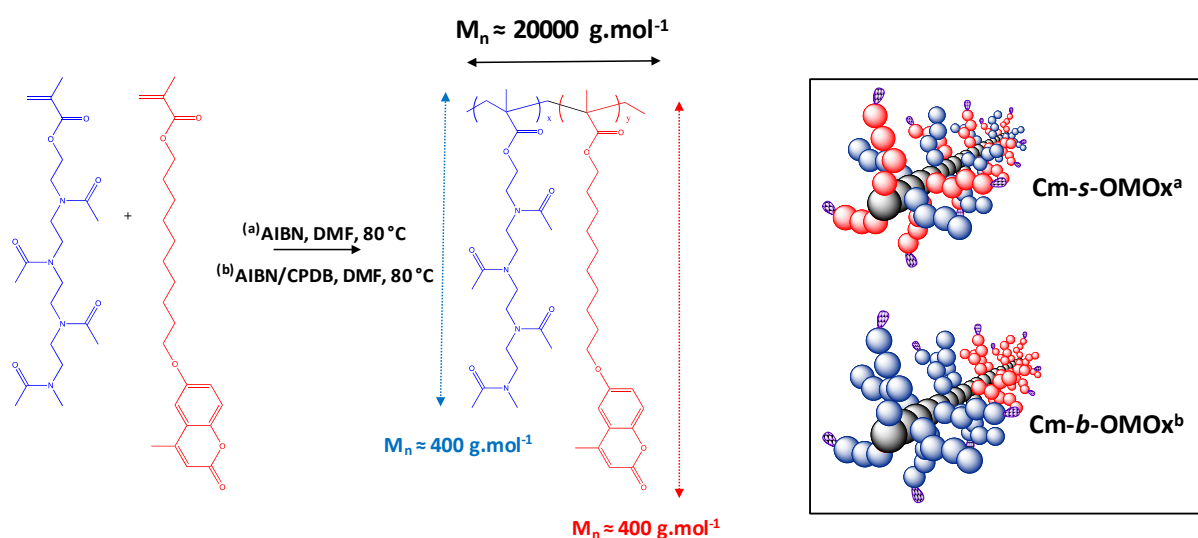


Figure 4-15: Synthesis of amphiphilic diblock (Cm-b-OMOX) and random (Cm-s-OMOX) heterografted copolymers bearing coumarin and polyoxazoline units.

Experimental part

Materials

DMF, diethyl ether and 2-(2-cyanopropyl) dithiobenzoate (CPDB) were commercial products (Sigma Aldrich) and used without further purification. 2,2'-Azobisisobutyronitrile (AIBN) was purified twice by recrystallization in methanol and dried under vacuum. The synthesis of MOMOx, MCm and Cm-s-OMOx were previously reported.

Homopolymer of methacrylate of oligo-oxazoline: HOMOx

HOMOx was synthesized by free radical polymerization from macromonomer MOMOx₄. The monomer concentration was fixed at 0.18 mol.L⁻¹. MOMOx₄ (1.0 g, 2.33 mmol) and AIBN (0.016 g, 0.1 mmol) were dissolved in 15 mL of dry DMF in a dry round-bottom flask. Subsequent to the removal of the oxygen from the solution, the mixture was degassed by three freeze-pump-thaw cycles and then heated at 80 °C under nitrogen flux in a thermostated oil bath for 4 h. At the end of the polymerization, the mixture was purified by dialysis in water using a MWCO 1.5 kDa cut-off. After concentration under reduced pressure and drying under vacuum overnight, the polymer was isolated in 70% yield.

Homopolymer of methacrylate of C11 coumarin: HCm

The monomer concentration was fixed at 0.18 mol.L⁻¹. MCm (1.0 g, 2.4 mmol) and AIBN (0.016 g, 0.1 mmol) were dissolved in 15 mL of dry DMF in a dry round-bottom flask. Subsequent to the removal of the oxygen from the solution, the mixture was degassed by three freeze-pump-thaw cycles and then heated at 80 °C under nitrogen flux in a thermostated oil bath for 4 h. At the end of the polymerization, the mixture was eliminated by dialysis in acetonitrile using a MWCO 1.5 kDa cut-off. After concentration under reduced pressure and drying under vacuum overnight, the polymer was isolated in 80% yield.

Heterografted block-copolymer: Cm-b-OMOx

The hydrophilic macromonomer MOMOx₄ was polymerized as follows using a [AIBN]/[CPDB] ratio of 2.5. In a dry round-bottom flask, MOMOx₄ (1.0 g, 2.3 mmol), CPDB (11 mg, 0.05 mmol) and AIBN (3.0 mg, 0.02 mmol) were dissolved in dry DMF (15 mL). The solution was degassed by three freeze-pump-thaw cycles and then heated at 80 °C under nitrogen flux in a thermostated oil bath for 4 h. After cooling, HOMOx₄^{9100g/mol} was precipitated into an excess of cold diethylether and dried under vacuum overnight. The second

block was then polymerized by RAFT. In this second step, the $\text{HOMOx}_4^{9100\text{g/mol}}$ was used as a macro-chain transfer agent (macro-CTA). The hydrophobic macromonomer MCm (1.0 g, 2.4 mmol), macro-CTA (0.5 g, 0.05 mmol) and AIBN (3.0 mg, 0.02 mmol, $[\text{AIBN}]/[\text{macro-CTA}]=2.5$) were dissolved in dry DMF (15 mL), the mixture was degassed by three freeze-pump-thaw cycles and then heated at 80 °C under nitrogen flux in a thermostated oil bath for 4 h. The residual hydrophobic macromonomer was removed by dialysis in acetonitrile with a MWCO 1.5 kDa cut-off.

Measurements

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a NMR BrukerAvance I 300 MHz or on a BrukerAvance III 600 MHz spectrometers. The chemical shifts were in part per million (ppm), where (s) means a singlet, (d) a doublet, (t) a triplet and (m) a multiplet. Chemical shifts (^1H NMR) were referenced to the peak of residual CHCl_3 at 7.26 ppm. Size exclusion chromatography (SEC) with N,N-dimethylacetamide (DMAc) (with 0.1 w.% LiCl) as eluent at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} , calibrated with poly(methylmethacrylate) (PMMA) standards, was performed on a PL-GPC 50 Plus equipped with a Varian model 410 autosampler. The SEC apparatus comprised a refractive index detector and was fitted with a 8 μm PolarGel-M pre-column ($7.5 \times 50\text{ mm}$) and two 8 μm PolarGel-M columns ($7.5 \times 300\text{ mm}$) thermostated at 50 °C. Sample preparation for high resolution transmission electronic microscopy (HR-TEM) analysis was done as follows: 10 μL of aqueous copolymer solutions concentrated at 0.04 mg.mL^{-1} were dropped onto glow discharged carbon-coated copper grids (Agar scientific, Cu-300) and the excess liquid was blotted thanks to filter paper. Then, 10 μL of a 4 w/v % aqueous uranyl acetate negative stain solution was added. After 30 seconds, the excess of liquid was again blotted. TEM imaging was performed at the technical platform of the Institute Charles Gerhardt of Montpellier (ICGM) using a JEOL, JEM – 2200FS microscope operating at 200kV. Scanning electronic microscopy (SEM) was performed with an high resolution (1 nm at 15kV) apparatus Hitachi S4800 on TEM grids in transmission mode. Calorimetric analyses were carried out at 10 °C/min under nitrogen atmosphere using a Star1 differential scanning calorimeter (DSC) from Mettler Toledo. X-ray diffraction (WAXS) analyses were performed at ICGM-AIME on a X-pert powder diffractometer with a 10 mm mask, a divergent fente of $1/4^\circ$ on silicium surface to avoid noise signal.

Results and discussion

Synthesis of amphiphilic heterografted copolymers

In this present work, achiral amphiphilic heterografted copolymers were investigated by copolymerization of two macromonomers: a solvophilic methacrylate bearing a hydrophilic oligo-oxazoline chain (MOMOx) and a solvophobic methacrylate bearing long alkyl chain terminated by a photo-sensitive coumarin unit (MCm) (Figure 4-16). The synthesis of the macromonomers was previously described in this chapter. They exhibit similar lengths of chains with a molecular weight of 430 g/mol and oligo(2-methyl-2-oxazoline) units ($DP_n=4$) for MOMOx and 380 g/mol for MCm. Firstly, they were copolymerized according to a free radical polymerization process in presence of AIBN in DMF giving amphiphilic random copolymers Cm-s-OMOx (see supporting information for NMR characterization, Figure SI4-1). Two molecular weights were targeted: 5 and 20 kg/mol with hydrophilic/hydrophobic ratio ranged from 20/80 to 70/30. All copolymers self-assembled into spherical nanoparticles whatever the experimental conditions are (Figure SI4-2) except for 50/50 ratio (corresponding to a number of units of 31/25 in Cm/OMOx, respectively. This part of the work is devoted to the study of the self-assembly of this last peculiar copolymer exhibiting original structuration.

For a further comparison, the homologous amphiphilic diblock copolymer (50/50, 20 kg/mol, $\bar{D}=1.5$) (Cm-*b*-OMOx) was prepared according to a RAFT process using AIBN and CPBD as chain transfer agent in DMF (Figure SI4-3).

Self-Assembly of Helicoidal nanofibers

The procedure of the nanoparticle preparation plays an important role in their morphology, especially the choice of the solvent of both hydrophilic and hydrophobic parts and the selective solvent of one of them for conducting to self-assembly. All the copolymers were first dissolved in acetone, a good solvent of both parts of the macromolecule, at a concentration of 4 mg/mL to keep the unimers in solution before the self-assembling. DLS analysis confirmed the presence of unimers around 2 nm (data not given here). Next, 1 mL of the freshly stirred solution was slowly added (0.25 mL/h) to 1 mL of water. 4 supplementary milliliters of water were added. Subsequently, acetone was removed under vacuum and stirring overnight. Stirring was very slow to avoid the disassembling of the fragile nano-objects as further discussed. According to these experimental conditions, a slightly white solution in which

some micro-objects remained in suspension was observed. With time, a deposit appeared at the bottom of the vial. High-resolution TEM (HR-TEM) images of the upper clear solution revealed the formation of wormlike objects (Figure 4-16, upper part). From several images, we proposed a hypothetic scenario for the worm formation as described by Summerlin and De in the case of PITSA and PISA based amphiphilic copolymers, respectively.^{92, 93} During the initial stage, some spherical nanoparticles collapsed and fused into cylindrical nanoparticles such as grains of rice (Figure 4-16a).⁸⁵ They gradually grew and evolved into worms curled up on themselves. We noted the progressive curvature until the ends were touching and induced two types of nano-objects (Figure 4-16b). First, the heart-shape nano-objects of 50-60 nm were formed due to a distortion in the same face. Alternatively, the growing end meeting the other caused the folding of the worm. Several images of folded worm were reported in Figure 4-16.

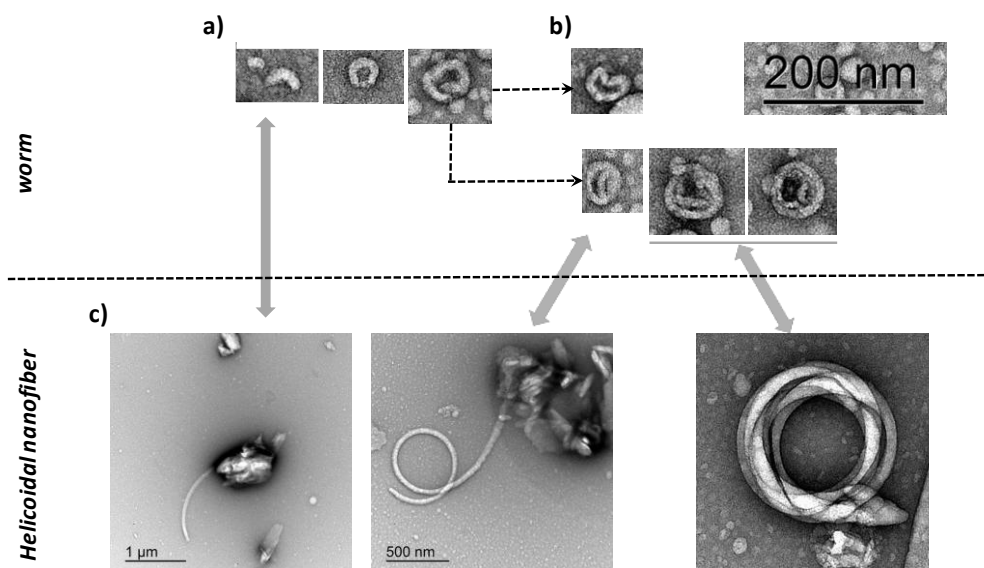


Figure 4-16: The growth of the worms (upper part of the figure) and the superhelices (lower part of the figure).

The HR-TEM observation of the solution containing the deposit revealed the same evolution of morphologies on a larger scale going until a higher sophisticated morphology: single stranded superhelix as shown in the lower part of Figure 4-16(c). We noted that the helical nanostructures were also observed by SEM in transmission mode (Figure SI4-6).

By varying the experimental conditions and modifying the order of addition of solvents (water was poured into acetone at a concentration of 0.1 mg/mL) only spherical nanoparticles were observed by HR-TEM with $D_{\text{TEM}} = 30$ nm (supporting information, Figure SI4-5).

Moreover, diblock heterografted architecture with the same amphiphilic ratio did not reveal this specific morphology. From an aggregate cluster (heap) of copolymers, the worm expanded by twisting on itself and initiate the growth of the superhelix as illustrated in Figure 4-17. The spontaneous and irreversible lengthening of the fibers resulted in a strong anisotropic growth, consequence of a well-ordered molecular packing. The folding of the nanofibers occurred after around 500 nm from the heap. These micrometer-long helices were described by several structural parameters: cylinder width, propeller pitch, helix width as labeled in Figure 4-18. These superstructures measured 1-2 μm of length with a large cylinder width in comparison to those of the amphiphilic block and grafted copolymers reported in literature and gathered in Table 4-3 (around 50 to 150 nm) which widely varied from 250 to 450 nm as illustrated in Figure SI4-7. The thickness of the strand ranged from 32 to 51 nm corresponding to the initial nanoparticles. This value was similar to that of the other copolymers of Table 4-3 (15 to 55 nm). Otherwise, these superhelices were characterized by a large screw pitch of 280 nm similarly to that of other grafted copolymers of Table 4-3. We noted the high pitch of the helix of grafted copolymers related to that of block copolymers looking at the grafted amphiphilic copolymers with hydrophobic backbone bearing hydrophilic pendent chains⁷⁸ as well as the grafted amphiphilic copolymers constituted of hydrophilic and hydrophobic pendent chains.⁷⁷ The wide cylinder can be explained by the occurrence of long distance interactions between coumarins and polyoxazoline pendant chains and the absence of stereogenic centers. A supplementary consequence of the latter characteristic and the achirality of the polymer is the folding of the helix into both left-handed and right-handed helices. More complex superstructures were also observed with tangled single strand helix as illustrated in Figure 4-18, right.

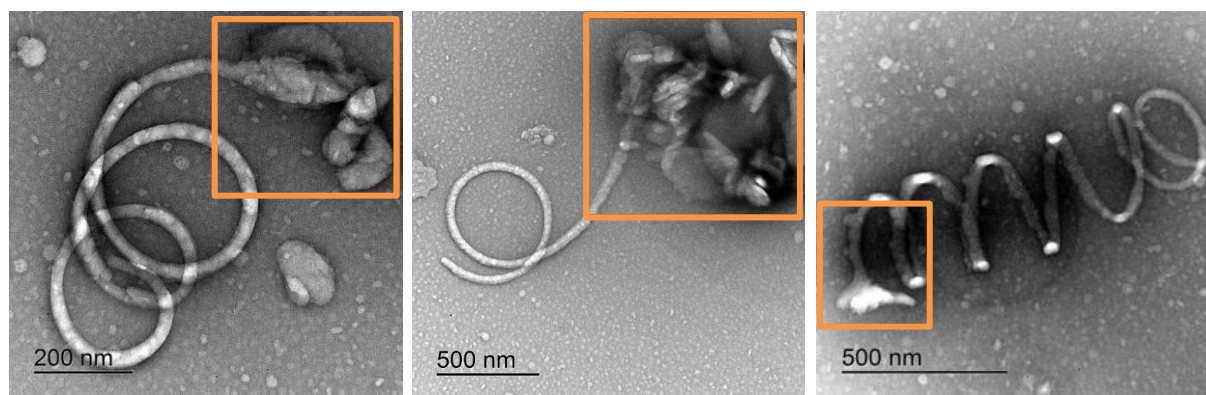


Figure 4-17: HR-TEM images of the misshapen heap of nanoparticles at the initial stage of the helix elaboration.

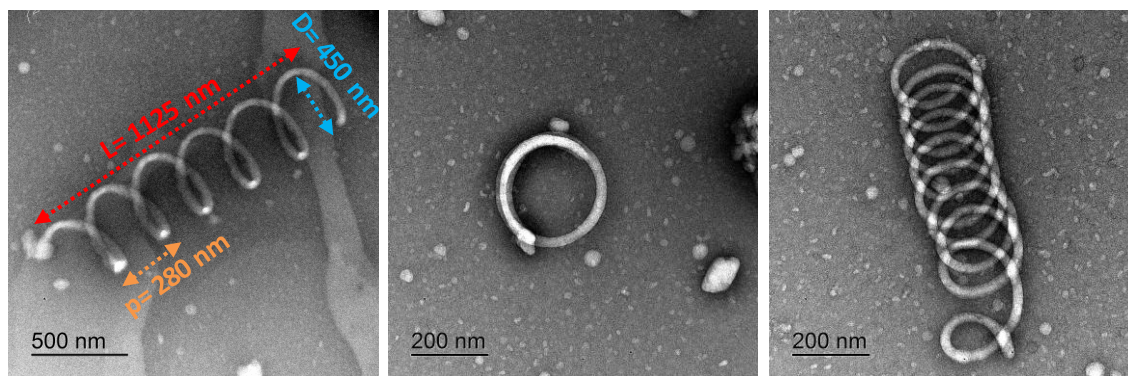


Figure 4-18: HR-TEM images illustrating the size and the morphologies of the superhelices.

In general, the folded state of the helices is stabilized by a variety of non covalent cohesive forces including hydrogen bonds, electrostatic forces, dipolar interactions, steric packing, and hydrophobic effects.⁷⁰ The liquid crystal behavior of the coumarin derivatives⁹⁴ as well as its ability for nanostructured films⁹⁵ come from strong π - π interactions between aromatic rings. Thus the crystallization seems to be the driving force of the self-assembly, process commonly named crystallization-induced self-assembly (CISA) as Manners⁹⁶ and O'Reilly⁹⁷ have already reported for other amphiphilic copolymers, poly(ferrocenyldimethylsilane) and PLA-*b*-PAA polymers, respectively. The crystallinity should explain the weakness of the superhelices, broken into pieces as illustrated in the HR-TEM images of Figure 4-19.

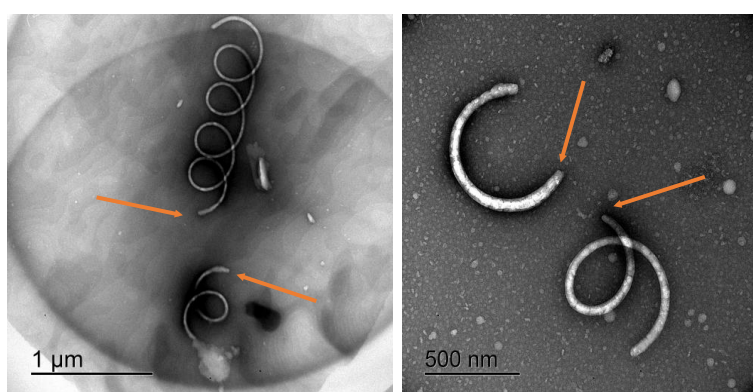


Figure 4-19: The break of helices detected by HR-TEM.

To evaluate the crystallinity of the superhelices, DSC and WAXS experiments were performed. By the first technic, the existence of two T_g values clearly suggested the formation of segregated microphases.⁶⁵ They were detected at 9 and 64 °C by contrast to those of the corresponding homopolymers of poly(methacrylate of polyoxazoline) HOMOx and poly(methacrylate of C11 coumarin) HCm at 12 and 33 °C, respectively (Figure SI4-8). Moreover, the melting peak at 122 °C confirmed the crystalline character with a melting enthalpy of -56.0 J/g. These DSC results were confirmed by WAXS experiments with the presence of multiple Bragg peaks at low and high $2\theta^\circ$ (Figure 4-20). We noted the contrast between the amorphous character of HOMOx and the semi-crystalline one of HCm as evidenced by the very broad peak and the multiple $2\theta^\circ$ peaks, respectively. Finally, the random copolymer constituted of the previous comonomers was semi-crystalline with a halo overlapped by several peaks ($\chi_c \approx 36\%$). Some of them corresponded to those of coumarin-coumarin interactions in the region of low $2\theta^\circ$ (see HCm) whereas new peaks in the region of high $2\theta^\circ$ appeared probably caused by polyoxazoline-coumarin interactions in the random structure. The occurrence of polyoxazoline-coumarin interactions was reinforced by the fact that these interactions did not appear either for the diblock amphiphilic heterografted copolymer Cm-*b*-OMOx as well as for the linear diblock⁴³ or triblock amphiphilic copolymers. Consequently, the importance of the macromolecular architecture onto the elaboration of high hierarchical organizations was demonstrated since, using the same building blocks (alkyl chain, coumarin unit and POx chain), only random heterografts gave them, in opposition to diblock heterografts or linear amphiphilic copolymers giving only spherical objects. The presence of substituted amide groups excluded the occurrence of hydrogen bonds into polyoxazoline chains. The dipolar interactions seemed responsible of the organization into helix. These interactions have already been described between amide groups of polypeptides and coumarin units in the elaboration of organo gelators⁸⁷ as well as that between coumarin derivatives bearing substituted amide groups in short fibers.⁸⁶

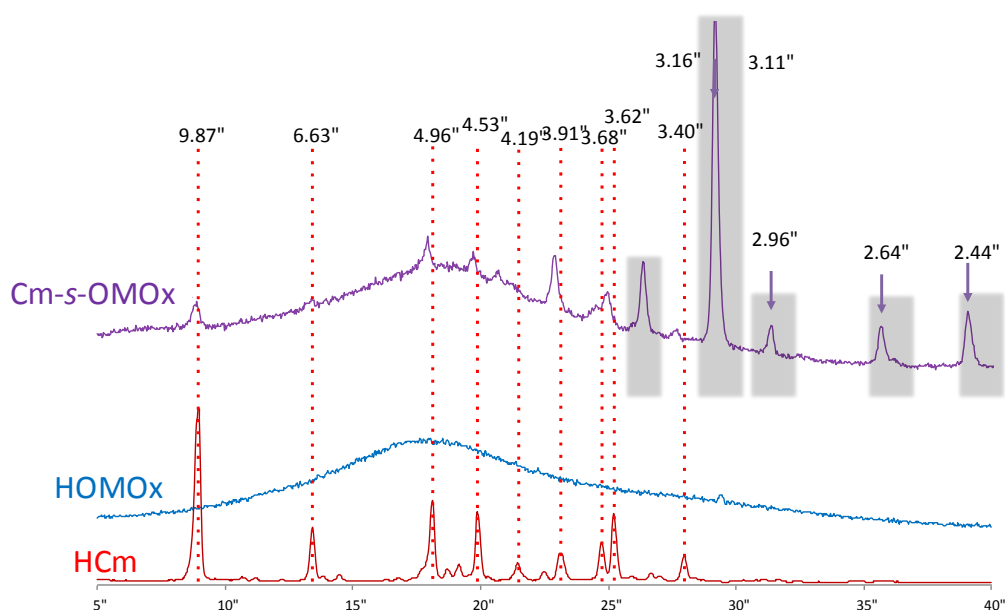


Figure 4-20: WAXS patterns of HCm, HOMOx and Cm-s-OMOX.

In addition, on the HR-TEM images, the white color of the helices seemed to correspond to nanoparticles fusing by crystallization and inducing the accumulation of the contrast agent, uranyl acetate, at the superhelix surface. Unfortunately, the diffraction spots were observed even if an amorphization of the sample occurred too fast to determine the structural parameters.

The ability of Cm-s-OMOX to crystallize was also demonstrated during HR-TEM experiments where the melting of nano-objects occurred under electron bombardment as illustrated in Figure 4-21 giving objects nicknamed “nenuphars”. The process of nenuphar growth begins by the extension of the surface until around 1.5-2 nm in diameter (Figure 4-21, right and down) and the thickening of the contour progressed by melting of the copolymer as evidenced by the white color in Figure S14-9 and Figure 4-21, right and top (see aforementioned for the explanation).

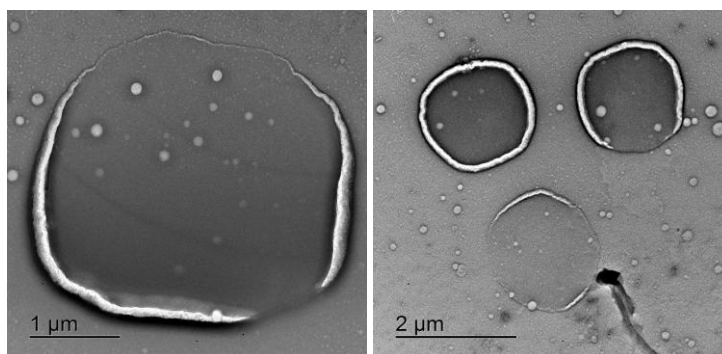


Figure 4-21: HR-TEM pictures of the nenuphars.

Conclusions

In a previous study, linear di- and triblock copolymers based on the same building blocks (alkyl coumarin and polyoxazoline chain) were shown to self-assemble into spherical or ovalic nanoparticles. In this study, we investigated an additional structure consisting of heterografted copolymers leading to original morphologies of nano-objects *i.e.* helical fibers. Many examples of helicoidal superhelices were described in literature using chiral polymers, simple diblock or grafted diblock copolymers but to our knowledge, this is the first superhelices obtained from amphiphilic achiral random heterografted copolymers and the first helicoidal superhelix based on polyoxazoline. The growth process of the helicoidal superhelices was demonstrated through the formation of worms in diluted media that begin from spherical nanoparticles which gradually interact and merge into grains of rice and further into helicoidal aggregates. The process of the helix formation was the crystallization taking place between POx chains and coumarin units by dipolar interactions as illustrated with the formation of nenuphars. Surprisingly, the key factor of this self-organization was the random character of the copolymer as it did not occur with diblock heterografted copolymer or linear copolymers. The attractiveness of polyoxazolines for the elaboration of highly hierarchical self-assembly was proved through the amide-coumarin cooperation.

Acknowledgement

The authors thank the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” and the “Centre National de la Recherche Scientifique” for financial support. They are thankful to Dr. Joel Couve from ICGM for DSC measurements and Dr. Bernard Fraisse for WAXS analysis.

6. Conclusion

Après avoir détaillé dans les chapitres 2 et 3 l'auto-assemblage des copolymères amphiphiles linéaires sous forme de nano-objets sphériques, le chapitre 4 montre la capacité d'auto-organisation dans l'eau des copolymères amphiphiles hétérogreffés $\text{Cm}^x\text{-OMOX}^y$. Dans une **première publication**, le choix de la nano-précipitation directe à l'aide d'acétone dans l'eau en tant que méthode de préparation des nanoparticules a été justifié et montre comment seuls les copolymères les plus hydrophobes $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM) et $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM) s'assemblent sous forme d'**une seule population**. La proportion de comonomère hydrophobe Cm est le facteur principal qui pilote l'auto-assemblage de ces copolymères. La **morphologie sphérique** de ces nano-objets a bien été démontrée par TEM, avec des tailles beaucoup plus importantes que dans le cas des copolymères linéaires diblocs et triblocs. Des études SLS et TEM ont également révélé le caractère non compact et **gonflé en milieu solvant** des nanoparticules. Enfin, les copolymères hétérogreffés de faible et de forte masse ont une **différence très nette de comportement sous UV** avec la conservation des nanoparticules telles que dans le cas des copolymères hétérogreffés de forte masse $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (HM) alors que des agrégats de plus grande taille sont formés dans le cas des copolymères hétérogreffés de faible masse $\text{Cm}^{85}\text{-OMOX}^{15}$ (LM).

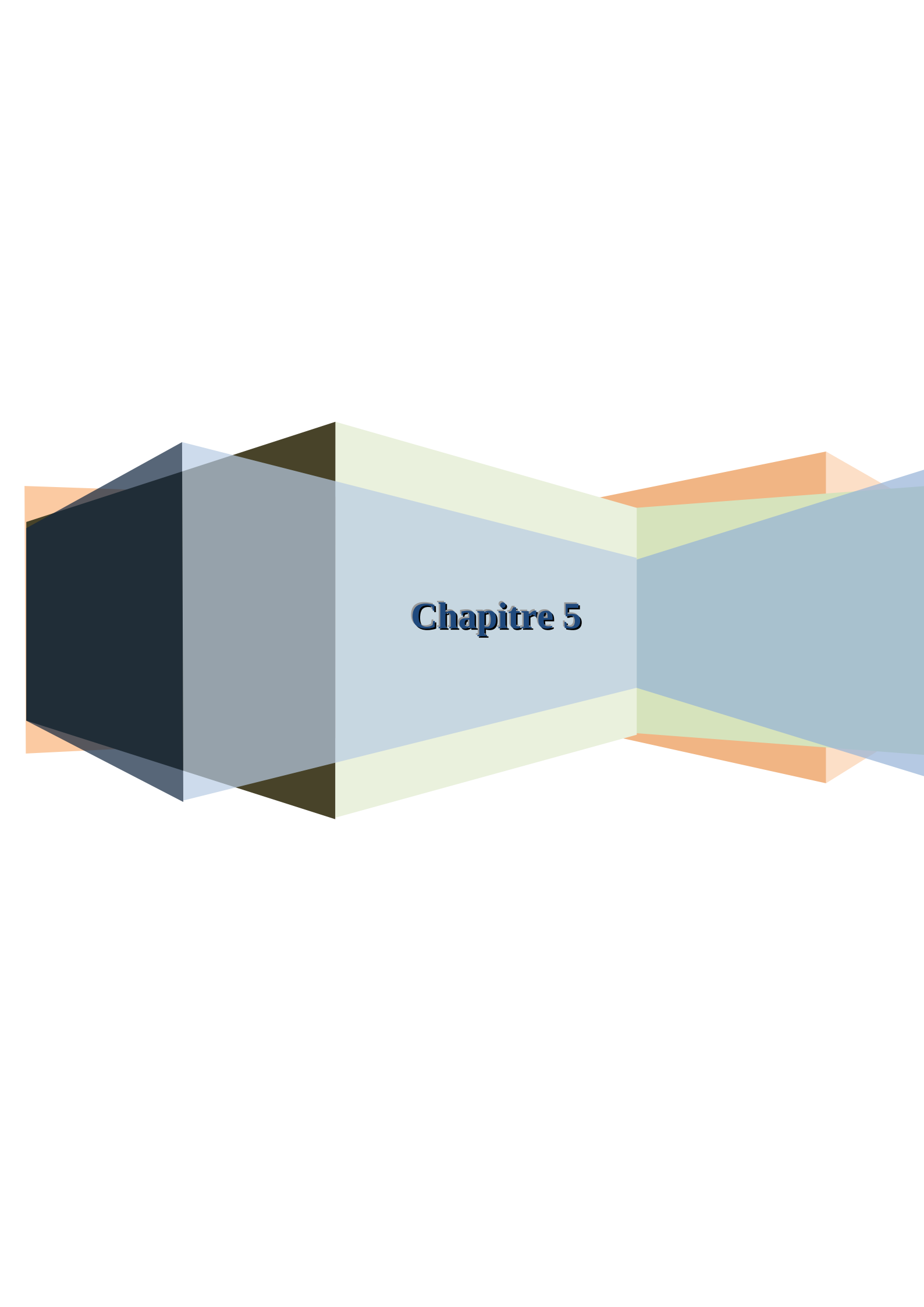
Dans une **deuxième publication**, une étude approfondie des copolymères $\text{Cm}^{55}\text{-OMOX}_4^5$ (HM) dibloc et statistique dans l'eau a été réalisée. Des **nano-fibres hélicoïdales** également appelées **superhélices** ont été observées par TEM haute résolution. Il s'agit de la première description de nano-hélices submicroniques générées à partir d'un copolymère amphiphile hétérogreffé statistique et achiral. Le phénomène de croissance de ces objets a été démontré par formation de nanoparticules puis de leur fusion mettant en lumière la **crystallisation** du copolymère grâce aux **interactions polyoxazoline-coumarine** vraisemblablement de type dipolaire. Cette étude montre ainsi l'intérêt des polyoxazolines pour l'élaboration de nano-objets hautement structurés lorsque des blocs pouvant générer des interactions spécifiques leurs sont associés. Enfin, ce travail montre le double intérêt de la coumarine à savoir de rendre les matériaux adaptatifs par sa photo-activité mais également de servir de force motrice à la structuration de polymères à grande échelle.

Références

1. P. J. Stals, Y. Li, J. Burdyska, R. Nicolay, A. Nese, A. R. Palmans et al. S. S. Sheiko; *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**; 135, 11421-4.
2. K. Matyjaszewski; *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**; 685, 2-30.
3. S. S. Sheiko, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski; *Progress in Polymer Science*, **2008**; 33, 759-785.
4. S. Peng, B. Bhushan; *RSC Advances*, **2012**; 2, 8557-8578.
5. M. Hans, H. Keul, A. Heise, M. Moeller; *Macromolecules*, **2007**; 40, 8872-8880.
6. K. Matyjaszewski, J. Spanswick; *Materials Today*, **2005**; 8, 26-33.
7. Q. Song, F. Li, L. Yang, Z. Wang, X. Zhang; *Polym. Chem.*, **2015**; 6, 369-372.
8. W. A. Braunecker, K. Matyjaszewski; *Progress in Polymer Science*, **2007**; 32, 93-146.
9. Y. Wang, S. M. Grayson; *Advanced drug delivery reviews*, **2012**; 64, 852-65.
10. R. Verduzco, X. Li, S. L. Pesek, G. E. Stein; *Chemical Society Reviews*, **2015**; 44, 2405-2420.
11. D. Zehm, A. Laschewsky, M. Gradzielski, S. Prévost, H. Liang, J. R. P. Rabeet et al. J. R. M. Gummel; *Langmuir*, **2009**; 26, 3145-3155.
12. D. Neugebauer; *Polymer*, **2007**; 48, 4966-4973.
13. R. K. O'Reilly, M. J. Joralemon, C. J. Hawker, K. L. Wooley; *New Journal of Chemistry*, **2007**; 31, 718-724.
14. D. Gieseler, R. Jordan; *Polym. Chem.*, **2015**; 6, 4678-4689.
15. A. Mahmud, X.-B. Xiong, A. Lavasanifar; *Macromolecules*, **2006**; 39, 9419-9428.
16. H.-I. Lee, K. Matyjaszewski, S. Yu-Su, S. S. Sheiko; *Macromolecules*, **2008**; 41, 6073-6080.
17. A. Dag, H. Durmaz, E. Demir, G. Hizal, U. Tunca; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2008**; 46, 6969-6977.
18. D. Neugebauer, Y. Zhang, T. Pakula, K. Matyjaszewski; *Macromolecules*, **2005**; 38, 8687-8693.
19. Y. Xia, B. D. Olsen, J. A. Kornfield, R. H. Grubbs; *Journal of the American Chemical Society*, **2009**; 131, 18525-18532.
20. J. Bühler, S. Muth, K. Fischer, M. Schmidt; *Macromol Rapid Commun*, **2013**; 34, 588-594.
21. B. Guillermin, V. Darcos, V. Lapinte, S. Monge, J. Coudane, J.-J. Robin; *Chemical Communications*, **2012**; 48, 2879-2881.
22. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Macromolecular Rapid Communications*, **2012**; 33, 1600-1612.
23. C. Weber, M. Wagner, D. Baykal, S. Hoeppener, R. M. Paulus, G. Festag et al. U. S. Schubert; *Macromolecules*, **2013**; 46, 5107-5116.
24. C. Weber, C. R. Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert; *Macromolecules*, **2009**; 42, 2965-2971.
25. C. Weber, R. C. Becer, A. Baumgaertel, R. Hoogenboom, U. S. Schubert; *Designed Monomers and Polymers*, **2009**; 12, 149-165.
26. G. Volet, V. Chanthavong, V. Wintgens, C. Amiel; *Macromolecules*, **2005**; 38, 5190.
27. J. Jiang, B. Qi, M. Lepage, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2007**; 40, 790-792.
28. J. Babin, M. Lepage, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2008**; 41, 1246-1253.
29. J. He, Y. Zhao; *Dyes and Pigments*, **2011**; 89, 278-283.
30. Y. Zhao, L. Tremblay, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2011**; 44, 4007-4011.
31. H.-I. Lee, J. Pietrasik, S. S. Sheiko, K. Matyjaszewski; *Progress in Polymer Science*, **2010**; 35, 24-44.
32. H. Shi, Y. Zhao, X. Dong, Y. Zhou, D. Wang; *Chemical Society Reviews*, **2013**; 42, 2075-2099.
33. Y. Xu, J. Yuan, B. Fang, M. Drechsler, M. Müllner, S. Bolisetty et al. A. H. E. Müller; *Advanced Functional Materials*, **2010**; 20, 4182-4189.
34. M. Müllner, J. Yuan, S. Weiss, A. Walther, M. Förtsch, M. Drechsler, A. H. E. Müller; *Journal of the American Chemical Society*, **2010**; 132, 16587-16592.
35. S.-I. Yamamoto, J. Pietrasik, K. Matyjaszewski; *Macromolecules*, **2008**; 41, 7013-7020.

36. C. Feng, Y. Li, D. Yang, J. Hu, X. Zhang, X. Huang; *Chemical Society Reviews*, **2011**; 40, 1282-1295.
37. H. Yabu, Y. Hirai, M. Shimomura; *Langmuir*, **2006**; 22, 9760-9764.
38. B. H. Lee, B. West, R. Mclemore, C. Pauken, B. L. Vernon; *Biomacromolecules*, **2006**; 7, 2059-2064.
39. D. Habault, H. Zhang, Y. Zhao; *Chemical Society Reviews*, **2013**; 42, 7244-56.
40. S. R. Trenor, A. R. Shultz, B. J. Love, T. E. Long; *Chemical Reviews*, **2004**; 104, 3059-3078.
41. Y. Zhao; *Journal of Materials Chemistry*, **2009**; 19, 4887-4895.
42. J. He, L. Tremblay, S. Lacelle, Y. Zhao; *Soft Matter*, **2011**; 7, 2380-2386.
43. L. Korchia, C. Bouilhac, V. Lapinte, C. Travelet, R. Borsali, J.-J. Robin; *Polymer Chemistry*, **2015**; 6, 6029-6039.
44. S. W. Provencher; *Die Makromolekulare Chemie*, **1979**; 180, 201-209.
45. J. Bodycomb, M. Hara; *Macromolecules*, **1995**; 28, 8190-8197.
46. K. Loos, A. Böker, H. Zettl, M. Zhang, G. Krausch, A. H. E. Müller; *Macromolecules*, **2005**; 38, 873-879.
47. Y. Nakamura, Y. Wan, J. W. Mays, H. Iatrou, N. Hadjichristidis; *Macromolecules*, **2000**; 33, 8323-8328.
48. Y. Nakamura, Y. Wan, J. W. Mays, H. Iatrou, N. Hadjichristidis; *Macromolecules*, **2001**; 34, 2018-2018.
49. A. Einstein; *Annalen der Physik*, **1905**; 322, 549-560, available on the Internet at the following address <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/andp.19053220806/abstract> (in German) and accessed 14th July 2016.
50. C. Travelet, M. Stemmelen, V. Lapinte, F. Dubreuil, J.-J. Robin, R. Borsali; *Journal of Nanoparticle Research*, **2013**; 15, 1626.
51. O. Kratky, G. Porod; *Journal of Colloid Science*, **1949**; 4, 35-70.
52. J. S. Pedersen; *Advances in Colloid and Interface Science*, **1997**; 70, 171-210.
53. B. Walther, *Light Scattering from Polysaccharides*, in *Polysaccharides* **2004**, CRC Press.
54. W. Fan, X. Tong, Q. Yan, S. Fu, Y. Zhao; *Chemical Communications*, **2014**; 50, 13492-13494.
55. J. Babin, M. Lepage, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2008**; 41, 1246-1253.
56. S. Dahmane, A. Lasia, Y. Zhao; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2008**; 209, 1065-1072.
57. T. Wolff, H. Gerner; *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2004**; 6, 368-376.
58. J.-O. Joswig, T. Lorenz, G. Seifert; *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **2014**; 228.
59. K. Iliopoulos, O. Krupka, D. Gindre, M. Sallé; *Journal of the American Chemical Society*, **2010**; 132, 14343-14345.
60. A. Gress, B. Smarsly, H. Schlaad; *Macromolecular Rapid Communications*, **2008**; 29, 304-308.
61. A. Gress, A. Heilig, B. M. Smarsly, M. Heydenreich, H. Schlaad; *Macromolecules*, **2009**; 42, 4244-4248.
62. C. Cai, J. Lin, T. Chen, X.-S. Wang, S. Lin; *Chemical Communications*, **2009**; 2709-2711.
63. T. Nakano, Y. Okamoto; *Chemical Reviews*, **2001**; 101, 4013-4038.
64. R.-H. Jin; *Journal of Materials Chemistry*, **2003**; 13, 672-675.
65. K. Kempe, R. Hoogenboom, S. Hoeppener, C.-A. Fustin, J.-F. Gohy, U. S. Schubert; *Chemical Communications*, **2010**; 46, 6455-6457.
66. C. Legros, M.-C. De Pauw-Gillet, K. C. Tam, D. Taton, S. Lecommandoux; *Soft Matter*, **2015**; 11, 3354-3359.
67. Y. Mai, A. Eisenberg; *Chemical Society Reviews*, **2012**; 41, 5969-5985.
68. C. Bouilhac, C. Travelet, A. Graillot, S. Monge, R. Borsali, J.-J. Robin; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 2756-2767.
69. C. Travelet, C. Bouilhac, J.-J. Robin, R. Borsali; *Soft Matter*, **2014**; 10, 7545-7557.
70. J. C. Nelson, J. G. Saven, J. S. Moore, P. G. Wolynes; *Science*, **1997**; 277, 1793-1796.
71. K. M. Zepon, I. Otsuka, C. Bouilhac, E. C. Muniz, V. Soldi, R. Borsali; *Biomacromolecules*, **2015**; 16, 2012-2024.

72. C. C. Lee, C. Grenier, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning; *Chemical Society Reviews*, **2009**; 38, 671-683.
73. J. Qian, M. Zhang, I. Manners, M. A. Winnik; *Trends in Biotechnology*, **2010**; 28, 84-92.
74. G. Yang, J. Wang, Y. Wang, L. Li, X. Guo, S. B. Zhou; *Acs Nano*, **2015**; 9, 1161-1174.
75. J. F. Liu, J. J. Liu, H. Y. Xu, Y. M. Zhang, L. P. Chu, Q. F. Liu et al. C. H. Yang; *International Journal of Nanomedicine*, **2014**; 9, 197-207.
76. S. Zhang, S. Yang, J. Lan, S. Yang, J. You; *Chemical Communications*, **2008**; 6170-6172.
77. X. Zhang, Z. Shen, C. Feng, D. Yang, Y. Li, J. Huet et al. X. Huang; *Macromolecules*, **2009**; 42, 4249-4256.
78. Y. Huang, Y. Mai, X. Yang, U. Beser, J. Liu, F. Zhan et al. X. Feng; *Journal of the American Chemical Society*, **2015**; 137, 11602-11605.
79. J. Cornelissen, M. Fischer, N. Sommerdijk, R. J. M. Nolte; *Science*, **1998**; 280, 1427-1430.
80. J. F. Reuther, D. A. Siriwardane, R. Campos, B. M. Novak; *Macromolecules*, **2015**; 48, 6890-6899.
81. S. Zhong, H. Cui, Z. Chen, K. L. Wooley, D. J. Pochan; *Soft Matter*, **2008**; 4, 90-93.
82. K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert; *Angewandte Chemie-International Edition*, **2010**; 49, 6288-6308.
83. T. X. Viegas, M. D. Bentley, J. M. Harris, Z. F. Fang, K. Yoon, B. Dizman et al. F. M. Veronese; *Bioconjugate Chemistry*, **2011**; 22, 976-986.
84. S. Kahraman, H. M. Çakmak, S. Çetinkaya, H. A. Çetinkara, H. S. Güder; *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **2013**; 74, 565-569.
85. Z. Guo, R. Gong, Y. Jiang, X. Wan; *Soft Matter*, **2015**; 11, 6118-6124.
86. M. Mille, J.-F. Lamère, F. Rodrigues, S. Fery-Forgues; *Langmuir*, **2008**; 24, 2671-2679.
87. H. T. Yu, H. Mizufune, K. Uenaka, T. Moritoki, H. Koshima; *Tetrahedron*, **2005**; 61, 8932-8938.
88. M. Stemmelen, C. Travelet, V. Lapinte, R. Borsali, J.-J. Robin; *Polymer Chemistry*, **2013**; 4, 1445-1458.
89. C. Travelet, M. Stemmelen, V. Lapinte, F. Dubreuil, J.-J. Robin, R. Borsali; *Journal of Nanoparticle Research*, **2013**; 15.
90. C. Giardi, V. Lapinte, C. Charnay, J. J. Robin; *Reactive & Functional Polymers*, **2009**; 69, 643-649.
91. A. El Asmar, O. Gimello, G. Morandi, D. Le Cerf, V. Lapinte, F. Burel; *Macromolecules*, **2016**; 49, 4307-4315.
92. C. A. Figg, A. Simula, K. A. Gebre, B. S. Tucker, D. M. Haddleton, B. S. Sumerlin; *Chemical Science*, **2015**; 6, 1230-1236.
93. K. Bauri, A. Narayanan, U. Haldar, P. De; *Polymer Chemistry*, **2015**; 6, 6152-6162.
94. Y. Q. Tian, E. Akiyama, Y. Nagase, A. Kanazawa, O. Tsutsumi, T. Ikeda; *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2000**; 201, 1640-1652.
95. C. Kim, A. Trajkovska, J. U. Wallace, S. H. Chen; *Macromolecules*, **2006**; 39, 3817-3823.
96. J. B. Gilroy, T. Gaedt, G. R. Whittell, L. Chabanne, J. M. Mitchels, R. M. Richardson et al. I. Manners; *Nature Chemistry*, **2010**; 2, 566-570.
97. N. Petzetakis, D. Walker, A. P. Dove, R. K. O'reilly; *Soft Matter*, **2012**; 8, 7408-7414.



Chapitre 5

Chapitre 5 : Nanoparticules à cœur photo-dimérisé, photo-réticulé ou pré-photodimérisé : efficacité et stabilité de la photo-stimulation

1. Introduction

Les copolymères amphiphiles, rendus photo-stimulables par la présence d'unités photo-chromiques liées aux extrémités hydrophobes, permettent l'obtention de nanoparticules. Celles-ci sont principalement employées en tant que nano-vecteurs, notamment en *drug delivery*, en vue d'améliorer le piégeage de molécules hydrophobes par stabilisation du cœur des nano-objets formés. Cette stabilisation est induite par la photo-stimulation des unités photo-chromiques situées au cœur de l'assemblage. Elle permet de transporter et de délivrer efficacement les molécules chargées.

Lors des chapitres précédents, trois architectures de copolymères possédant les mêmes entités constitutionnelles à savoir une partie hydrophile polyoxazoline et une partie hydrophobe constituée d'une chaîne alkyle porteuse d'une unité coumarine en extrémité ont été étudiées. Lorsqu'elles sont réparties différemment, ces entités vont donner lieu à des architectures variées (Figure 5-1) :

- dans le cas de copolymères linéaires diblocs (CoumPOx) nommés D, dans ce chapitre, ces unités coumarine situées en extrémité du bloc hydrophobe donnent lieu, après irradiation, à la photo-dimérisation du cœur des nano-objets (NDx),
- dans le cas de copolymères hétérogreffés (Cm-OMOX), nommés H dans ce chapitre, localisés en extrémité des greffons hydrophobes, elles forment, après irradiation, des nano-objets à cœur photo-réticulé (NHx),
- dans le cas de copolymères linéaires triblocs (T), préalablement photo-dimérisés de manière à former des chaînes triblocs au bloc central hydrophobe dimérisé, elle conduisent à la cristallisation du cœur des nanoparticules (NT).

Selon la position et le nombre de groupements coumarine par chaîne, le phénomène photo-induit ayant lieu au cœur de l'objet diffère. Ce cinquième chapitre a pour objectif d'évaluer l'efficacité, la réversibilité et la stabilité de ces photo-réponses mais également leur impact sur la stabilité et la capacité de piégeage des nanoparticules en réalisant une étude comparative de ces trois systèmes. Une telle comparaison n'a pour l'heure jamais été réalisée.

Lors des chapitres précédents, il a été mis en évidence que les copolymères amphiphiles sont capables de s'auto-organiser en milieu aqueux sous forme de nanoparticules. Pour une comparaison optimale, un seul copolymère de chacune des trois architectures a été choisi. Ils ont la particularité de présenter le même ratio hydrophile/hydrophobe ($\sim 2,5$; cf Tableau 5-1) qui permet leur dissolution directe dans l'eau. Les copolymères amphiphiles linéaires CoumPOx₁₃ (nommés dans ce chapitre D), hétérogreffés Cm²⁹-OMOx⁷¹ (nommés H) et les triblocs T₁₂¹² (T) s'auto-assemblent alors spontanément dans l'eau en nanoparticules plus ou moins polydisperses selon une organisation bien définie.

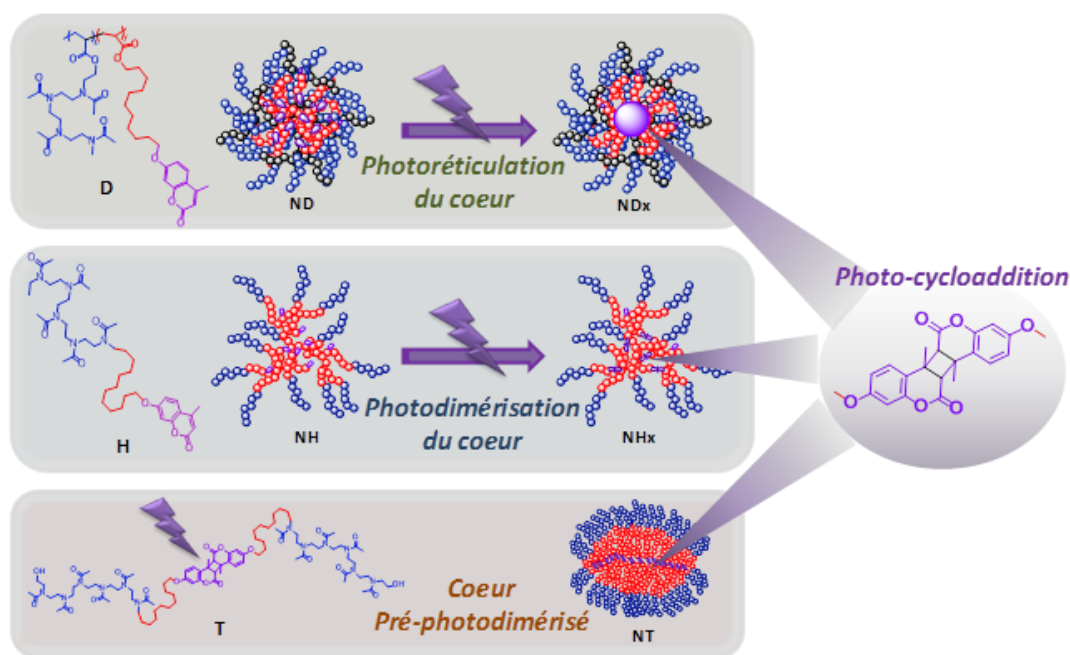


Figure 5-1 : Récapitulatif des systèmes amphiphiles photo-stimulables étudiés et les réponses photo-induites au niveau du cœur des nanoparticules formées

2. Stabilisation du cœur de nanoparticules par photo-cyclisation des coumarines

2.1. Méthodologie d'étude de la photo-réversibilité de nanoparticules

Pour rappel, la cyclo-addition des coumarines, plus particulièrement de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (utilisée tout au long de cette étude) est un phénomène réversible qui s'effectue à une longueur d'onde d'irradiation supérieure à 310 nm et qui est capable de revenir à son état initial par une exposition à une longueur d'onde inférieure à 254 nm. Il est possible de quantifier l'efficacité UV de ces photo-réactions et d'évaluer leur réversibilité par spectroscopie UV (cf chapitre 2, p.87). Comme vu en Chapitre 1 (p.31), dans le cas des

copolymères amphiphiles rendus photo-stimulables par la présence du chromophore coumarine, la stabilisation des auto-assemblages par photo-irradiation du cœur repose, dans la littérature, sur l'utilisation de copolymères greffés porteurs de plusieurs unités coumarine par chaîne comme Zhao l'a largement développé.¹ Ces copolymères sont constitués de chaînes hydrophobes porteuses de coumarines à leurs extrémités et associées à des co-monomères hydrophiles à base de poly(éthylène glycol) (PEG) greffé dans le cas des hétérogreffés ou linéaire pour les "coil-brush".²⁻⁴ Ces études ont mis en évidence que la photo-réticulation pouvait atteindre 60 à 80 % en 30 à 90 min (Figure 5-2 a)). La dé-réticulation en revanche n'est que de 30-40 % en 5 à 20 min (Figure 5-2 b)). Cette dernière apparaît donc plus rapide car avec une longueur d'onde de 254 nm, ce rayonnement, bien que peu pénétrant, est très énergisant (190 fois supérieur à l'énergie d'activation nécessaire pour une réaction à 25 °C contre 130 fois pour un rayonnement à 365 nm). La réversibilité de ces systèmes est altérée par l'encombrement des structures induisant une faible mobilité au sein des assemblages et atténuant la pénétration des UV (qui sont peu pénétrants à cette longueur d'onde, cf chapitre 1 p.18). Par ailleurs, la réversibilité est généralement vérifiée par la répétition du cycle dimérisation/dé-dimérisation (3 à 5 répétitions) (Figure 5-2 c).⁵

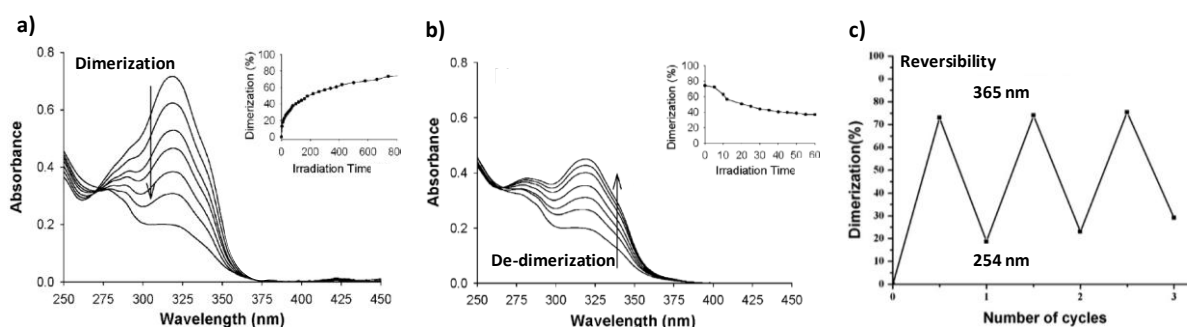


Figure 5-2 : Etude de la réversibilité de la photo-réticulation de copolymère amphiphile greffé coumariné.²

Cette étude montre que la plus grande perte de réversibilité a lieu lors du premier cycle et qu'elle se poursuit, dans une moindre mesure, dans les cycles successifs. Dans le cas de nanoparticules en suspension, ces copolymères greffés s'avèrent être néanmoins les plus réversibles. D'autres structures, étudiées par Priestley⁶ et répertoriées par Trenor,⁵ possédant des coumarines au sein du squelette principal d'une chaîne purement hydrophile (PEG) ou en extrémités de ces chaînes ont montré des pourcentages de dimérisation plus faibles (30-60%) et peu réversibles (10-20%). En revanche, aucune étude n'a été réalisée sur la photo-dimérisation de copolymères linéaires amphiphiles en suspension possédant une seule coumarine en extrémité de chaîne.

2.2. Etude de nanoparticules au cœur photo-stabilisé

La photo-dimérisation ou photo-réticulation des nano-objets permet, en figeant leur cœur, d'améliorer leur stabilité face aux conditions environnementales auxquelles ils peuvent être exposés durant leur application. De nombreuses études témoignent de cette stabilité lors du piégeage de molécules modèles hydrophobes photo-actives telles que le Nile Red (NR)^{6, 7} ou de molécules à activité thérapeutique telles que la doxorubicine (DOX).⁸ Les nanoparticules chargées et photo-stabilisées sont exposées à des variations de température, de pH ou de concentration. Un suivi de la libération des molécules piégées met alors en évidence la stabilité ou non des nanoparticules étudiées. He et *al.* ont stabilisé par photo-réticulation des nanoparticules de copolymères à base de poly(étheramine) porteurs de coumarine et ont prouvé l'intérêt de cette stabilisation pour l'encapsulation de DOX.⁸ Les nanoparticules non photo-irradiées relarguent plus rapidement les molécules chargées, à savoir 24 h contre 60 h pour celles photo-stabilisées. Pour une utilisation en tant que nano-vecteur, la photo-stabilisation du cœur permet d'augmenter l'efficacité de transport et de limiter les effets secondaires liés à une libération non contrôlée. Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur l'efficacité d'encapsulation de tels objets par rapport à leurs analogues non stabilisés.

Par ailleurs, des études ont montré que les nanoparticules non photo-stabilisées tendent à s'agréger au cours du temps et en fonction de paramètres tels que la température.^{2, 6}

Enfin, la stabilité des nanoparticules au cœur photo-dimérisé ou réticulé est étroitement liée à la stabilité de cette photo-réaction. L'efficacité de la photo-dimérisation ou photo-réticulation doit donc être conservée tout au long de l'application visée. Des études réalisées sur la réaction de photo-cycloaddition de la coumarine seule ont montré que celle-ci peut être affectée par une augmentation de température ou une exposition à la lumière du jour.^{9, 10} Or, les études réalisées sur des copolymères amphiphiles photo-irradiés ne montrent aucun suivi de la stabilité de la photo-cyclisation elle-même.

3. Publication : Comparative study of photo-active nanoparticles based on amphiphilic diblock, triblock and heterografted polyoxazoline

L'étude réalisée ci-après a pour objectif de comparer les nanoparticules de copolymères linéaires à cœur photo-dimérisé, pré-photo-dimérisé et les nanoparticules de copolymères greffés à cœur photo-réticulé afin de mettre en évidence les caractéristiques de la photocycloaddition des coumarines lorsqu'elles sont dimérisées ou réticulées au cœur d'un agrégat (Figure 5-4). Il s'agit donc d'étudier la photo-stimulation de la coumarine en fonction de sa position au sein de l'architecture macromoléculaire ainsi que de leur nombre par chaîne polymère. Pour cela, différents aspects ont été étudiés. D'une part, l'efficacité et la réversibilité du photo-procédé et, d'autre part, sa stabilité face à des paramètres tels que le temps, la température (37 et 60 °C) et la lumière ont été évalués au regard de la stabilité des nanoparticules. Leur impact sur l'efficacité de piégeage d'une molécule modèle, le Nile Red, a également été étudié. Cette dernière, molécule hydrophobe fréquemment utilisée comme marqueur fluorescent, est facile à détecter et à quantifier. Par ailleurs, sa structure multicyclique est similaire à celle de nombreux principes actifs tels que la DOX (anti-cancéreux), la cortisone (anti-inflammatoire), la coumadine (anti-coagulant), la chlorpromazine (neuroleptique) ou encore l'éthinylestadiol (contraceptif) ainsi que la coumarine dimérisée (Figure 5-3). Aussi, cette similitude laisse supposer que la coumarine serait à la fois un agent de stabilisation par sa propre dimérisation et par interactions de type π -stacking avec la molécule piégée.

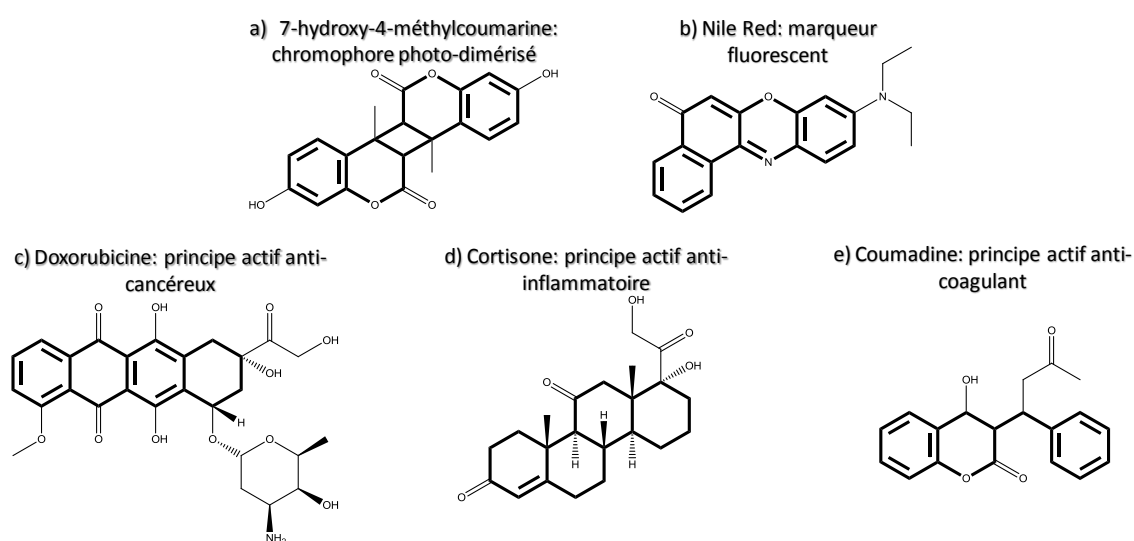


Figure 5-3 : Analogie structurale entre a) le chromophore photo-sensible coumarine, b) le marqueur Nile Red et les principes actifs c) Doxorubicine, d) Cortisone et e) Coumadine.

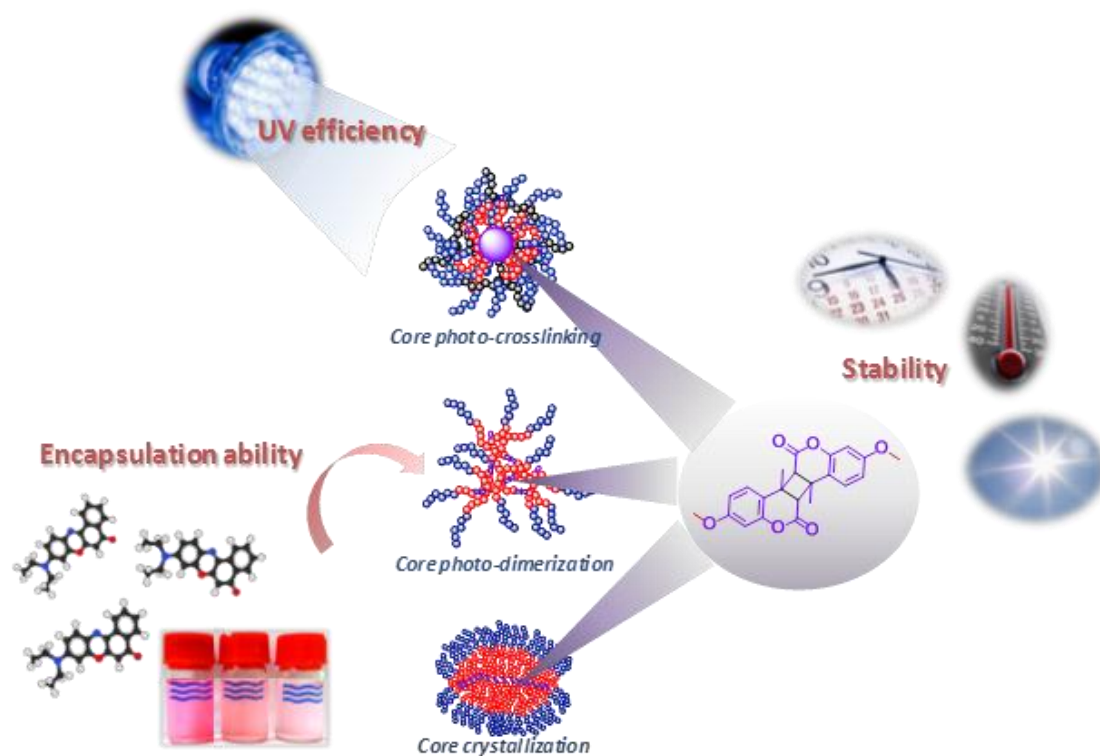


Figure 5-4 : Table of content of the publication.

Comparative Study of Photo-Active Nanoparticles Based on Amphiphilic Diblock-, Triblock- and Heterografted Polyoxazoline

Laetitia Korchia,^a Cécile Bouilhac,^a Anne Aubert,^b Jean-Jacques Robin^a and Vincent Lapinte^{a*}

^a: Institut Charles Gerhardt Montpellier UMR5253 CNRS-UM-ENSCM, Equipe Ingénierie et Architectures Macromoléculaires, Université Montpellier, France

^b: Institut Charles Gerhardt Montpellier UMR5253 CNRS-UM-ENSCM, Equipe Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé, Université Montpellier, France

Abstract

Photo-active nanoparticles (ND, NT, NH) were elaborated in water from amphiphilic diblock (D), triblock (T) and heterografted (H) copolymers based on a chromatic unit, coumarin, linked to an alkyl chain and a hydrophilic polyoxazoline (POx) chain. Under UV-exposure, for grafted copolymers, the coumarin moieties crosslinked the nanoparticle core (NHx) while it only dimerized chain by chain the nanoparticle core with linear copolymers (NDx). An alternative way consisted in generating triblock copolymers (T) by dimerization of the coumarin before polymerization. The self-assembly of these copolymers was studied as well as the UV-activity and UV-reversibility of the corresponding nanoparticles by UV spectroscopy. Their stability under light exposure and temperature was also monitored by dynamic light scattering (DLS). Finally, the loading of a lipophilic fluorescent probe (Nile Red) into the nanoparticle core was evaluated by fluorescence emission. All these aspects illustrated the impact of the macromolecular architecture of the amphiphilic copolymers on the size, the UV-activity, the stability and the loading efficiency of the nanoparticles.

Introduction

Amphiphilic copolymers have, for a long time, attracted much attention due to their ability to self-assemble in selective solvents.^{11, 12 13, 14} The stability of self-assembled polymeric nanoparticles is a crucial property for many applications including delivery with nano-carriers or chemistry with nano-reactors. Polymeric nano-carriers have been extensively investigated and largely used in medical applications such as drug delivery.^{15, 16} To enhance therapeutic effect and decrease side effects, nano-carriers should meet drastic requirement specifications such as appropriate size, stability, drug loading efficiency and controlled release kinetic. For this last points, nano-carriers often present the drawbacks of drug burst releases and instability in physiological media. To improve the stability of nanoparticles and decrease the burst, the cross-linking has been recognized as a powerful approach.^{17, 18} In comparison to other strategies, photo-crosslinking is an attractive way because rapid, effective and well-controlled process without by-product formation.^{8, 19-22}

Among various photo-crosslinkable molecules, coumarin and its derivatives have attracted considerable attention.^{1, 23, 24} They photo-dimerize according to a $[2\pi+2\pi]$ cyclo-addition under UV-irradiation at $\lambda > 310$ nm. The dimer adduct can be reversibly dissociated into the two coumarin precursors at $\lambda < 260$ nm by photo-cleavage and thus reverts to the starting compound.⁶ The reversible photo-dimerization of coumarin has also been explored for designing photo-controllable nanoparticles.²⁵ For example, Luo and collaborators prepared photo-crosslinked telodendrimer micelles characterized by a high drug loading efficiency, capacity and stability.²⁶ Ji and collaborators also synthesized a coumarin-based pH-responsive polymer able to form cross-linked micelles characterized by a favourable sustained release of drug.^{3, 27} He and *al.* studied the photo-crosslinking of poly(ethyleneimine)s, and evaluated their potential as smart drug carriers.¹

From photo-controlled reversible dimerization of coumarin moieties incorporated in copolymer, nanoparticles can be core-crosslinked and subsequently de-crosslinked under illumination at two selective wavelengths.^{8, 28} As shown by Trenor⁵ or Zhao,^{1, 29} according to the number and the position of coumarin units in the copolymer architecture, the photo-response occurring inside the core changed. For instance, Zhao and collaborators described amphiphilic heterografted copolymers self-assembled into nanoparticles where coumarin moieties were gathered in the inner part.²⁰ Their UV-irradiation at 300 nm stabilized the nanoparticles by core-crosslinking whereas a partial reversible de-crosslinking occurred.

Otherwise, the simple photo-dimerization of linear polymer bearing only one coumarin per chain has already been described⁵ but never with amphiphilic copolymers.

In previous works, we elaborated several amphiphilic photo-responsive architectures of copolymers. Heterografted copolymers bearing numerous coumarins per chain were able, after self-assembly into aqueous media, to photo-crosslink the nanoparticle core whereas linear copolymers bearing a coumarin in terminal position of polymeric chain core-photo-dimerized.³⁰ In addition, this linear copolymers can also be first dimerized giving triblock copolymers. All of them are based on hydrophilic polyoxazoline and a hydrophobic alkyl C₁₁ chain terminated by a coumarin moiety. Polyoxazolines have received significant attention over the last few years for various applications in technical matters³¹ and biomedical applications.^{32, 33} Their potential comes from their various potential functionalizations,³⁴⁻³⁸ high hydrophilicity and biocompatibility relative to their peptidic structural analogy.¹⁷⁻²⁰ In spite of those numerous advantages, amphiphilic polyoxazolines associated to photo-active group have been little studied.^{39, 40} Herein, we investigated the stabilization and the UV-activity of photo-responsive nanoparticles by core photo-dimerization or core photo-crosslinking using amphiphilic diblock, triblock and heterografted copolymers previously described (Figure 5-5).³⁰ The comparison of both core photo-responses has never been reported and should allow a better understanding of the core-stabilized nanoparticles in term of UV-efficiency, stability and loading ability.

Experimental

Material

CoumC₁₁OH (CmOH), CoumC₁₁OTs (CmTs, initiator of diblock), CmTs₂ (bis-initiator of triblock), MCm (hydrophobic coumarinated monomer), MPOx (hydrophilic polyoxazoline monomer), D (diblock copolymer),³⁰ T (triblock copolymer) and H (heterografted copolymers) were synthesized according to the procedures previously reported by our group. After photo-dimerization of the core ND and NH, the nanoparticles constituted of D and H copolymers were named NDx and NHx, respectively.

Instruments

The UV-dimerization of and UV-crosslinking of ND and NH into NDx and NHx were performed in a cylindrical photochemical reactor “Rayonet RPR-200” equipped with 16 symmetrically placed lamps with emission in 350 or 254 nm. The samples were irradiated in

quartz flasks placed on a circular rotating holder. UV-visible analyses were conducted with a Perkin Elmer – lambda 35 UV/Vis spectrometer equipped with PTP-1+1 Peltier System in quartz vial ($l=1\text{cm}$). Size exclusion chromatography (SEC) with N,N-dimethylacetamide (DMAc) (with 0.1 w/w% LiCl) as eluent at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} , calibrated with poly(methylmethacrylate) (PMMA) standards, was performed on a PL-GPC 50 Plus equipped with a Varian model 410 autosampler. The SEC apparatus comprised a refractive index detector and was filled with a $8\text{ }\mu\text{m}$ PolarGel-M pre-column ($7.5 \times 50\text{ mm}$) and two $8\text{ }\mu\text{m}$ PolarGel-M columns ($7.5 \times 300\text{ mm}$) thermostated at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. For DLS analysis, the samples were concentrated at 1 mg.mL^{-1} . Solutions were filtered through $0.45\text{ }\mu\text{m}$ hydrophilic PTFE syringe filters (Millipore). Measurements were performed at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ using a ZetasizerNano ZS from Malvern Instruments equipped with a laser He-Ne source of 633 nm wave-length and an angle of 173° . The intensity-averaged values of the hydrodynamic diameter are given in this study. Sample preparation for transmission electron microscopy (TEM) analysis was done as follows: $10\text{ }\mu\text{L}$ of aqueous copolymer suspensions concentrated at 0.04 mg.mL^{-1} were dropped onto glow discharged carbon-coated copper grids (Agar scientific, Cu-300). Then, $10\text{ }\mu\text{L}$ of a 4 w/v % aqueous uranyl acetate negative stain solution was added. TEM imaging was performed using a JEOL, JEM – 2200FS microscope operating at 200 kV . Fluorimetry measurements were performed using a RF-5301PC spectrofluorophotometer (Shimadzu) using quartz cuvettes.

Methods

The nanoparticles of the copolymers D, H and T (ND, NH and NT) were prepared in water by direct copolymer dissolution in Milli-Q water, at a concentration of 1 mg.mL^{-1} . Particles were formed under 500 rpm mechanical stirring after 24 hours and then filtered through $0.45\text{ }\mu\text{m}$ hydrophilic PTFE syringe filters (Millipore) before DLS measurements.

The Critical Aggregation Concentrations (CAC) were determined through the maxima intensity of coumarin emission band at 340 nm evolution according to the concentrations and monitoring by a spectrofluorometer with $\lambda_{\text{ex}}=310\text{ nm}$ recorded from 300 to 700 nm . Maximal concentrations were chosen according to saturated emission limitation.

The kinetic of photo-dimerization (or cross-linking)/ de-dimerization (de-crosslinking) were monitored in sealed quartz vials, to keep the concentration constant, and irradiated through the photo-chemical reactor Rayonet RPR-200 at 350 nm / 254 nm , respectively. For each kinetic

time, the same vial was alternately placed into the UV-vis spectrometer where the coumarin absorbance at 320 nm was recorded from 250 to 370 nm and placed under UV exposure inside the photo-reactor. Concentrations were chosen according to saturated absorbance limitation imposed by the UV-spectrometer.

The stability of the nanoparticles ND, NDx, NH, NHx and NT were monitored by DLS following the size populations and by UV-spectrometry regarding the intensity of the coumarin band at 320 nm. The measurements were realized on sealed quartz vials during 60 days, at 20, 37 or 60°C, either protected or exposed from natural light.

Loaded-nanoparticles were prepared with Nile Red as commonly used model drug; its photo-activity permits the monitoring of entrapment efficiency of the nanoparticles through the calculation of the drug loading efficiency (D.L.E.) and the drug loading capacity (D.L.C.). Nile Red loading by ND, NDx, NH, NHx and NT was carried out by direct and simultaneous dissolution of Nile Red probe (0.1 mg.mL^{-1}) with copolymers (1 mg.mL^{-1}) into MilliQ-water during 24 hours under mechanical stirring (500 rpm) as well as unloaded nanoparticles. Polymer concentration was chosen according to self-assembly study. NDx and NHx were then irradiated during 1 hour under UV-exposure at 350 nm into quartz flasks through the photo-reactor Rayonet RPR 200 and under stirring and cooling. Nile Red loaded nanoparticle suspensions were subsequently eluted by size exclusion chromatography to separate unloaded molecules. A pre-packed desalting disposable PD-10 columns (GE healthcare) constituted of Sephadex® G25 medium was used as stationary phase and MilliQ-water as eluted phase. Elution flow rate was controlled by a peristaltic pump (Ismatec®, VWR), regulated at 1 mL.min^{-1} , and fractions of 1.5 mL were collected until a total elution volume above 30 mL. After DLS and spectrofluorimetry analysis, the fractions containing Nile Red loaded nanoparticles were gathered for each kind of nanoparticles and then lyophilized. Free Nile Red and copolymer were recuperated and dissolved into acetone to before quantification.

Quantification concentrations varying from 1.10^{-6} to $5.10^{-6} \text{ mg.mL}^{-1}$ in acetone were chosen according to Nile Red maximal emission and monitored through a spectrofluorometer inside quartz vials under $\lambda_{\text{excitation}} = 552 \text{ nm}$ and recorded from 500 to 700 nm. The loading efficiency was estimated from the Nile Red emission intensity calibration according to various concentrations in acetone (cf annexe Figure SI5-9).

Results and discussion

Comparative self-assembly of the amphiphilic diblock, triblock and heterografted photo-responsive copolymers

Three macromolecular architectures of photo-responsive copolymers (diblock, triblock and heterografted) named D, T and H, respectively, were synthesized from the same hydrophobic and hydrophilic blocks as well as the same photo-active group, 7-hydroxy-4-methylcoumarin, as shown in Figure 5-5. For each copolymer, the hydrophobic alkyl chain in C₁₁ bore a terminal coumarin moiety which constituted the core of photo-responsive nanoparticles into aqueous media.

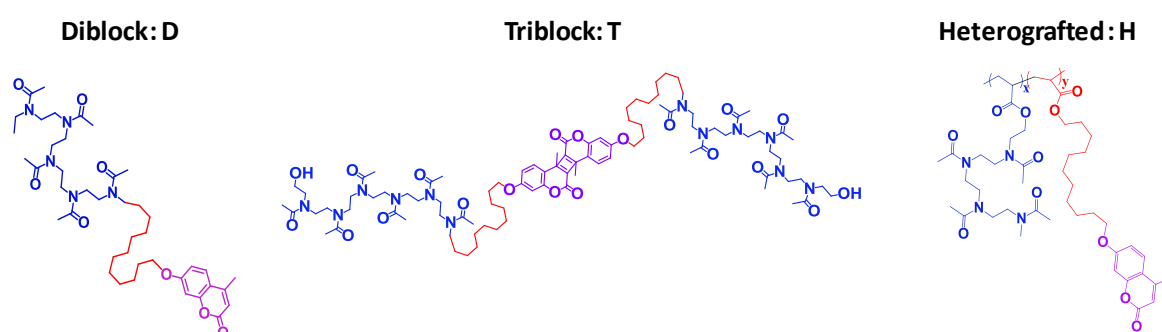


Figure 5-5: Chemical structure of the amphiphilic copolymers D, T and H.

According to the copolymer architecture and the number of coumarin units per chain, the photo-response occurring into the inner part of the nanoparticles under UV-exposure differed. In this way, three cases were studied: the photo-dimerized nanoparticles core using diblock copolymers (NDx), the crystallized nanoparticles core using the triblock copolymers (NT) and the photo-crosslinked nanoparticles core using grafted copolymers (NHx). These photo-responsive nano-objects were elaborated combining the polymerization step, the aqueous self-assembly and the UV-irradiation knowing that the chronology changed in function of the route as shown in Figure 5-6.

For NDx, the amphiphilic photo-responsive diblocks D were first synthesized by cationic ring-opening polymerization (CROP) of 2-methyl-2-oxazoline (MOx) using the hydrophobic coumarinated initiator CmTs as already described.³⁰ Then, the diblocks D self-assembled in water into photo-responsive nanoparticles (ND) before photo-illuminating the core at 350 nm during 1h to lead to NDx.

Inversely, for triblock route, the photo-illumination of the nanoparticles occurred before the self-assembly. The triblock copolymers T were first synthesized by photo-irradiation of the corresponding initiator CmTs into a bis-initiator CmTs₂ before polymerizing MOx by CROP.

They were further self-assembled in water into nanoparticles (NT) having photo-dimerized core with a crystalline character as already demonstrated.

For NHx, the amphiphilic heterografted copolymers (H) were synthesized by free radical polymerization (FRP) of hydrophilic and hydrophobic methacrylate macromonomers as previously reported. The hydrophilic and coumarinated hydrophobic side chains were randomly distributed along the backbone. These amphiphilic copolymers were then self-assembled in water into nanoparticles (NH) before being photo-irradiated to crosslink the core of the nanoparticle (NHx). We noted the different behaviors between linear di- and triblock copolymers with terminal fluorescent dye (dimerization of the nanoparticle core) and the grafted copolymers bearing numerous pendent coumarin units (cross-linking of the nanoparticle core).

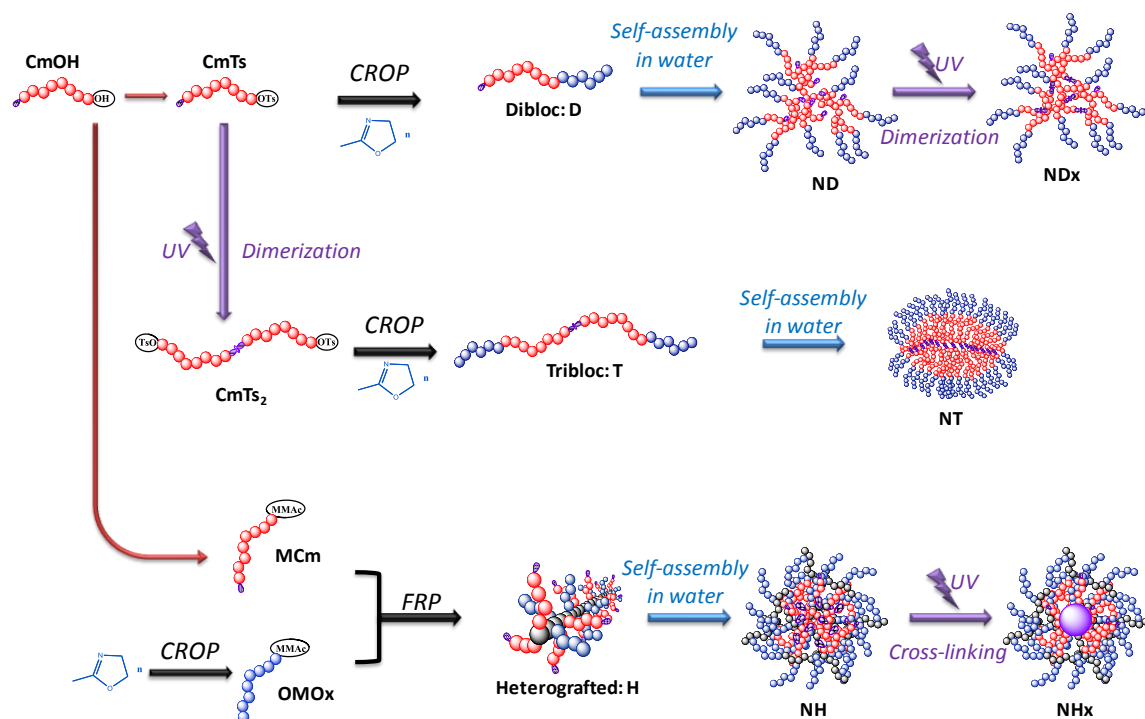


Figure 5-6: Association of polymerization step, self-assembly and UV-illumination to elaborate nanoparticles NDx, NT and NHx.

To put in evidence the structure of the formed nanoparticles, different characterization tests we determined: the molecular weight with SEC and the DP_n with 1H NMR.

We calculated the hydrophilic/hydrophobic ratio M_H/M_h around 2.5 where M_H and M_h corresponded to the molecular weight of hydrophilic and hydrophobic blocks, respectively (Table 5-1). Moreover, a copolymer H with a high molecular weight ($20\,000\text{ g.mol}^{-1}$) was chosen to demonstrate the influence of numerous coumarins per chain. We noted that for a same M_H/M_h ratio, the number of coumarins ranged from 1, 2 to 16 for D, T and H,

respectively. The predominant hydrophilicity of these copolymers D, T and H favoured the direct dissolution in water.

Table 5-1: Structural data of D, T and H copolymers and fluorescent response of the corresponding nanoparticles.

	Mn ^a [g.mol ⁻¹]	$\bar{D}$ ^a [-]	DPn POx ^b [-]	CMC ^c [mol.L ⁻¹]	Nb Coum ^b [-]	MH/Mh ^d [-]	Dimerization ^e [%]	De-dimerization ^f [%]
D	1 500	1.2	13	$2.6.10^{-6}$	1	2.7	70	30
T	2 800	1.5	12+12	-	2	2.4	75	75
H	20 000	2.6	36 x 4	$2.5.10^{-6}$	16	2.5	80	55

^a: Determinated by SEC in DMAc using PMMA standards, ^b: Determined by ¹H NMR, ^c: Determinated by spectrofluorimetry through coumarin emission band, ^d: Hydrophilic/hydrophobic balance, ^e: Monitored by UV-spectroscopy and calculated according to Equation 1 (annexe A5.1, SI5-1), ^f: Monitored by UV-spectroscopy and calculated according to Equation 2 (annexe A5.1, SI5-1).

According to DLS traces, the amphiphilic copolymers D, H and T self-assembled in water into nanoparticles above 12, 80 and 150 nm, respectively, with dispersity index above 0.3-0.4 (Figure 5-7). Regarding to TEM images, all the nanoparticles seemed also relatively monodispersed with a lower diameter (above 10, 30 and 20 nm, respectively). The difference in size of nanoparticles resulted from the fact that the DLS examined the nanoparticles in suspension by contrast to TEM which studied dry nanoparticles. We noted the difference of behaviour with more aggregations for T related to H and D. Herein, we focus on the stability of these nanoparticles, their size or aggregation is not discussed here.

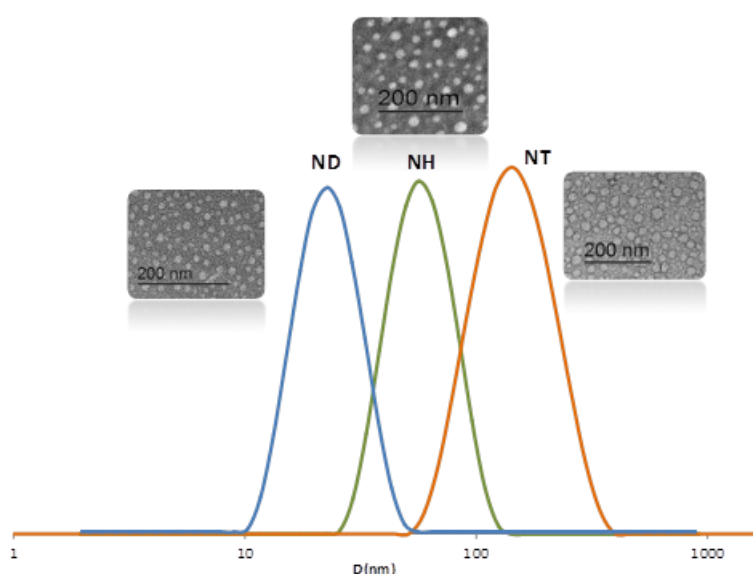


Figure 5-7: DLS results of ND (nanoparticles of diblock), NH (nanoparticles of heterografted) and NT (nanoparticles of triblock) and corresponding TEM images.

Photo-reversibility of the nanoparticle core stimulation

The coumarinated nanoparticles were illuminated at 350 and 254 nm and monitored by UV-vis spectroscopy. For all the nanoparticles, a decrease of UV absorption band of coumarin was clearly observed indicating that the [2 + 2] cycloaddition and thus the crosslinking or the dimerization of the nanoparticle core (NHx, NDx and NT) occurred (Figure 5-8 (a), (c) and (e)). By contrast, the reversibility of the crosslinking or dimerization of the corresponding nanoparticle core was measured with the increase of the same UV absorption band upon the illumination at 254 nm (Figure 5-8 (b), (d) and (f)). From these data, the kinetics of dimerization and de-dimerization of coumarin units can be monitored in time (Figure 5-9). In the literature, the grafted copolymers are the most commonly employed photo-responsive amphiphilic systems. Some of them, using 7-hydroxy-4-methylcoumarin, present a crosslinking rate of 60-80% for 30-90 min and a de-crosslinking close to 40% for 5-20 min.^{28, 41, 42} According to eq. 1 and 2 (supporting information in annexe SI5-I), the copolymers H were in good agreement with the literature with a crosslinking rate of 80% in 1 h and a de-crosslinking rate close to 55% in 10 min. By contrast, only one example of linear photo-responsive copolymer bearing coumarin units has already been reported.⁴³ This structure was purely hydrophilic and irradiated in bulk. In this case, 30% of dimerization and de-dimerization occurred in 20 and 4 min, respectively. They explained the low efficiency and reversibility of the photo-reaction by the slow mobility of the polymer chains in bulk. In our case, the coumarin dimerization and de-dimerization rate of the nanoparticle ND into NDx corresponded to 70 and 30%, respectively (Table 5-1). To our knowledge, the copolymer D was the first example of amphiphilic photo-dimerized linear copolymer in solution. The lower efficiency of the diblocks D related to the grafted copolymers H can be explained by the least number of coumarin units in the inner part of the nanoparticles. In the same way, for H, the closeness of the coumarins justified the high crosslinking rate. By contrast, the tangle of the core polymer chains D and the low meeting probability seemed to be an explanation of the low efficiency of copolymers D in photo-dimerization. The alternative route consisting in the triblock copolymers T, already dimerized, successfully photo-de-dimerized in 75% rate and inversely photo-dimerized around 75% (Figure 5-8). This should be caused by preferential interactions and crystallization keeping the coumarins close to each other after de-dimerization, ensuring the next photo-dimerization in good yield. The reversibility of the coumarin unit photo-response within D, H and T nanoparticles was investigated with successive photo-cycloaddition and photo-cleavage cycles as illustrated in Figure 5-9. For the

copolymers D and H, the maximum absorbance at 320 nm of each cycle slightly decreases with the number of cycles, probably due to the appearance of a small amount of asymmetric by-products of the coumarin dimer during photo-cleavage as previously described for other heterografted copolymers.^{2, 44} The copolymers T differed from the other ones by a total photo-reversibility explained by the well-defined initial organization of the previous dimerization, also causing the crystallization of nanoparticle core.

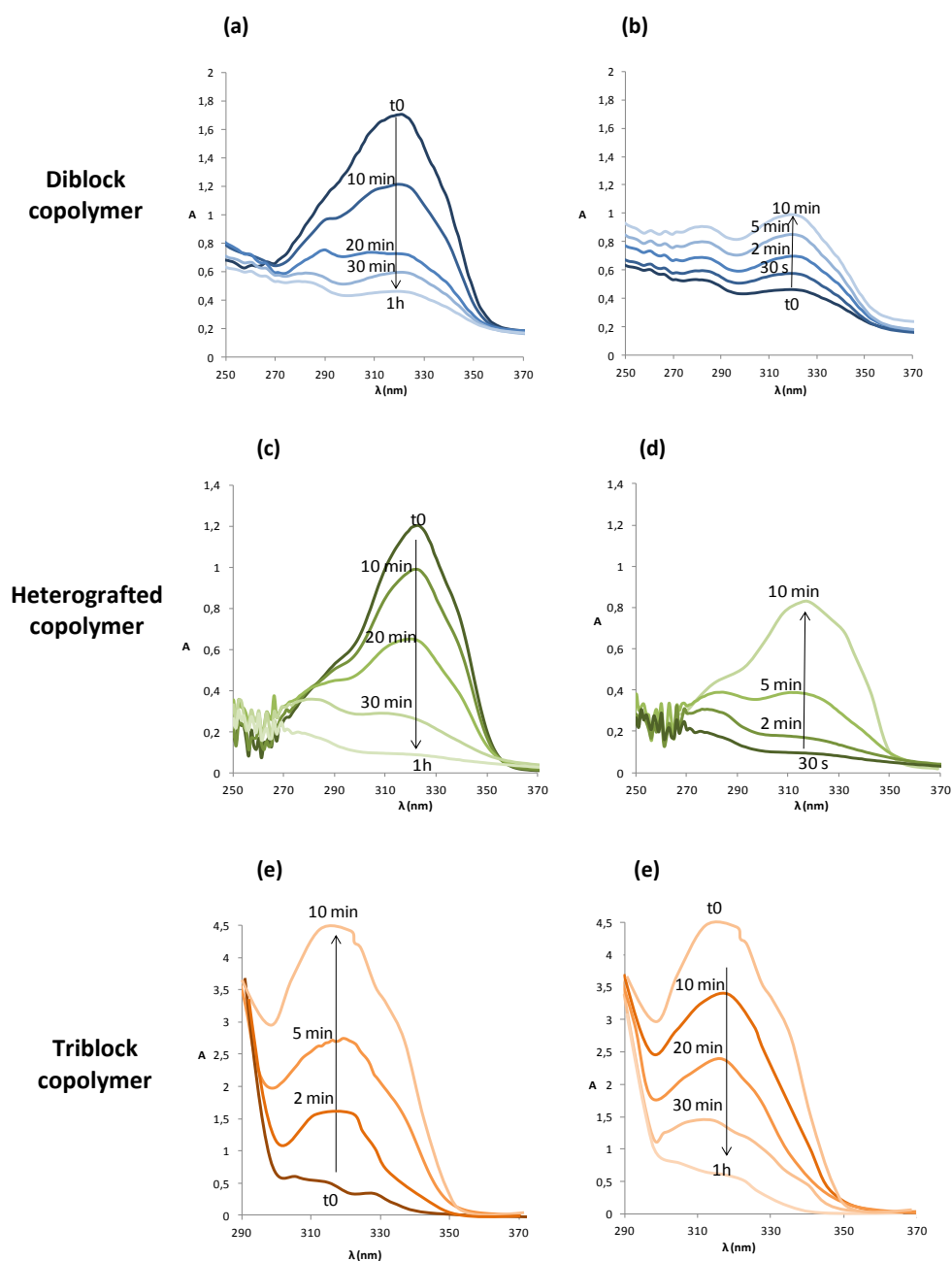


Figure 5-8: Coumarin absorption band kinetic studies under UV exposure at $\lambda = 350$ and 254 nm monitored by UV-vis spectrometer of (a) dimerization, (b) de-dimerization of ND; (c) cross-linking, (d) de-crosslinking of NH; and (e) de-dimerization and (f) re-dimerization of previously dimerized NT.

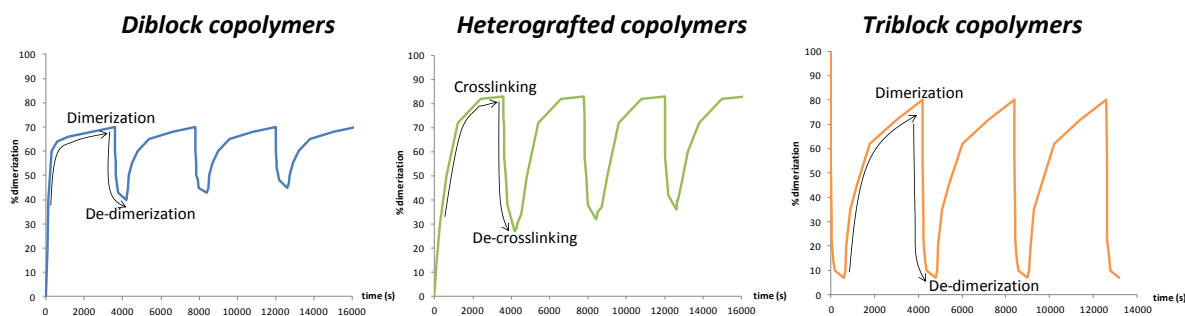


Figure 5-9: Study of the photo-cyclo-addition reversibility realized on ND (on left), NH (on middle) and NT (on right) with the repetition of alternating irradiation cycle at 350 nm (1h) / 254 nm (10 min) (cycloaddition/cleavage) for the two first and 254 (10 min) /350 nm (1h) (cleavage/cycloaddition) for the last.

Stability of the nanoparticles

The aim of this study was to enlighten if the photo-crosslinking was preferable to the simple photo-dimerization of the coumarin units to stabilize the nanoparticles ND, NH and NT. Several parameters including the temperature and light *versus* time were investigated. The formation of aggregates and the uncontrollable photo-cleavage of coumarin units were monitored by DLS and UV spectroscopy, respectively. The DLS study highlighted the appearance of aggregation of the nanoparticles before (ND and NH) and after photo-crosslinking (NHx) or photo-dimerization (NDx and NT) during a prolonged heating at 37 and 60 °C. Figure 5-10 a), c) and e) correspond to the size distribution of non-irradiated nanoparticles (ND and NH) in water (continuous lines) and irradiated nanoparticles NDx and NHx (dotted lines) and NT. Figure 5-10 b), d) and f) represent the same nanoparticles after 60 days at 60 °C. The size evolutions under heating at 60 °C during 60 days for both systems were shown in Figure SI5-1 (supporting information).

For D, the stability of the nanoparticles was confirmed with the same average diameter of 12 nm before and after UV-irradiation over time and under light as well as at 37 °C (supporting information SI5-II). At higher temperature, 60 °C, after 7 days the occurrence of predominant aggregates until 150 nm of mean diameter appeared (Figure 5-10 b)). The dimerization delayed the unstability until 15 days and limited the size of the aggregates at 60 nm (supporting information Figure SI5-1). Initially mono-populated, the size distributions were disturbed under heating caused by aggregation and the appearance of multi-populated distributions (Figure 5-10 b). Even though the dimerization of ND into NDx limited this aggregation in a first time, after 20 days the NDx destabilization happened. Less impacted, NH and NHx presented nevertheless the same characteristics. Predominant aggregates were

formed under heating at 60 °C (Figure 5-10 c) and d)) whereas they did not appear under other parameters such as light, time and the lower temperature, 37 °C (Figure SI5-2). The stability of the nanoparticles NH above 80 nm of mean diameter before and after crosslinking (NHx) was affected by heating and lead to multi-populated distribution with the main aggregates at 300 nm and above 130 nm since one month. As observed for D, the core photo-crosslinking seemed to improve the nanoparticle stability and delayed their aggregations even if the post-irradiation was not enough to preserve a long-term stability.

Concerning the triblock copolymers, the nanoparticles (NT) were insensitive to the temperature (Figure 5-10 e) and f)) as well as light (Figure SI5-1 et SI5-2). The overlapping of the initial and the terminal DLS traces around 150 nm demonstrated the stability of the crystallized core of NT. Thus, the crystallization of the nanoparticle core by coumarin dimerization before self-assembly in water was the more efficient way to stabilize the nanoparticles knowing that the triblocks route also allowed the more efficient photo-dimerization of coumarin.

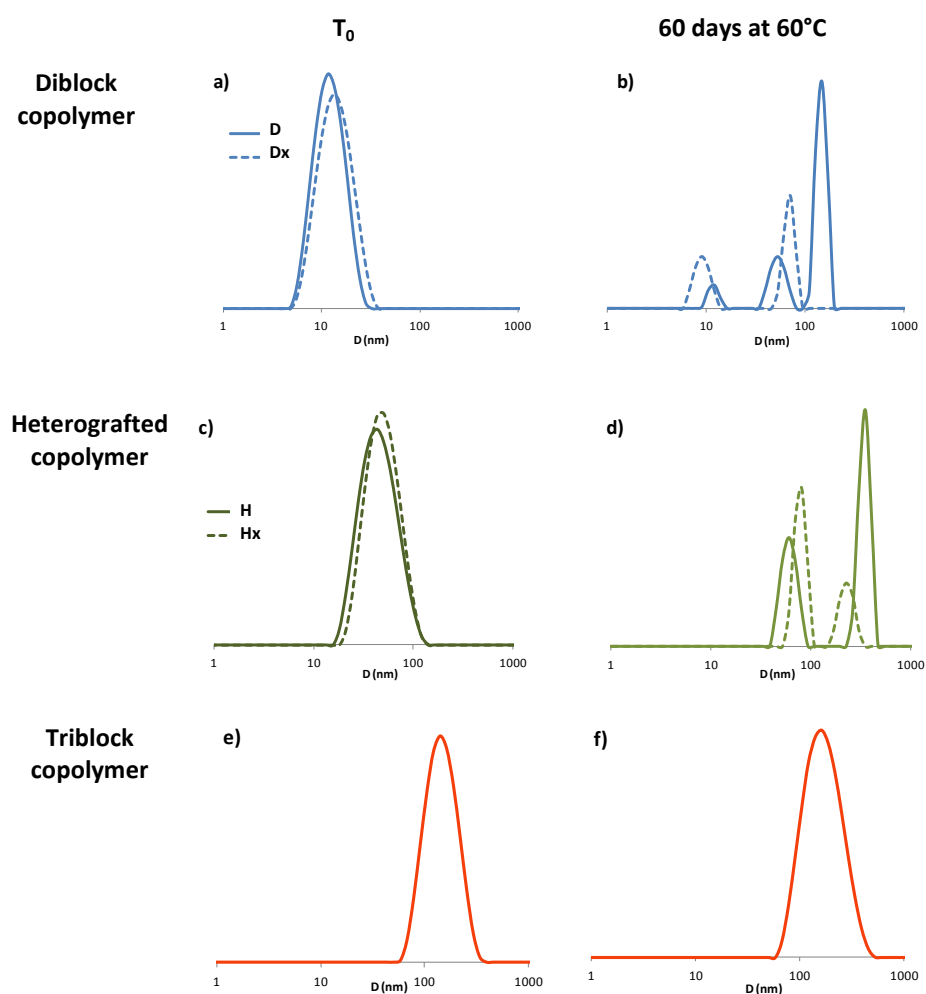


Figure 5-10: DLS traces of D, H and T before a), c) and e) and after b), d) and f) 60 days at 60 °C. For H and D dotted lines represented cross-linked and dimerized nanoparticles.

To pursue the investigation on the stability of nanoparticles NT, NDx and NHx over light and temperature, the de-dimerization or de-crosslinking of coumarin was monitored by UV spectroscopy regarding the intensity of coumarin absorption band at 363 nm as shown in Figure 5-11. In the dark, all the nanoparticle cores remained photo-dimerization or photo-crosslinking. The light had contrasting effect on nanoparticles with no modification of NDx and NT whereas 30% of de-dimerization of NHx (Equation 2) occurred after 60 days. The supplementary parameter destabilizing the nanoparticle core was the temperature. For NDx and NHx, at 37 °C, an unwitting reversible photo-cleavage rate of 40 and 20% were attained respectively *versus* 65 and 80%, respectively at 60 °C. We noted a faster de-dimerization of the core for NDx in comparison to NHx. The crosslinking of the hydrophobic chains NHx seemed to quite stabilize the nanoparticle core related to the simple dimerization of the polymeric chains of NDx. As previously observed by DLS, the nanoparticle core of NT was insensitive to light or heating. The high stability of NT could be explained by the crystallization of the inner part of nanoparticle, that stabilized the dimerized coumarin moieties and avoided the reverse photo-reaction.

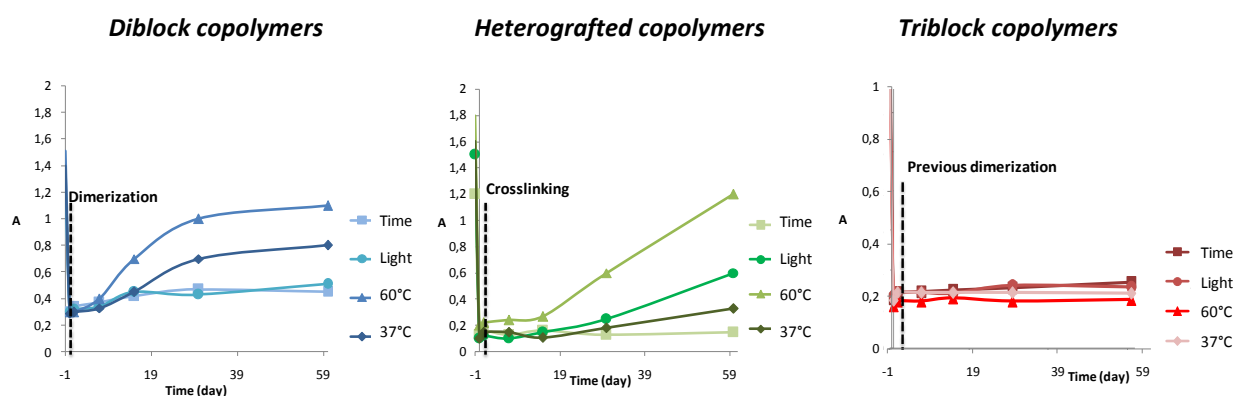


Figure 5-11: Photo-cleavage of nanoparticles NDx, NHx and NT versus light and temperature using UV spectroscopy.

Loading efficiency

To determine the effect of the coumarin dimerization on the entrapment of molecules, Nile Red was loaded into the nanoparticles (ND, NDx, NH, NHx and NT) at a theoretical loading capacity of 10%, chosen according to the literature.⁸ We noted the multicyclic structural resemblance between this hydrophobic fluorescent probe and the dimerized coumarin. The nanoparticle internalization of the colorimetric probe induced the coloration of the nanoparticle suspensions. A red coloration of suspensions has appeared since 1 h and

intensified until stagnation after 15 h. For NDx and NHx, after this period, the suspensions were irradiated at 350 nm during one hour to obtain respectively core-dimerized and core-crosslinked loaded nanoparticles. The no-overlapping of the coumarin and Nile Red emission bands in fluorospectroscopy was preliminary checked. As observed on the emission spectra of both nanoparticles and reported in supporting information (SI5-III), Nile Red $\lambda_{\text{emission}}$ was above 600 nm and coumarin $\lambda_{\text{emission}}$ around 380 nm at $\lambda_{\text{excitation}} = 552$ nm in water. The Nile Red entrapment in hydrophobic environment resulted from the appearance of an emission band in water whereas the free Nile Red in water was undetectable by fluorescence. To ensure that Nile Red emission intensity came exclusively from loaded molecules, charged nanoparticles were separated from the rest of the solution, meaning non-loaded Nile Red and unimers. By chromatography separation, DLS analysis and fluorescence emission, large nanoparticles, corresponding to loaded nanoparticles and eluting faster than small molecules such as free Nile Red and unimers, were separated (Figure SI5-3). The fluorescence monitoring allowed the identification of fractions containing loaded Nile Red (Figure SI5-4) whereas DLS shown the size distribution intensity at 12 nm of the ND suspension fractions (Figure 5-12). Overall loaded nanoparticles presented same size distribution than unloaded nanoparticles (data not shown). As observed, coumarin intensity increased with the presence of aggregates and decreased when the unimers were eluted. However, for the fractions richer in loaded nanoparticles, Nile Red radiation seemed to interfere with coumarin radiation and cover up nanoparticles emission. This Nile Red quenching effect, already proved with different molecules in others studies, explained the low coumarin emission intensity observed. The study was realized on NDx, NH, NHx and NT and similar profiles were observed (supporting information SI5-III in Figure SI5-5, 6, 7 and 8). We noted that core-crosslinked NHx and core-dimerized nanoparticles NDx and NT presented lower coumarin emission intensity in comparison to NH and ND (above 100-400 against 800-1000). This phenomenon can be explained by the formation of cyclobutane ring during the dimerization.

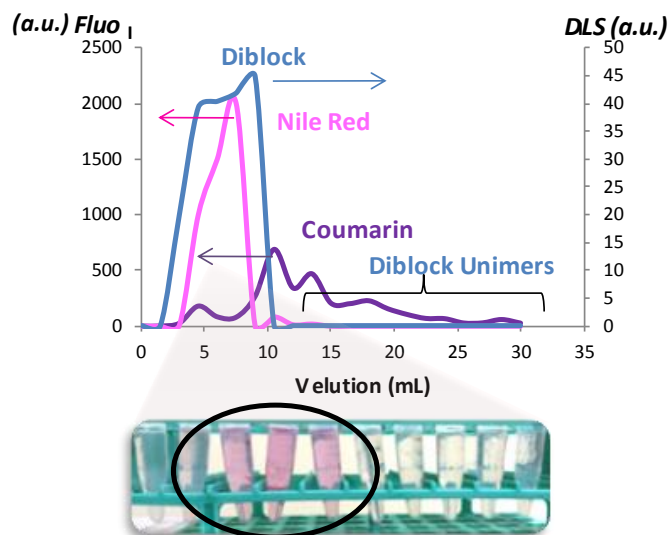


Figure 5-12: Elution of the charged nanoparticles in Nile Red.

To estimate the Nile Red loading rate containing in gathered fractions, the emission intensity of Nile Red was measured as illustrated in Figure 5-13. A significant split to high wavelength was observed for NDx. This bathochromic effect of 20 nm probably came from interaction between dimerized coumarin and Nile Red by π -stacking. Indeed, the D chain mobility already observed in UV-study made the establishment of interaction between coumarin moieties and Nile Red easier than heterografted or triblock copolymers. Moreover, the structural similarity between dimerized coumarin and Nile Red can accentuate the electronic resonance.

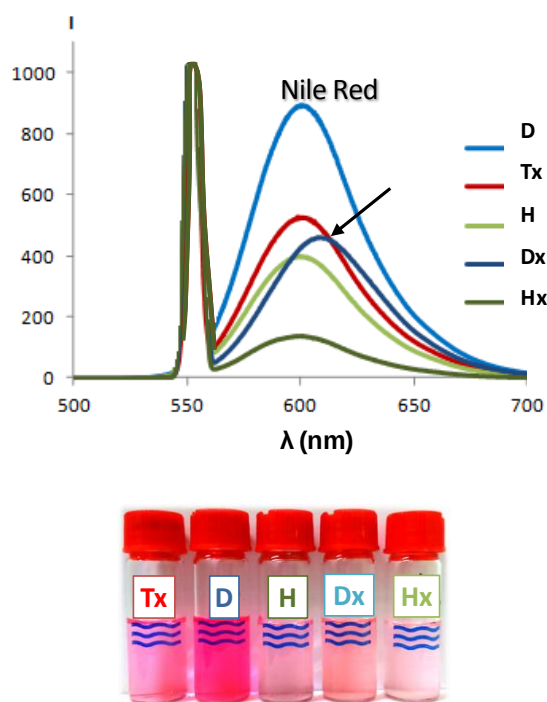


Figure 5-13: Emission spectra of Nile red entrapped into various nanoparticles monitored by fluorescence under $\lambda_{excitation}$ above 552 nm and corresponding suspensions.

For each nanoparticle, from maximal intensity around 600 nm, the loading efficiency (D.L.E.) and the loading capacity (D.L.C.) can be deduced through the previous calibration. The drug loading efficiency (D.L.E.) ranged from 11 to 80%, in relation to the amount of drug initially added (equation 3, supporting information SI5-III) (Table 5-2). The experimental drug loading capacity (D.L.C.), in relation to the amount of copolymer initially introduced (equation 4, supporting information SI5-III), ranged from 1 to 8%. In the literature, a loaded system is considered efficient for a D.L.E. above 50 % and a D.L.C. above 5%. The best D.L.E. and D.L.C. results corresponded to the diblock nanoparticles (80% and 8%) in contrast with the core-crosslinked heterografted nanoparticles (11 and 1%) knowing that theoretical maximal D.L.E. was above 100% and D.L.C. above 10%. The triblock nanoparticles had an intermediate D.L.E. and D.L.C. values. Surprisingly, the crystallization of the T core did not too much hinder the entrapment of Nile Red even if the impact was more perceptible with the D.L.C. (4%). Moreover, a twice decrease of loading rate after the dimerization of linear polymer nanoparticle core occurred while a three times decrease by crosslinking of the nanoparticle core was observed for NH. The photo-dimerization (44% for ND_x instead 80% for ND) or photo-crosslinking (11% for NH_x instead 38% for NH) seemed to expel the loaded Nile Red of the hydrophobic nanoparticle core. Furthermore, the number of coumarin units inside the core, as well as the dimerization and the cross-linking, hinder the entrapment of Nile Red. Thus, triblocks, from their previous dimerization, were the more efficient irradiated and stabilized approach for drug loading. In conclusion, the best amphiphilic copolymer for the entrapment of Nile Red molecule was the amphiphilic diblock copolymers whereas the more studied photo-responsive systems for entrapment were based on heterografted copolymers.

Table 5-2: Drug loading efficiency and capacity of the different nanoparticles.

	%Drug loading efficiency	%Drug loading capacity
ND	80	8
ND _x	44	5
NT	50	4
NH	38	3
NH _x	11	1

Conclusion

This study shown the manifold combinations between UV-illumination and self-assembly to yield photo-active nanoparticles constituted of dimerized or crosslinked core. This study demonstrated the difference of behaviour of amphiphilic block and heterografted copolymers in term of photo-activity, stability of the nanoparticles and the loading of fluorescent molecules. The triblock copolymers T self-organized into stable nanoparticles with an insensitive crystallized core over the temperature and light. The dimerization of coumarin units before polymerization and self-assembly allowed an highly reversible photo-response related to post-dimerization (D into Dx) and post-crosslinking (H into Hx) of nanoparticles. Nevertheless, the core crosslinking (NHx) revealed, as the dimerization of the polymeric chains in pairs (NDx), to slightly improve the stability of the nano-objects over temperature and light during 60 days. Otherwise, the drug loading efficiency and capacity in Nile Red were favoured by the mobility of the core chains and disadvantaged by crystallization, dimerization and cross-linking of the core. This study demonstrated the high opportunity of amphiphilic diblock copolymers to load Nile Red molecules while triblock copolymers offered an interesting solution to stabilize nanoparticles. Finally, the photo-dimerization of linear copolymers in the nanoparticle core seemed to be an alternative way to the photo-crosslinking of grafted copolymers for photo-active nanoparticles.

Acknowledgements

The authors thank the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” and the “Centre National de la Recherche Scientifique” for financial support. They are thankful to Dr. Erwan Oliviero from ICGM technical platform for TEM imaging.

4. Etude complémentaire

Il est connu que les propriétés photo-physiques des molécules photo-sensibles incorporées au sein de chaînes de polymères peuvent être influencées par leur environnement, la polarité du polymère et celle du solvant. Durant l'auto-assemblage, il a été montré que l'agrégation des chaînes de polymères coumarinées modifie l'émission de la coumarine en fluorescence. Ceci permet alors l'estimation de la concentration d'agrégation critique (C.A.C.) des copolymères étudiés par le suivi de l'intensité de la bande d'émission des coumarines en fonction de la concentration.⁷ L'intensité de l'émission de la coumarine augmente linéairement avec l'augmentation de la concentration en polymère jusqu'à un point d'inflexion. A ce point, l'intensité des coumarines augmente abruptement en témoignage de l'agrégation des coumarines. L'émission de fluorescence des unités coumarine présentes au cœur des nanoparticules ND, NT et NH diffère de part la différence de structures mais le suivi de fluorescence en fonction de la concentration en polymère dans l'eau reste possible. Ainsi, les spectres d'émission donnés en annexe (Figure A5-1, 2 et 3) révèlent la présence d'un pic d'émission à 383 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 310$ nm dans l'eau). Aucune espèce photo-chromique, telle que le pyrène habituellement utilisé pour la détermination des C.A.C. par spectrofluorimétrie, n'est rajoutée. Le signal correspond uniquement aux coumarines contenues au sein des chaînes polymères. Pour l'ensemble des trois copolymères, les bandes d'émission de la coumarine ne présentent pas de décalage. La modification de l'environnement des groupes photo-chromiques dans ces trois architectures a donc peu d'influence sur l'émission de fluorescence. A partir des spectres d'émission réalisés à des concentrations variées (Figure A5-1, 2 et 3), l'évolution des intensités maximales des bandes d'émission en fonction de la concentration en polymère sont reportées dans la Figure 5-14.

Comme escompté, un point d'inflexion est observé pour le copolymère D (1500 g.mol^{-1}) aux alentours de $4.10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ ce qui correspond à une concentration de $2.6.10^{-6} \text{ M}$ tandis que pour le tribloc T une relation linéaire semble s'établir entre l'intensité de l'émission et la concentration en polymère. L'absence de détection d'une valeur de CAC peut être expliquée par l'environnement des coumarine préalablement dimérisées qui semble rester inchangé avec l'augmentation de la concentration en polymère, qu'elles soient auto-assemblées ou non. Par ailleurs, le comportement des unités coumarines au sein des architectures hétérogreffées H ($20\,000 \text{ g.mol}^{-1}$) semble plus complexe. Aux faibles concentrations, une légère augmentation de l'intensité de l'émission apparait avant de retrouver un signal d'émission proche de la valeur initiale. Cette première augmentation peut être expliquée par une réorganisation des chaînes

seules en solution avec un regroupement intramoléculaire temporaire des unités coumarine en raison de leur nombre important par chaîne de copolymère. Une importante augmentation de l'émission est ensuite notée à $5.10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ soit $2.5.10^{-6} \text{ M}$ et correspond à la CAC. Comme observé aux faibles concentrations, une faible diminution de l'intensité de l'émission apparaît après l'agrégation et semble correspondre à l'effet d'auto-extinction des unités coumarine.⁷ Au-delà d'un certain niveau de concentration, les fonctions coumarine et les chaînes polymères sont tellement enchevêtrées que leur superposition inhibe le signal d'émission de fluorescence. De plus, même si la différence d'intensité d'émission durant l'auto-assemblage est exaltée dans le cas de H de par le nombre important de coumarines par chaîne (1 ou 2 pour les linéaires *versus* 16 pour les polymères greffés, Tableau 5-1), les valeurs de CAC déterminées pour D et H, possédant le même ratio hydrophile/hydrophobe, sont sensiblement les mêmes.

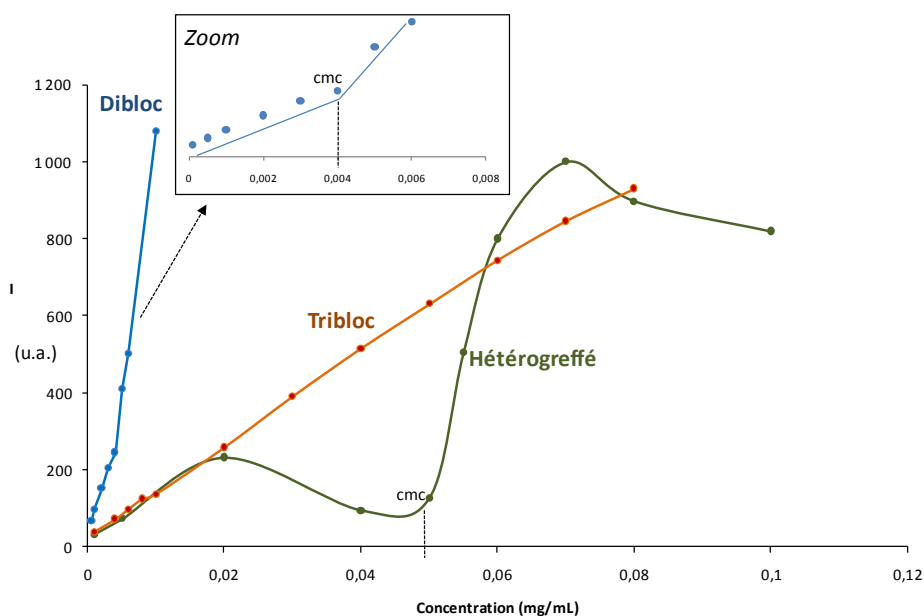


Figure 5-14 : Evolution de l'intensité d'émission en fluorescence avant et après l'agrégation des copolymères amphiphiles.

5. Conclusion

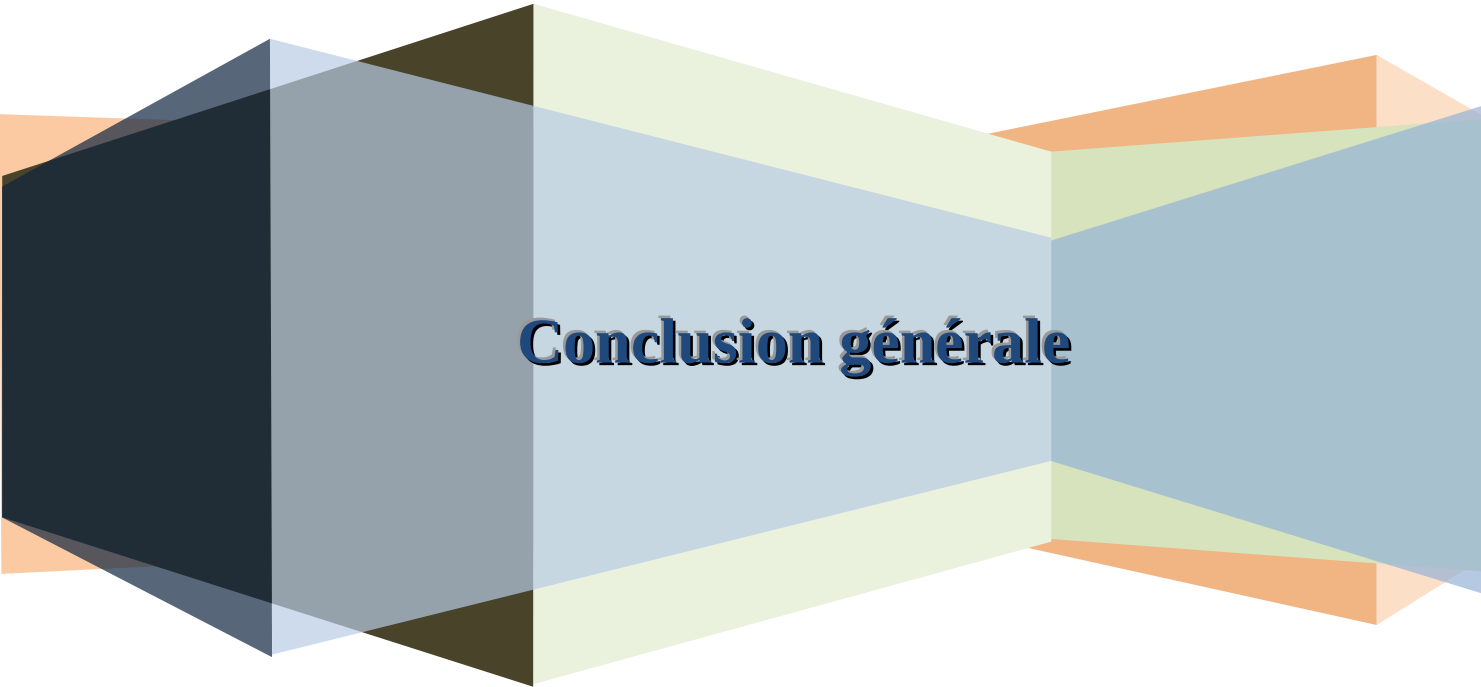
Ce cinquième chapitre constitue, à notre connaissance, la première étude comparative de photo-stabilisation de cœur de nanoparticules. Ces nano-objets sont des auto-assemblages de copolymères amphiphiles d'architectures variées mais de mêmes entités chimiques : polyoxazoline, chaîne alkyle et coumarine. Il est à noter que même si ces copolymères sont de même balance hydrophile/hydrophobe, le nombre d'unités photo-chromiques par chaîne polymère varie selon l'architecture et par conséquent le comportement photo-chimique des nanoparticules varie également.

L'étude de la **photo-réversibilité** des coumarines situées au cœur des nanoparticules a montré que les nanoparticules NT constituées de copolymères triblocs T sont les systèmes les plus réversibles, liés à la cristallisation du cœur qui assure une proximité coumarine-coumarine. Cela est à nuancer par le fait qu'en valeur absolue, le taux de dimérisation le plus élevé est obtenu pour les nanoparticules NH de copolymères greffés H. Dans le cas des copolymères triblocs, la cristallisation du cœur de la nanoparticule induit également une **stabilité** en température et à la lumière qui est supérieure à celle des autres nanoparticules. Notons toutefois l'effet bénéfique de la dimérisation des nanoparticules de copolymères linéaires et, dans une plus grande mesure encore, de la réticulation des nanoparticules de copolymères greffés par rapport aux nanoparticules non irradiées. *A contrario* l'étude de **piégeage du Nile Red** au cœur des nanoparticules a mis en évidence l'effet néfaste de la cristallisation, de la photo-dimérisation et de la photo-réticulation sur la séquestration de molécules hydrophobes. Néanmoins, parmi les nanoparticules irradiées, le copolymère tribloc donne la plus grande D.L.E. révélant un caractère néfaste plus important de la photo-réticulation par rapport à la photo-dimérisation. Le copolymère dibloc D s'est avéré être un copolymère amphiphile extrêmement efficace avec une D.L.C. importante, de l'ordre de 8%.

Références

1. Y. Zhao; *Macromolecules*, **2012**; 45, 3647-3657.
2. J. Jiang, B. Qi, M. Lepage, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2007**; 40, 790-792.
3. Q. Jin, X. Liu, G. Liu, J. Ji; *Polymer*, **2010**; 51, 1311-1319.
4. J. Jiang, Q. Shu, X. Chen, Y. Yang, C. Yi, X. Songet al.M. Chen; *Langmuir*, **2010**; 26, 14247-14254.
5. S. R. Trenor, A. R. Shultz, B. J. Love, T. E. Long; *Chemical Reviews*, **2004**; 104, 3059-3078.
6. J. W. Chung, K. Lee, C. Neikirk, C. M. Nelson, R. D. Priestley; *Small*, **2012**; 8, 1693-1700.
7. H. Chang, Y. Liu, M. Shi, Z. Liu, Z. Liu, J. Jiang; *Colloid and Polymer Science*, **2015**; 293, 823-831.
8. H. He, Y. Ren, Y. Dou, T. Ding, X. Fang, Y. Xu et al.Z. Xie; *RSC Advances*, **2015**; 5, 105880-105888.
9. A. Mustafa, M. Kamel, M. A. Allam; *The Journal of Organic Chemistry*, **1957**; 22, 888-891.
10. Z. Guo, T. Jiao, M. Liu; *Langmuir*, **2007**; 23, 1824-1829.
11. Y. Mai, A. Eisenberg; *Chemical Society Reviews*, **2012**; 41, 5969-5985.
12. C. Travelet, C. Bouilhac, J.-J. Robin, R. Borsali; *Soft Matter*, **2014**; 10, 7545-7557.
13. C. Bouilhac, C. Travelet, A. Graillot, S. Monge, R. Borsali, J.-J. Robin; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 2756-2767.
14. K. M. Zepon, I. Otsuka, C. Bouilhac, E. C. Muniz, V. Soldi, R. Borsali; *Biomacromolecules*, **2015**; 16, 2012-2024.
15. S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, M. Amiji; *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2008**; 126, 187-204.
16. V. P. Torchilin; *Pharm Res*, **2007**; 24, 1-16.
17. C. De Las Heras Alarcon, S. Pennadam, C. Alexander; *Chemical Society Reviews*, **2005**; 34, 276-85.
18. B. Jeong, A. Gutowska; *Trends in Biotechnology*, **2002**; 20, 305-311.
19. C. Ventura, P. Thornton, S. Giordani, A. Heise; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 6318-6324.
20. R. K. O'reilly, C. J. Hawker, K. L. Wooley; *Chemical Society Reviews*, **2006**; 35, 1068-1083.
21. T. Wang, X. Tang, J. Han, Y. Ding, W. Guo, M. Pei; *Macromolecular Bioscience*, **2016**; 16, 774-783.
22. R.-C. Lin, M. G. Mohamed, K.-C. Hsu, J.-Y. Wu, Y.-R. Jheng, S.-W. Kuo; *RSC Advances*, **2016**; 6, 10683-10696.
23. L. Fertier, H. Koleilat, M. Stemmelen, O. Giani, C. Joly-Duhamel, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Progress in Polymer Science*, **2013**; 38, 932-962.
24. G. Kaur, P. Johnston, K. Saito; *Polymer Chemistry*, **2014**; 5, 2171-2186.
25. Y. Zhao; *Journal of Materials Chemistry*, **2009**; 19, 4887-4895.
26. J. Liu, J. Zhou, Y. Luo; *Bioconjugate chemistry*, **2012**; 23, 174-183.
27. G.-Y. Liu, C.-J. Chen, D.-D. Li, S.-S. Wang, J. Ji; *Journal of Materials Chemistry*, **2012**; 22, 16865-16871.
28. K. Iliopoulos, O. Krupka, D. Gindre, M. Sallé; *Journal of the American Chemical Society*, **2010**; 132, 14343-14345.
29. J. He, L. Tremblay, S. Lacelle, Y. Zhao; *Soft Matter*, **2011**; 7, 2380-2386.
30. L. Korchia, C. Bouilhac, V. Lapinte, C. Travelet, R. Borsali, J.-J. Robin; *Polymer Chemistry*, **2015**; 6, 6029-6039.
31. C. Alexis, C. Charnay, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Progress in Organic Coatings*, **2013**; 76, 519-524.
32. T. X. Viegas, M. D. Bentley, J. M. Harris, Z. Fang, K. Yoon, B. Dizmanet al.F. M. Veronese; *Bioconjugate chemistry*, **2011**; 22, 976-986.
33. R. Luxenhofer, Y. Han, A. Schulz, J. Tong, Z. He, A. V. Kabanov, R. Jordan; *Macromolecular Rapid Communications*, **2012**; 33, 1613.

34. C. Travelet, M. Stemmelen, V. Lapinte, F. Dubreuil, J.-J. Robin, R. Borsali; *Journal of Nanoparticle Research*, **2013**; 15, 1-16.
35. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2013**; 51, 1118-1128.
36. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin; *Macromolecular Rapid Communications*, **2012**; 33, 1600-1612.
37. D. Rayeroux, V. Lapinte, P. Lacroix-Desmazes; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2012**; 50, 4589-4593.
38. B. Guillermin, V. Darcos, V. Lapinte, S. Monge, J. Coudane, J.-J. Robin; *Chemical Communications*, **2012**; 48, 2879-2881.
39. Y. Chujo, K. Sada, R. Nomura, A. Naka, T. Saegusa; *Macromolecules*, **1993**; 26, 5611-5614.
40. Y. Chujo, K. Sada, T. Saegusa; *Macromolecules*, **1990**; 23, 2693-2697.
41. M. Obi, S. Y. Morino, K. Ichimura; *Chemistry of Materials*, **1999**; 11, 656-664.
42. J. Babin, M. Lepage, Y. Zhao; *Macromolecules*, **2008**; 41, 1246-1253.
43. E. R. Draper, T. O. McDonald, D. J. Adams; *Chemical Communications*, **2015**; 51, 12827-12830.
44. J. Dai, J.-C. Kim; *Korean Journal of Chemical Engineering*, **2011**; 29, 323-328.



Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail constitue la première étude où les polyoxazolines sont associées à des unités coumarine au sein de diverses architectures de copolymères amphiphiles. Cette association alliant les propriétés des POx (hydrophilie, fonctionnalité, biocompatibilité et furtivité) à celles des coumarines (photo-sensibilité et aptitude à la cristallisation) est propice à la formation de nanoparticules au cœur photo-actif et aux morphologies remarquables. **Trois architectures** variées en terme de composition et de longueur de chaîne ont été élaborées par des voies de synthèse simples et efficaces à partir de trois "*building blocks*" identiques : une entité hydrophile polyoxazoline, une entité photo-sensible coumarine et une chaîne aliphatique hydrophobe. Si les structures linéaires **diblocs** ont conduit à des auto-assemblages **sphériques** dont la taille reste inchangée en fonction de la longueur du bloc polyoxazoline, leurs analogues **triblocs** ont révélé une morphologie **ovale** expliquée par une **cristallisation** induite par les coumarines pré-dimérisées. Les copolymères **hétérogreffés** ont, quant à eux, donné lieu à des nanoparticules **sphériques**, de tailles variables en fonction du nombre de groupements coumarine par chaîne polymère et de la masse molaire du copolymère. Dans le cas particulier des copolymères de masse molaire élevée et de balance hydrophile/hydrophobe 50/50, des **nanofibres hélicoïdales** ont été observées. Leur formation par agrégation cristalline successive de nanoparticules sphériques a été démontrée. Cette nano-structuration à longue distance provient d'un phénomène de cristallisation lié aux interactions POx-coumarine. Outre ses propriétés photo-sensibles, la coumarine agit comme un **agent structurant**, favorisant les interactions avec la POx et par voie de conséquence, la cristallisation des nanoparticules.

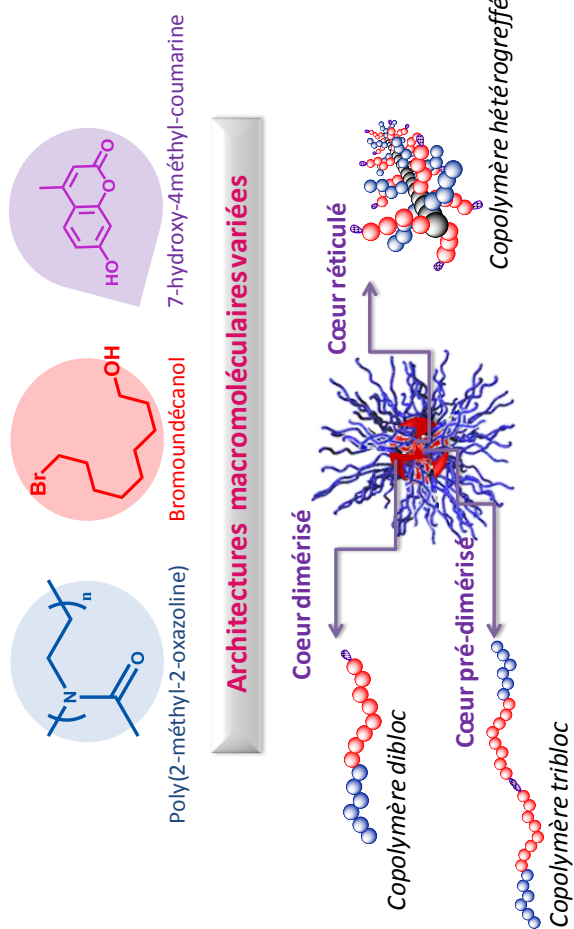
L'étude des différentes nanoparticules a permis de mettre en évidence que le phénomène de photo-dimérisation des coumarines était à la fois fortement dépendant de leur nombre mais surtout de l'architecture au sein de laquelle elles se situent. Ceci se traduit au niveau de l'efficacité et de la réversibilité de la dimérisation. En effet, couramment étudiée dans la littérature, la **photo-réticulation** du cœur de nano-objets obtenus à partir de copolymères greffés ne semble pas pour autant être le système le plus efficace en photo-activation bien qu'il soit plus performant que les copolymères diblocs linéaires **photo-dimérisant** le cœur des nanoparticules et pour lesquels la faible probabilité de rencontre des motifs coumarine et la mobilité des chaînes enchevêtrées semblent limiter la dimérisation et sa réversibilité. En revanche, les copolymères triblocs obtenus par polymérisation de polyoxazolines à partir de

coumarines **pré-photo-dimérisées** se sont avérés être les plus réversibles en atteignant des taux de dimérisation et dé-dimérisation optimaux. Cela s'explique par la cristallisation qui entraîne un positionnement des coumarines pré-dimérisées proches les unes des autres et favorise après dé-dimérisation leur re-cyclisation.

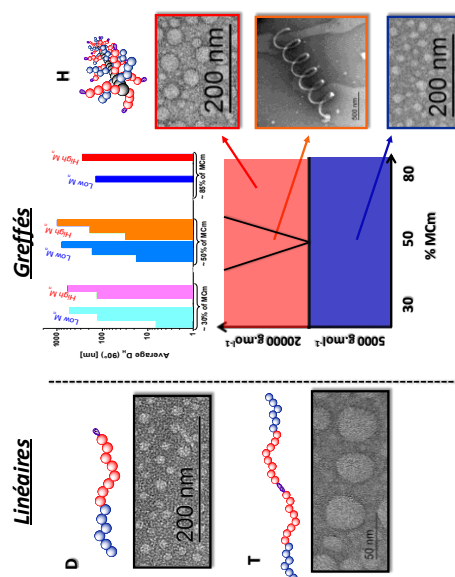
Les nanoparticules de copolymères dibloc (NDx) et hétérogreffé (NHx), **stabilisées** par photo-dimérisation et photo-réticulation du cœur respectivement, se sont révélées peu stables dans le temps notamment sous exposition à la chaleur. Ces dernières sont toutefois plus stables que leurs homologues non irradiées. Après irradiation des nanoparticules, le gain le plus important en terme de stabilité dans le temps, en température ou encore en présence de lumière, que ce soit au niveau de la taille des agrégats comme au niveau du maintien de la dimérisation, concerne les copolymères triblocs (NT). La photo-stimulation des coumarines a donc un réel impact sur la stabilité des objets même si celle-ci dépend de l'architecture du copolymère.

Un autre aspect de l'étude concerne le **piégeage de molécules modèles** au sein des différents types de nanoparticules. Le principe repose sur les interactions privilégiées coumarine-coumarine et coumarine-molécule cible au regard de la similitude structurale entre la coumarine et de nombreux principes actifs polyaromatiques. Ainsi, les nanoparticules issues de l'organisation de copolymères diblocs, plus accessibles car moins enchevêtrées et moins compactes, sont plus aptes à piéger efficacement des molécules de Nile Red. En revanche, leur photo-dimérisation semble provoquer l'expulsion de ces dernières. La même tendance est observée avec les nanoparticules au cœur photo-réticulé obtenues à partir des copolymères hétérogreffés. Les nanoparticules issues de l'agencement de copolymères triblocs se révèlent finalement être le meilleur système photo-stabilisé pour le piégeage de molécules structurellement proches des coumarines avec une capacité de charge relativement élevée.

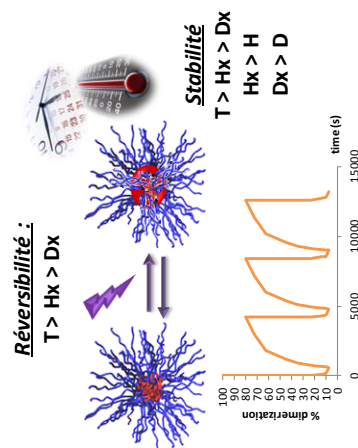
Au bilan, le comportement d'une même réaction photo-chimique réalisée sur des "*building blocks*" identiques mais agencés différemment le long de la chaîne polymère et des nano-objets se révèle très dépendant de l'architecture du copolymère. Il semblerait que même si les copolymères greffés et la photo-réticulation des nanoparticules correspondantes sont largement étudiés dans la littérature, la pré-photo-dimérisation des nanoparticules de copolymères triblocs soit nettement plus attrayante. L'intérêt des copolymères hétérogreffés est ailleurs avec l'accès à des morphologies complexes de nano-objets comme ici l'obtention de super-hélices.



Coumarine: agent de cristallisation



Coumarine: agent de stabilisation



Coumarine : agent de piégeage

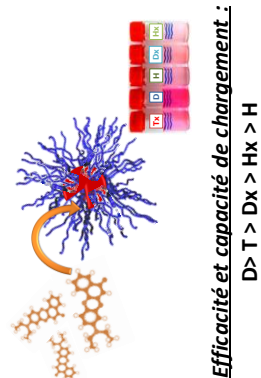
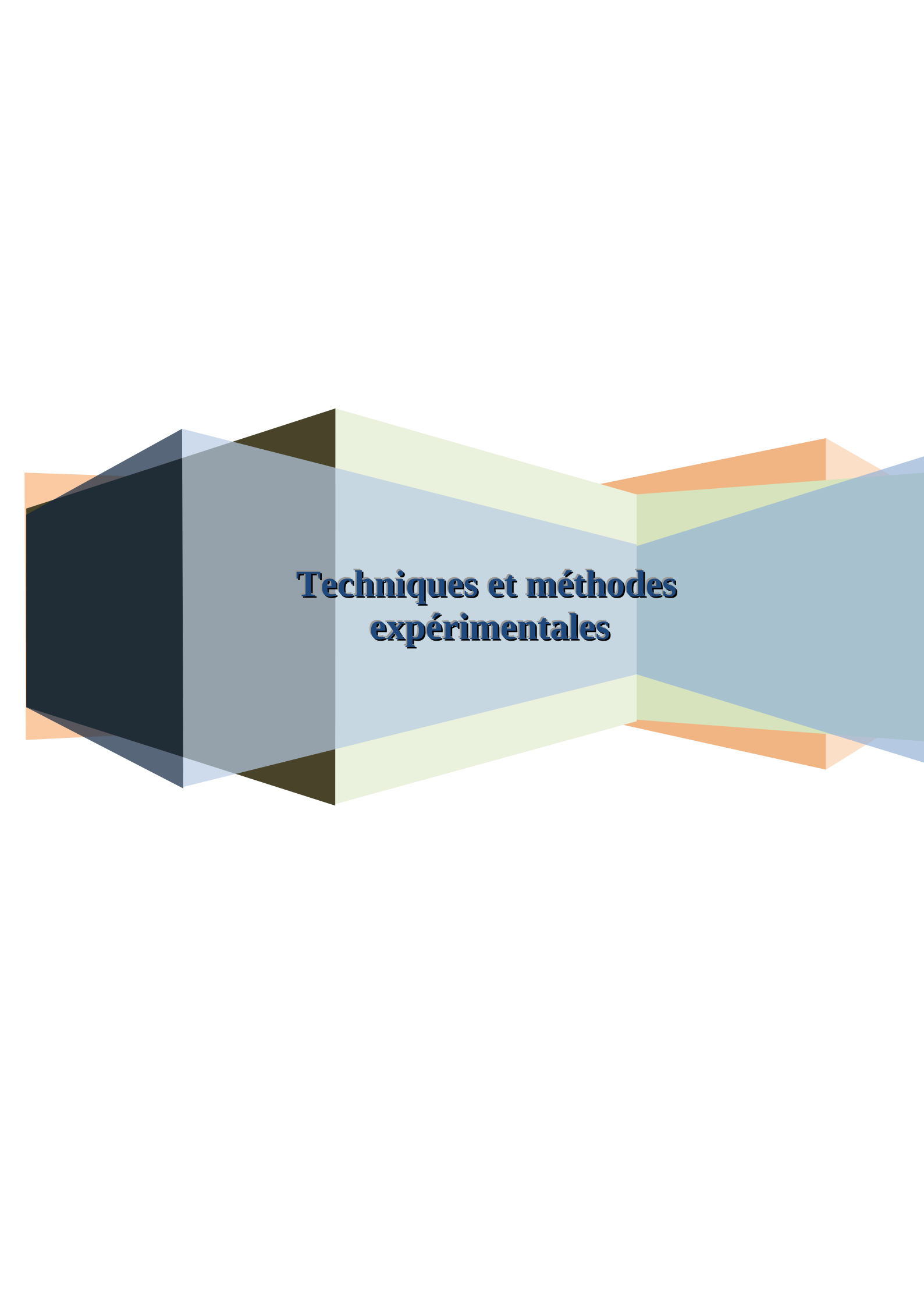


Figure 0-2 : Schéma récapitulatif des chapitres abordés au cours de l'étude.



Techniques et méthodes expérimentales

Techniques et méthodes expérimentales

1. Caractérisation structurale

1.1. Résonnance magnétique nucléaire (RMN ou NMR)

Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés avec un spectromètre Brucker Avance I à 300 MHz muni d'une sonde QNP est équipé d'un logiciel d'acquisition XWIN-NMR 2.1 à 20 °C. Le solvant utilisé est le chloroforme deutéré (CDCl_3). Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) et référencés par rapport au pic du signal du CHCl_3 à 7,26 ppm. Les spectres RMN ^{13}C ont été enregistrés avec le même appareil dans le même solvant. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au pic du signal du CHCl_3 à 77 ppm.

Les spectres RMN ^1H 2D-DOSY ont été enregistrés avec un spectromètre Brucker Avance III à 600 MHz muni d'une sonde QXI avec le logiciel TOPSPIN 3.0 dans de l'eau deutérée (D_2O). Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au pic du signal du H_2O à 4,79 ppm.

1.2. Chromatographie d'exclusion stérique (CES ou SEC)

Les analyses par chromatographie d'exclusion stérique ont été effectuées sur un appareil PL-GPC 50 Plus thermostaté à 50 °C et équipé d'un détecteur réfractomètre différentiel RI, d'une pré-colonne 8 μm PolarGel-M (7.5 $\times$ 50 mm) suivie de deux colonnes 8 μm PolarGel-M columns (7.5 $\times$ 300 mm) et d'un passeur automatique Varian model 410 autosampler. Le DMAc (0,1% LiBr) est utilisé comme éluant avec un débit de 0,8 mL/min. La calibration a été réalisée à partir de standards poly(méthacrylate de méthyle)s (PMMA).

2. Appareillage ondulatoire

2.1. Réacteur micro-onde

Les polymérisations sous micro-ondes ont été réalisées grâce à un réacteur micro-onde Anton Paar Monowave 300 dans des vials en quartz scellés spécialement adaptés au micro-onde simple mode.

2.2. Procédé de photo-irradiation par réacteur UV : Rayonet-RPR200

Les nanoparticules photo-stimulables ont été irradiées sous UV afin de mettre en évidence l'impact de la dimérisation ou de la réticulation du cœur de ces nano-objets en terme de morphologie, de taille et de stabilité. Ces nanoparticules, par les unités coumarine qu'elles contiennent, sont capables de dimériser à une longueur d'onde supérieure à 300 nm mais également de dé-dimériser à une longueur d'onde inférieure à 260 nm. Le procédé d'insolation utilisé prend donc toute son importance à la vue des différences qui peuvent en découler. En effet, parmi les techniques disponibles, trois ont été employées. La première, le banc UV, engendre une irradiation dégradante en raison de la chaleur dégagée et s'avère être limitée en terme de longueurs d'onde disponibles. La seconde, la lampe UV de paillasse, donnant accès aux deux longueurs d'onde souhaitées (300 et 254 nm), ne permet pas une irradiation efficace de part sa faible puissance (6 watts) ce qui entraîne des temps d'irradiation longs pouvant aller de quelques heures pour la dé-dimérisation à une journée pour la dimérisation. Ces temps sont considérablement réduits avec l'utilisation du réacteur UV (Rayonet RPR 200) : quelques minutes pour la dé-dimérisation et de l'ordre de l'heure pour la dimérisation (Figure T-1). De plus, l'irradiation par réacteur UV permet une insolation contrôlée dans le temps, dans l'espace, homogène (agitation magnétique et exposition à 360°), aux longueurs d'onde désirées, à la puissance souhaitée (16 lampes individuelles amovibles de 35 watts) et sans émission de chaleur (système de ventilation, température interne de 35 °C). Les insolutions sont réalisées dans des vials en quartz fermés placés sur un support aimanté rotatif. Ces avantages font de ce dernier système UV le plus efficace. C'est pourquoi il a été exclusivement utilisé lors de cette étude.



Figure T-1 : Réacteur UV RPR-200 utilisé pour les photo-réactions.

2.3. Spectroscopie UV

Les analyses UV-visible ont été réalisées sur un spectromètre Perkin-Elmer Lambda 35 UV/visible équipé d'un système Peltier PTP1+1. Les mesures sont réalisées sur une gamme de longueur d'onde allant de 280 à 400 nm à l'aide de cuves en quartz de 10 mm de chemin optique ont été utilisées afin de suivre la diminution ou l'augmentation de la bande d'absorption de la coumarine à 320 nm lors, respectivement, de la photo-cyclisation ou du photo-clivage.

2.4. Spectroscopie de fluorescence

Les mesures de spectroscopie de fluorescence ont été réalisées sur spectrofluorimètre RF-5301PC Shimadzu sur des cuves en quartz de longueur optique 10 mm. La longueur d'onde d'excitation et la gamme de longueurs d'onde varient en fonction des analyses et des chromophores étudiés que ce soit pour le suivi de dimérisation, l'identification de nanoparticules chargées ou le dosage de Nile Red piégé.

2.5. Diffraction des rayons X (DRX ou WAXS)

Les analyses de diffraction de rayons X ont été effectuées sur un diffractomètre X-pert poudre (plateforme ICGM-AIME) équipé d'un masque de 10 mm de fente de divergence de $1/4^\circ$ et réalisées sur une surface de silicium pour atténuer le signal du bruit de fond. Les diffractogrammes ont été enregistrés sur une gamme de 2θ allant de 5 à 40 rad en 45 min et permettent de remonter à l'identification de systèmes cristallin (semi-cristallin) par la présence de pic de cristallinité, la détermination des distances inter-réticulaires correspondantes par la loi de Bragg et le taux de cristallinité.

3. Analyse et auto-assemblage de copolymères en solution

3.1. Diffusion dynamique de la lumière (DDL ou DLS)

Deux appareils ont été utilisés pour les mesures DLS qui se font toutes à 25 °C. Le premier mono-angle est un Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments muni d'une source laser He-Ne d'une longueur d'onde de 633 nm et d'une puissance de 4 mW où le détecteur se situe à un angle de 173° . Les analyses sont réalisées sur une cuve de 10 mm sur 10 mm. Le second, équipé d'un détecteur multi-angle entre 20° et 150° est un appareil type ALV/CGS-8F S/N

069 (ALV, Langen, Allemagne) équipé d'un laser polarisé rouge Hélium-Néon (JDSU, Milpitas, USA) opérant à une longueur d'onde de 633 nm et une puissance de 35 mW. Celui-ci est associé à un corrélateur digital (ALV/LES-5004) avec un temps d'échantillonnage de 125 ns. Les mesures sont réalisées sur une cuve de 10 mm de diamètre, thermostaté dans un bain de toluène à 25 °C. Les données sont enregistrées sur la durée de l'analyse grâce au logiciel ALV correlator control. La distribution des temps de relaxation est obtenue en utilisant la fonction d'auto-corrélation CONTIN.

3.2. *Protocole de mise en solution*

Des études préliminaires ont été réalisées afin d'optimiser les conditions d'auto-assemblage en milieu aqueux. Comme vu dans l'étude précédente, il existe plusieurs voies de mise en solution et plusieurs paramètres peuvent influencer la taille et la morphologie des nano-objets (la concentration, la température et la méthode d'agitation (durée, vitesse, méthode d'agitation : vortex, sonication, ultraturax...). Un balayage de ces paramètres a permis de mettre au point les conditions optimales pour l'auto-assemblage des copolymères. Le premier paramètre essentiel est le solvant utilisé. Le comportement en solution des copolymères diffère selon la polarité du solvant employé. L'utilisation d'un solvant fortement polaire tel que l'eau engendre une affinité accrue entre les blocs hydrophiles POx et le solvant tandis que les blocs hydrophobes aliphatiques tendront à limiter leur interaction avec le solvant en minimisant l'interface polymère/solvant. De ce fait, en solution aqueuse, les chaînes s'auto-assemblent spontanément en nano-objets au cœur hydrophobe et à la couronne hydrophile. En se rassemblant au cœur de l'objet, les blocs hydrophobes entraînent avec eux les groupements photo-sensibles coumarine formant ainsi des nano-objets au cœur photo-dimérisable ou photo-réticulable par stimulation UV. Dans un deuxième temps, l'influence de la concentration, la vitesse et le temps d'agitation sur la taille des objets a été évaluée. Ici ils n'ont que peu d'influence. L'auto-assemblage des copolymères a été réalisé à une concentration de 4 mg/mL ou de 1 mg/mL, selon le copolymère étudié, par agitation mécanique sur plaque magnétique à une vitesse de 500 rpm à température ambiante. L'augmentation de la température tend à augmenter leur taille (cf chapitre 5) et une agitation mécanique trop intense ou trop rapide tend à déstabiliser les systèmes organisés en chaînes unimères (ultraturax, sonication).

3.2a) Dissolution directe

Dans ce cas, le copolymère est dissout dans de l'eau (eau Mili-Q caractérisée par une résistivité de 18.2 mΩ) à 4 mg/mL. La solution est laissée sous agitation durant une nuit (septum). La solution est ensuite filtrée sur filtre PTFE 0.45 et 0.1 μm (provenant de Milipore et Whatman, respectivement). Avant l'analyse DLS, la cuve est laissée reposée 1h au sein de l'appareil (Figure T-2).

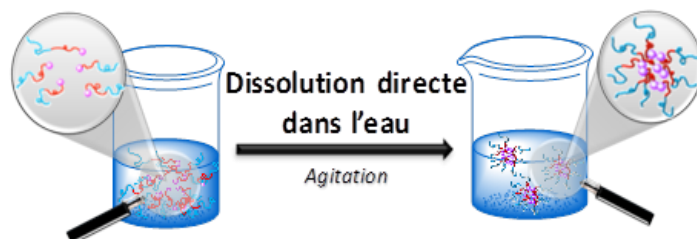


Figure T-2 : Protocole de mise en solution par dissolution directe

3.2b) Méthode des co-solvants

Notamment employée pour les copolymères hétérogreffés, par cette voie, les copolymères sont tout d'abord dissouts dans l'acétone pure (99%) à 1 mg/mL et placés sous agitation durant une nuit. La solution est ensuite filtrée sur filtre PTFE hydrophile 0.2 μm. 1 mL de cette solution est ensuite ajouté goutte-à-goutte dans 1 mL d'eau Milli-Q grâce à un pousse seringue au débit fixé à 0.254 cm³/h. 4 mL d'eau sont alors ajoutés et la solution est laissée sous agitation durant 2 h. Le solvant organique est ensuite évaporé et la solution aqueuse obtenue est à nouveau laissée sous agitation durant une nuit.

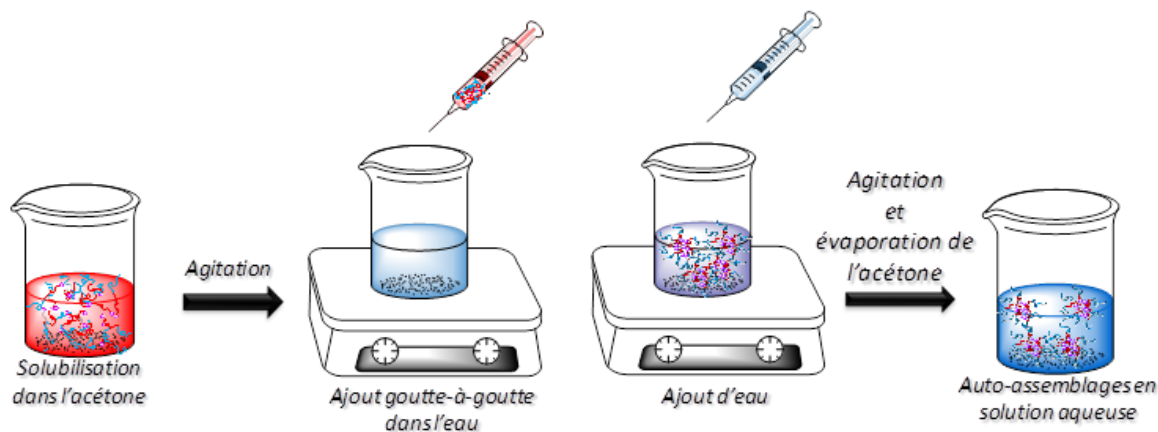


Figure T-3 : Protocole de mise en solution par la méthode des co-solvants

3.3. Détermination des CAC

Les concentrations d'agrégation critique ont été déterminées par spectroscopie de fluorescence. Pour cela, les intensités maximales de la bande d'émission de la coumarine à 340 nm sont relevées pour une gamme de concentration établie en fonction du minimum et du maximum de détection du signal visible et non saturé. Le spectre d'émission est obtenu à une longueur d'onde d'excitation de 310 nm sur un domaine allant de 300 à 700 nm. Les courbes représentant l'évolution de ces intensités en fonction des concentrations permettent de remonter aux C.A.C.

4. Imagerie

4.1. Microscopie électronique à transmission (MET ou TEM)

4.1a. Appareillage

Les analyses TEM sont réalisées sur microscope haute résolution JEOL, JEM-2200FS opérant à 200 kV. Les grilles d'analyse sur lesquelles sont déposés les échantillons à observer sont des grilles comportant 300 mailles de cuivre à film carbone.

4.1b. Préparation des échantillons

Une goutte de 10 μ L de la solution de copolymère à analyser est déposée sur la grille TEM. Au bout de 30 s l'excédant de la goutte est éliminé à l'aide d'un papier filtre puis la surface de la grille à colorer est déposée sur une goutte de 10 μ L d'une solution aqueuse d'acétate d'uranyle (4%). Au bout de 30 s, l'excédant de la solution de coloration est éliminé à l'aide d'un papier filtre.

4.2. Microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM)

Les microscopies SEM ont été réalisées avec un appareil haute résolution Hitachi S4800 (1 nm à 15 kV) sur des grilles TEM placées sur un support adapté. Le mode transmission a été nécessaire pour une observation optimale. C'est pour cela que les microscopies réalisées ici sont majoritairement réalisées par TEM.

4.3. Microscopie à force atomique (AFM)

Les mesures AFM ont été réalisées sur un appareil Innova de chez Brucker. Les échantillons sont déposés sur des wafers de silicium préalablement traités à l'eau (Milli-Q), à l'acétone et aux vapeurs d'acide nitrique durant 2 h puis rincés à l'eau et à l'acétone. 50 μL de la solution à analyser sont déposés sur la surface de silicium et séchés durant 4 jours dans un dessiccateur sous vide statique en présence de gel de silice. Les mesures sont réalisées en mode "*tapping*" à l'aide d'une pointe en silicone avec force constante de 42 N.m^{-1} et une fréquence de résonance approximative de 190 kHz. Les images de topographie sont obtenues avec une résolution de 512×512 points de collecte grâce au logiciel "Gwyddion open source software".

5. Annalyse thermique

5.1. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les analyses DSC ont été effectuées sur un appareil Mettler Toledo Star1. Les mesures sont réalisées dans une capsule trouée en aluminium placée sur la cellule de mesure et une seconde capsule vide sert de référence. Les analyses sont réalisées en mode dynamique avec une rampe de température allant de -40 à 140°C à une vitesse de 10°C/min .

6. Etude de vieillissement

6.1. Stabilité des nanoparticules

L'étude de vieillissement portant sur la stabilité des nanoparticules a été réalisée par suivi DLS. Les solutions de copolymère à 1 mg/mL , obtenues selon par mise en solution par dissolution directe dans l'eau et filtrées puis irradiées ou non sont, avant vieillissement, analysées par DLS. Les distributions obtenues constituent le t_0 . Ensuite, les solutions irradiées et non irradiées sont conservées au sein de cuves scellées adaptées à l'analyse contenant chacune $0,8 \text{ mL}$ de solution (maximum imposé par l'analyse) durant 60 jours :

- dans l'obscurité à 20°C (vieillissement naturel),

-à la lumière du jour à température ambiante,

-à la chaleur dans l'obscurité au sein de deux enceintes thermostatées à 37 et 60 °C.

Les cuves contenant les solutions sont analysées par DLS à différents instants : 1, 2, 4, 7, 15, 21, 30 et 60 jours. Pour une meilleure visibilité, les courbes d'évolution des tailles au cours du vieillissement ne retranscrivent que les agrégats majoritaires.

6.2. Stabilité de la photo-dimérisation

De la même façon, la stabilité de la dimérisation est soumise aux mêmes conditions de vieillissement durant le même laps de temps. La concentration est déterminée en fonction du seuil de détection de la bande d'absorbance de la coumarine. Les solutions irradiées sont analysées par spectroscopie UV tout au long du vieillissement afin de suivre l'évolution de la bande d'absorption de la coumarine à 320 nm. Celle-ci atteint une valeur minimale au maximum de dimérisation (valeur de t_0). Sa déstabilisation par dé-dimérisation est visible par une augmentation de la valeur d'absorbance UV. Les concentrations devant être maintenues constantes pour éviter toute mesure faussée, les solutions à analyser (1,5 mL) sont contenues dans des cuves en quartz scellées durant toute la durée du vieillissement et analysées au sein même de ces cuves.

7. Encapsulation du Nile Red

7.1. Identification des nanoparticules chargées

Le piégeage du Nile Red au sein des nanoparticules de copolymères est effectué par dissolution directe et simultanée des copolymères (1 mg/mL) et du Nile Red (0,1 mg/mL) dans l'eau (Mili-Q) à température ambiante et sous agitation magnétique à 500 rpm durant 24 h. Les nanoparticules devant être stabilisées sont ensuite irradiées au sein du reacteur Rayonet RPR 200 dans des vials en quartz durant 1 h sous 350 nm. L'évaluation du taux de piégeage est obtenu par le dosage du Nile Red chargé. Pour cela, les nanoparticules chargées doivent être isolées du Nile non piégé contenu dans les solutions. Ces dernières sont donc éluées à travers une colonne chromatographique (SEC) PD-10 composée d'une phase stationnaire de Sephadex G25 medium (billes de Dextran réticulées) en utilisant l'eau milli-Q comme éluant. Le débit d'élution est contrôlé grâce par une pompe péristaltique (Ismatec, VWR) et régulé à 1

mL/min. 30 fractions de 1,5 mL sont alors récupérées au fur et à mesure de l'élution. Au cours de l'élution, les composants de la solution sont séparés en fonction de leur taille, ainsi, les micelles chargées sont éluées plus rapidement que les copolymères non assemblés et le Nile Red non piégé. Afin d'identifier les fractions contenant les nanoparticules chargées, celles-ci sont analysées par DLS et par fluorimétrie. Les fractions contenant les nanoparticules à isoler révèlent la présence de nano-objets aux tailles inchangées par rapport à celles non chargées. La fluorimétrie révèle la présence des coumarines et du Nile Red pour les fractions contenant les nanoparticules chargées. En effet, le Nile Red étant insoluble dans l'eau, il n'est détectable par fluorimétrie que s'il est piégé au sein des nanoparticules. Les graphes de suivi des éluions montrent l'évolution de l'intensité des nanoparticules aux tailles observées ainsi que les intensités d'émission de la coumarine et du Nile Red selon les différentes fractions éluées (SI5-III et Figure 5-12). Ainsi, il est possible de regrouper celles contenant uniquement le Nile Red piégé.

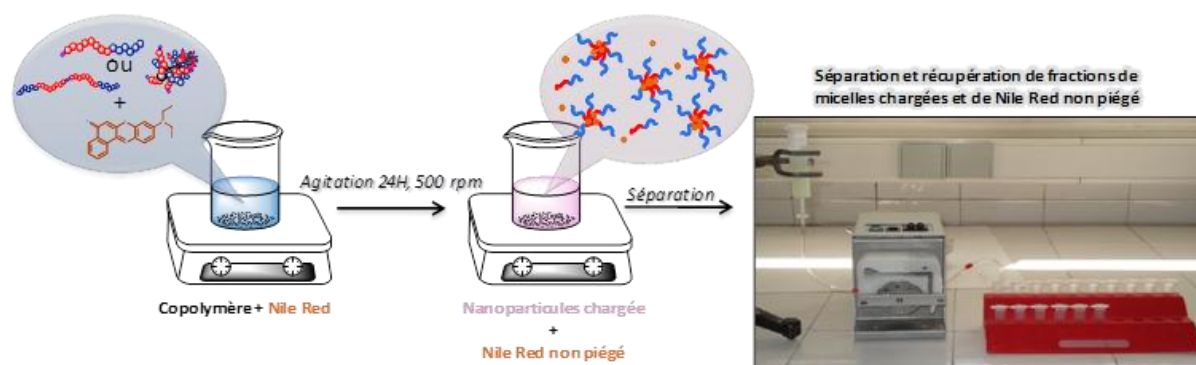


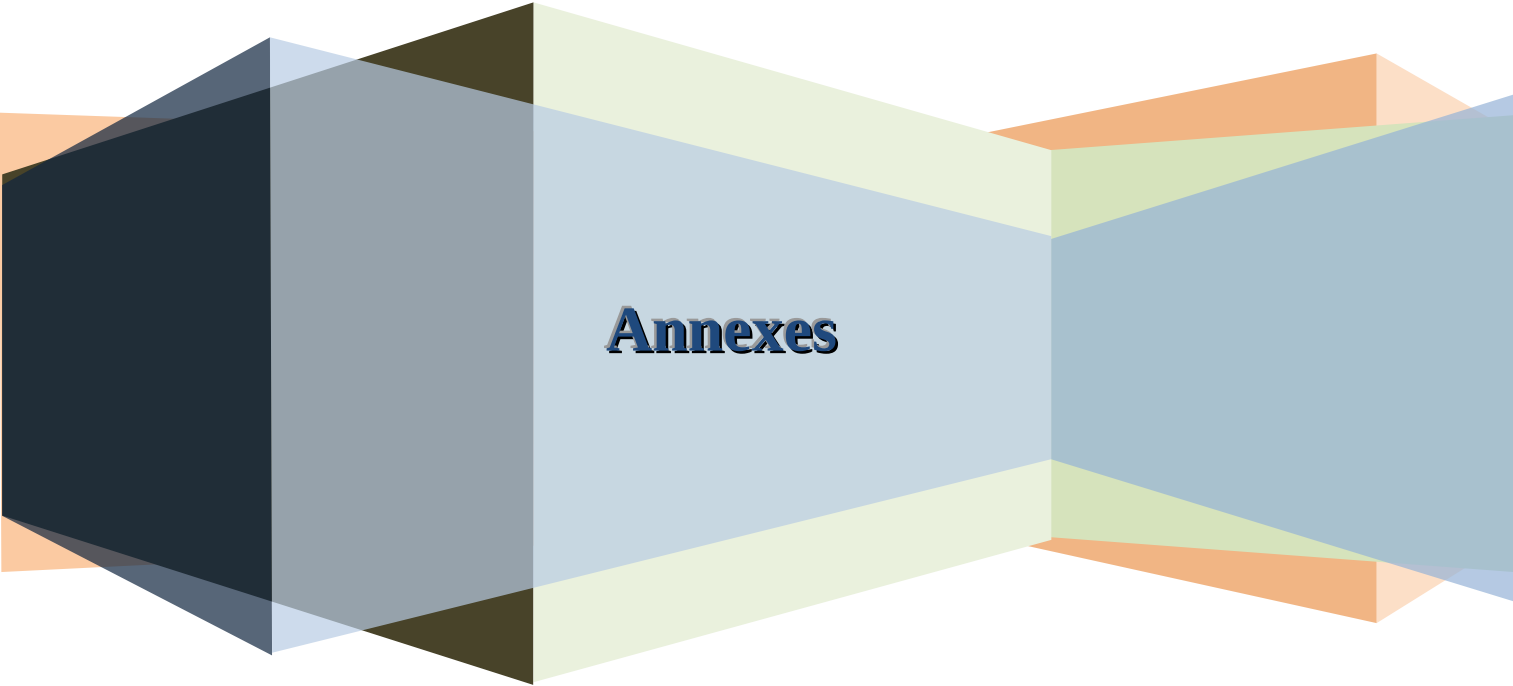
Figure T-4 : Procédé de piégeage du Nile Red et séparation des solutions en fractions pour l'identification des nanoparticules chargées.

7.2. Calibration du Nile Red

Pour doser efficacement le Nile Red piégé au sein des nanoparticules chargées, il est nécessaire d'établir au préalable une courbe de calibration de ce dernier. Le Nile Red étant un fluorophore hydrophobe sa calibration est réalisée dans l'acétone. L'établissement d'une courbe de calibration reportant l'intensité d'émission du Nile Red en fonction de la concentration est obtenue par spectrofluorimétrie. La gamme de concentration varie de 1.10^{-6} à 5.10^{-6} mg/mL. Celles-ci sont choisies selon les seuils de détection minimal et maximal de l'appareil pour obtenir la meilleure résolution possible. Les mesures sont réalisées sur une plage de longueur d'onde allant de 500 à 700 nm avec une longueur d'onde d'excitation de 552 nm.

7.3 *Dosage du Nile Red encapsulé*

Les fractions contenant le Nile Red piégé au sein des nanoparticules étant regroupées, il est possible de doser la quantité de Nile Red chargé. Pour cela, les fractions aqueuses sont regroupées et lyophilisées puis redissoutes dans l'acétone (20 mL). Afin de rester dans la limite de détection de l'appareil très sensible au Nile Red dans l'acétone, 10 μ L de cette solution sont prélevés et dilués dans 10 mL puis analysés. Comme vu avec la courbe de calibration, le maximum de détection du Nile Red est atteint pour une concentration de $5 \cdot 10^{-6}$ mg/mL, valeur obtenue pour les 0,1 mg de Nile Red initialement introduits par ce procédé de dilution. Les intensités d'émission alors mesurées pour chaque solution sont reportées sur la courbe de calibration afin d'en déduire le taux de charge de chacune d'elles (Figure SI5-9 et Figure 5-13).



Annexes

Annexes chapitre 3

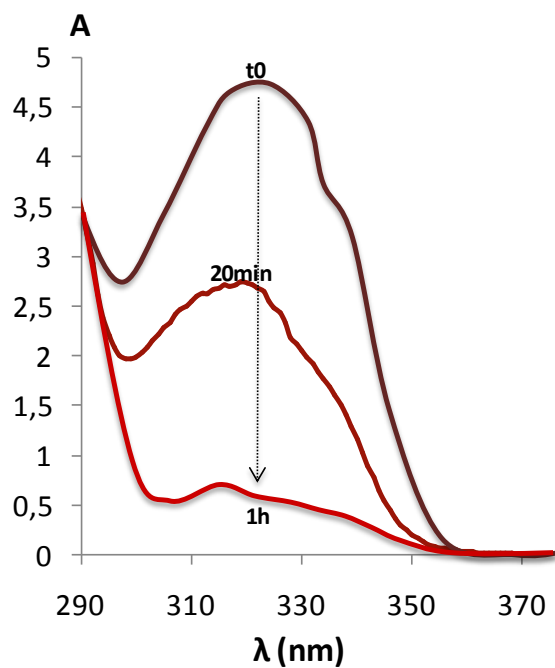


Figure SI3-1. Photo-dimerization of CmTs into CmTs₂ monitored by UV-spectroscopy.

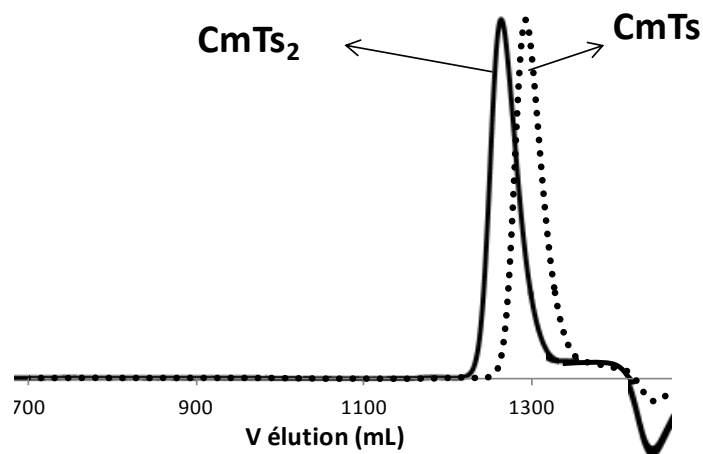


Figure SI3-2. GPC traces of CmTs and CmTs₂ initiators performed into DMAc.

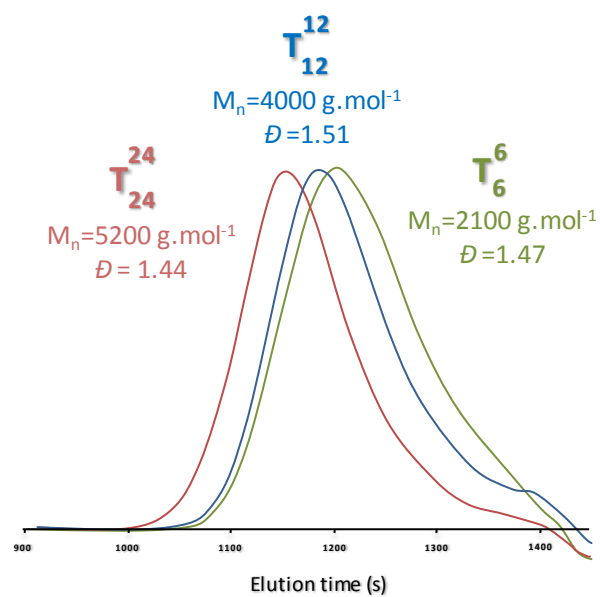


Figure SI3-3. SEC traces of T_6 , T_{12} and T_{24} in DMAc.

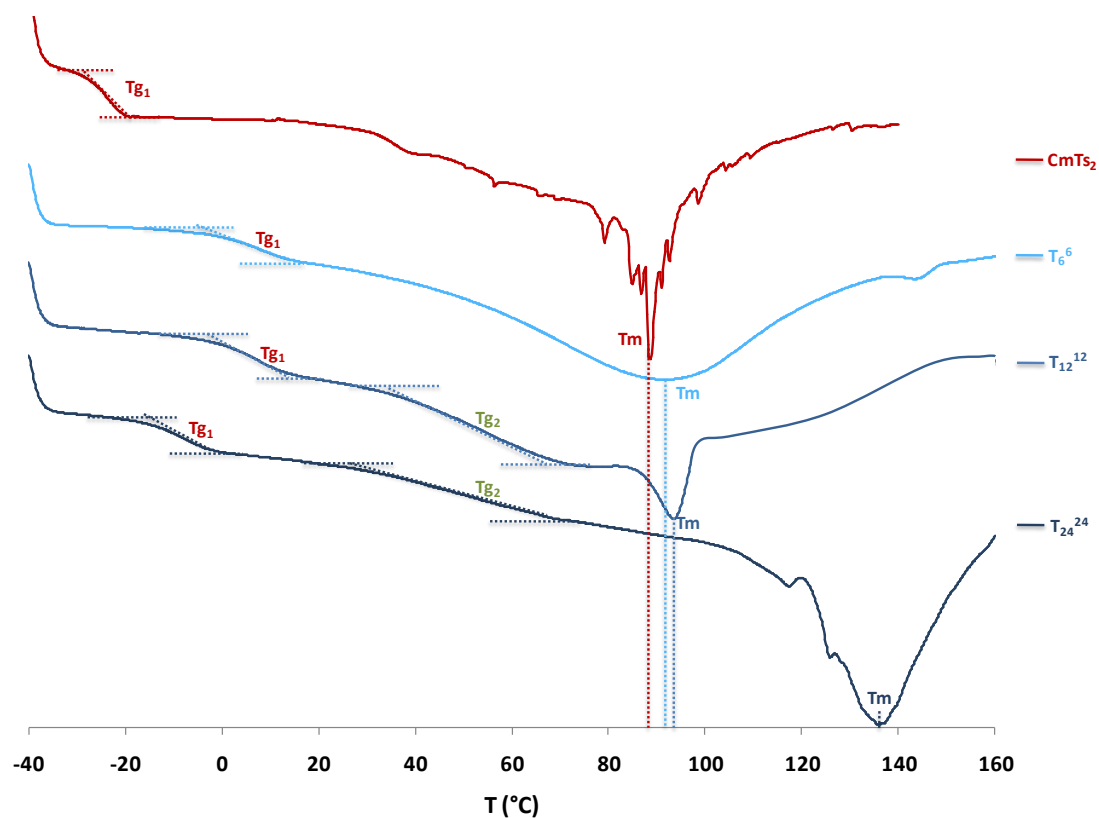


Figure SI3-4. Thermal analyses of CmTs_2 , T_6 , T_{12} and T_{24} by DSC (1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, under nitrogen atmosphere).

Annexes chapitre 4

A4.a. Supporting information : Single stranded superhelices (SI4)

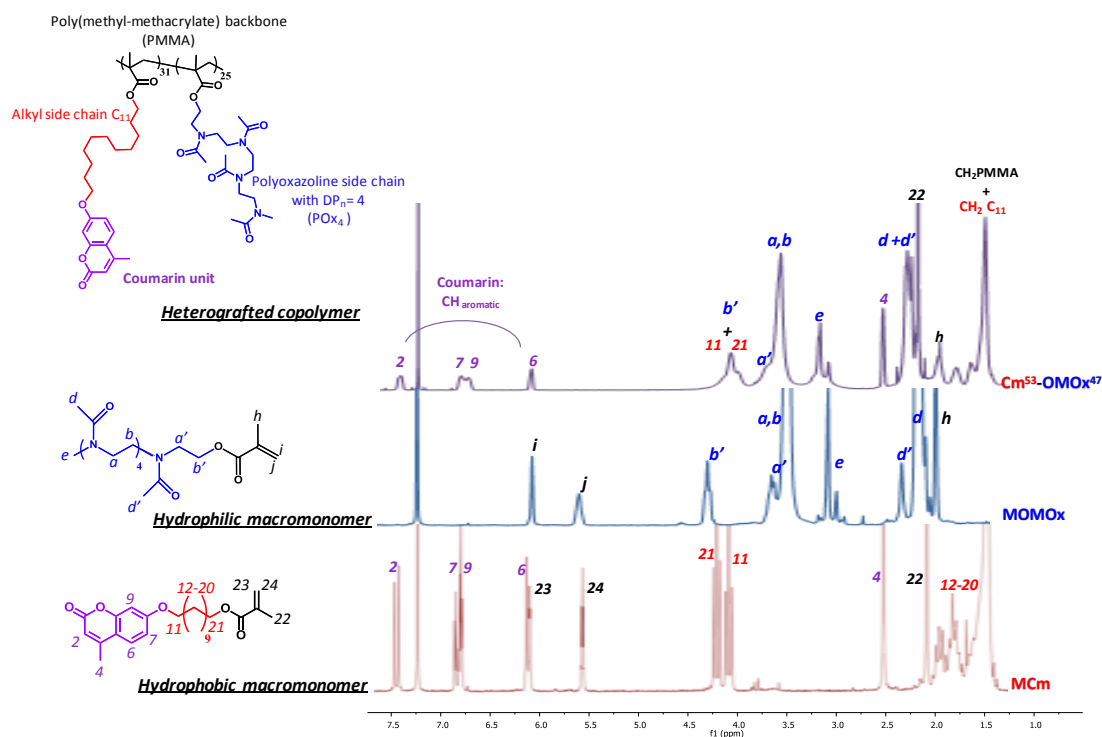


Figure SI4-1. ^1H NMR spectra of MOMOx, MCm and the resulting Cm-s-OMOX.

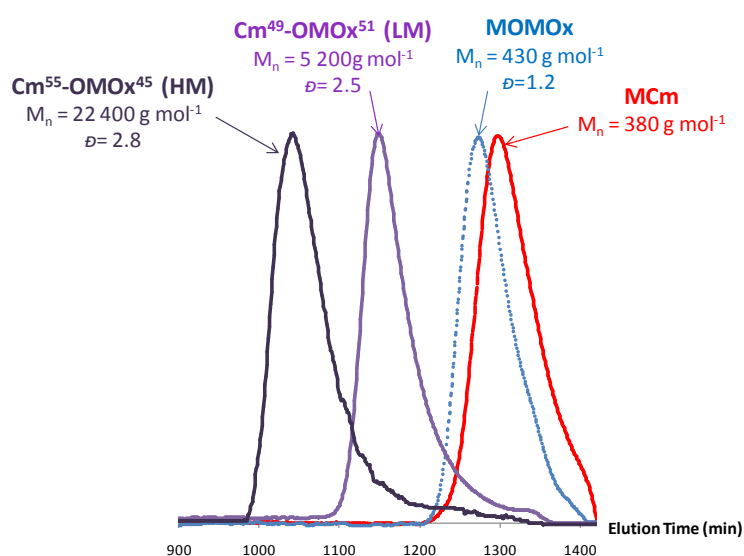


Figure SI4-2. GPC traces of MCm and MOMOx precursors and the resulting Cm-s-OMOX.

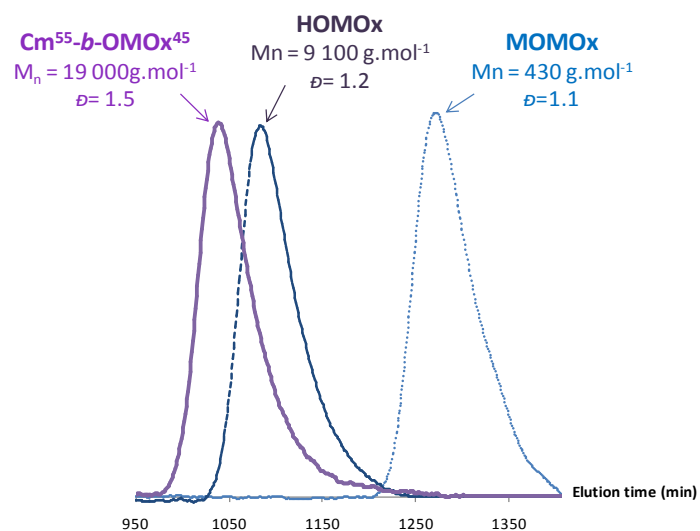


Figure SI4-3. GPC traces of MOMOx and HOMOx precursors and the resulting Cm-*b*-OMOx.

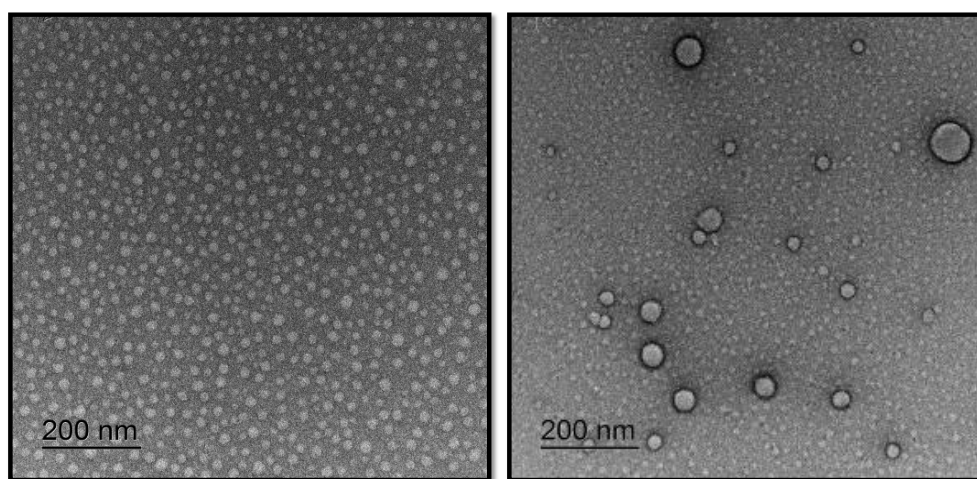


Figure SI4-5. Spherical nanoparticles of Cm-s-OMOX (left) and Cm-*b*-OMOX (right) by HR-TEM obtained by inverse nanoprecipitation.

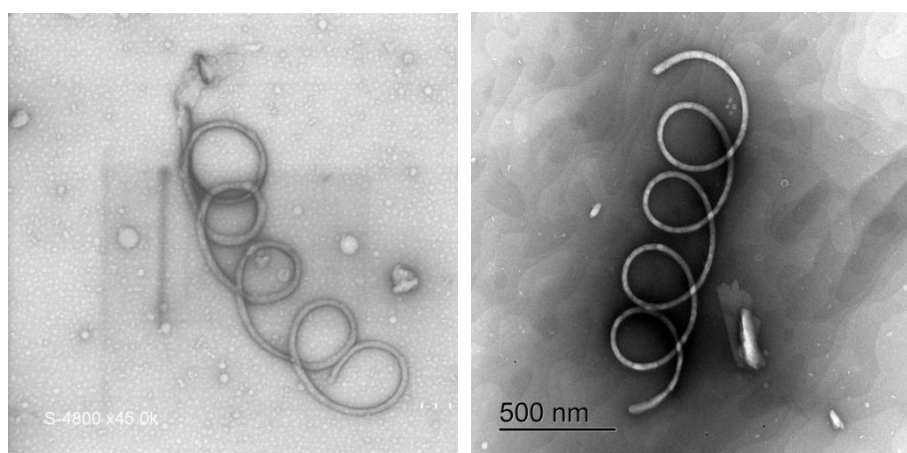


Figure SI4-6. SEM images in transmission mode of superhelix.

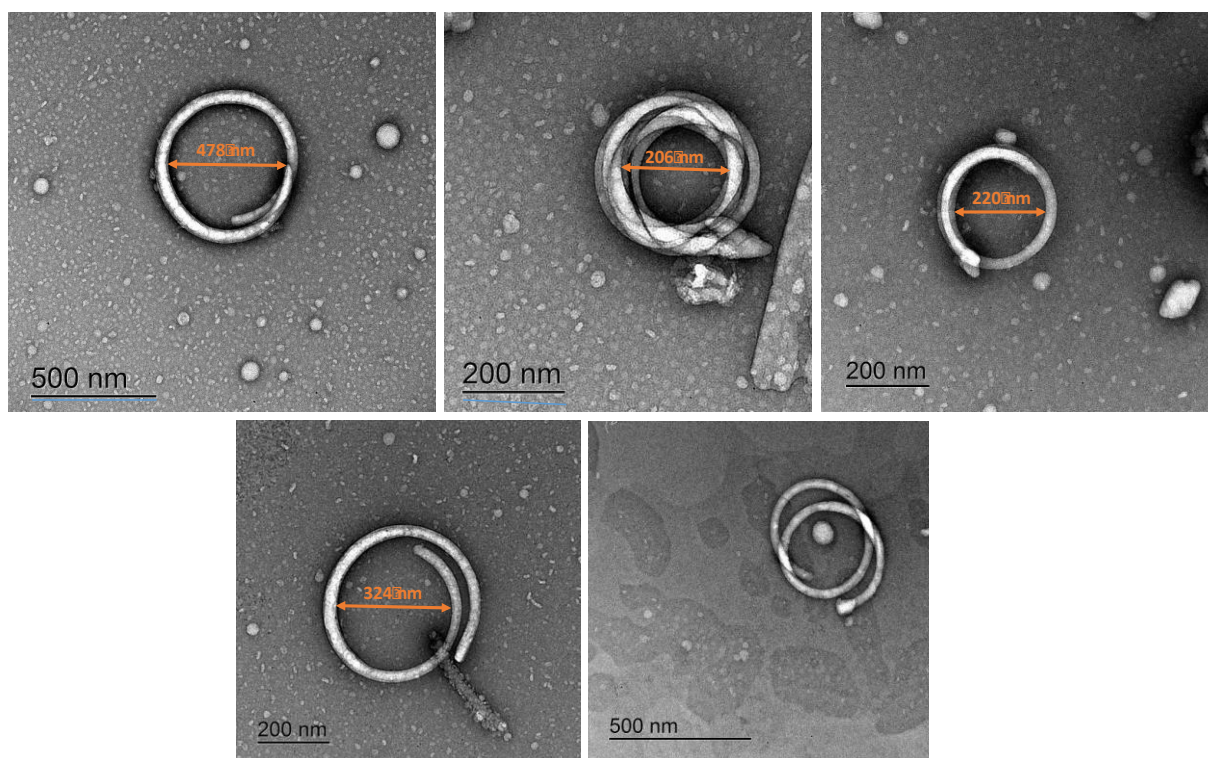


Figure SI4-7.HR-TEM images illustrating the difference between the helix width.

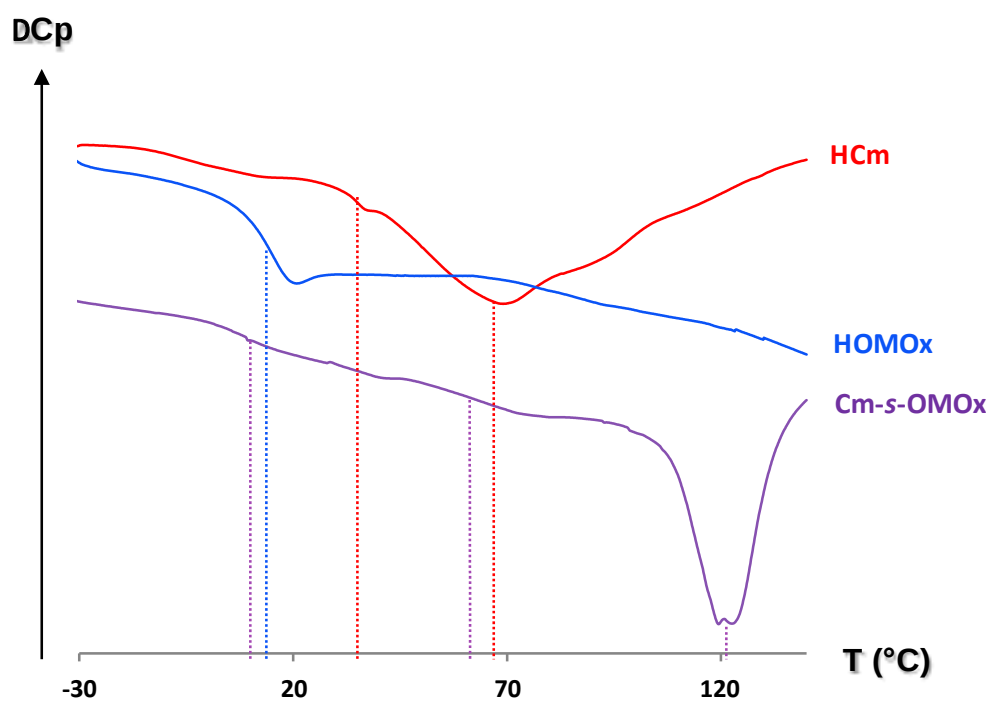


Figure SI4-8. DSC thermograms of HcM, HOMOx and Cm-s-OMOX.

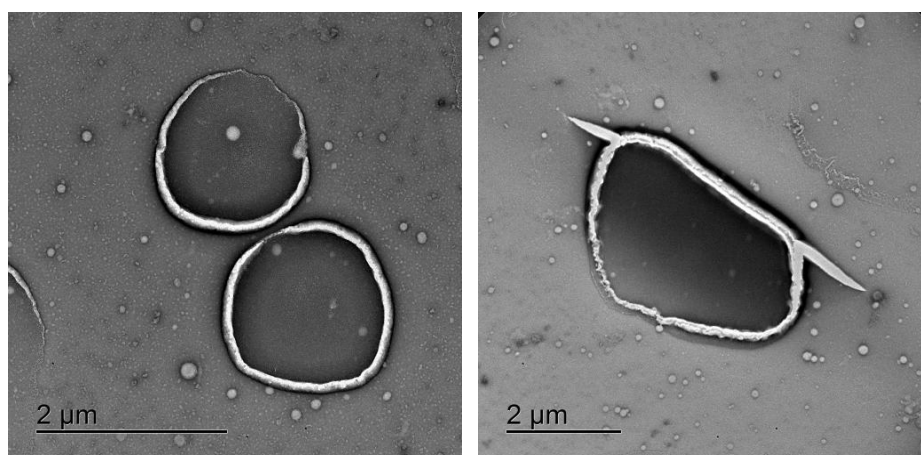


Figure SI4-9. Other HR-TEM images of nenuphars.

A4.b. Résultats complémentaires

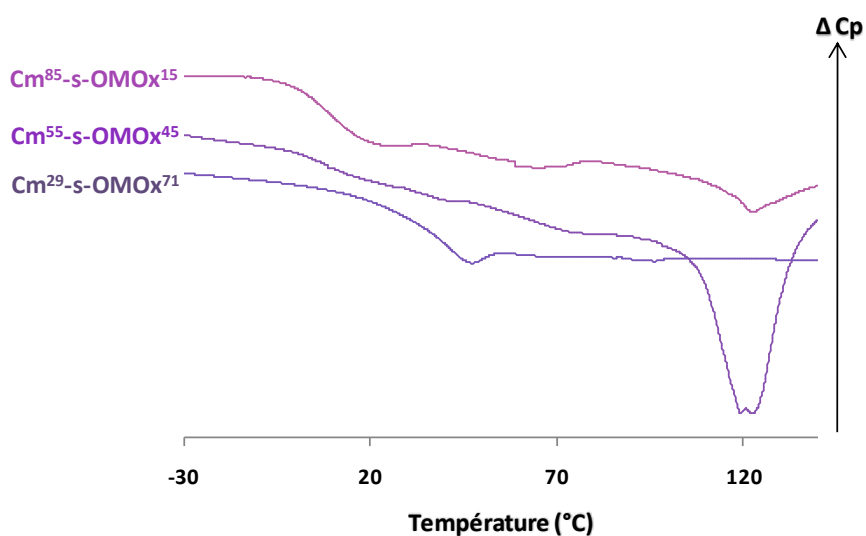


Figure A4-1. Thermogrammes DSC des copolymères statistiques Cm-s-OMOX aux 3 rapports hydrophile/hydrophobe.

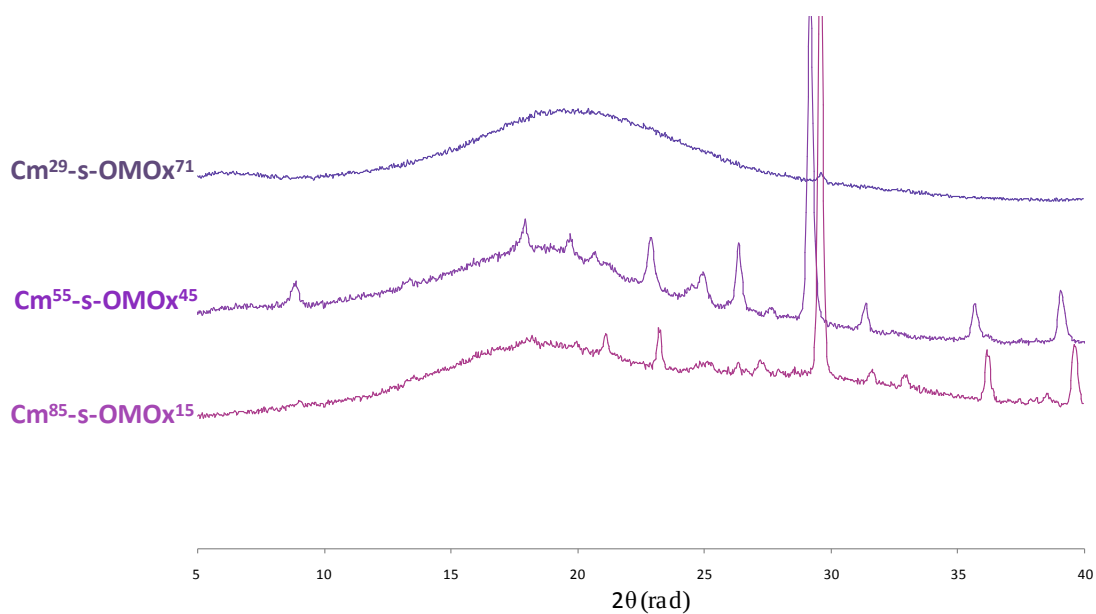


Figure A4-2. Spectres DRX des copolymères statistiques Cm-s-OMOX aux 3 rapports hydrophile/hydrophobe.

Annexes chapitre 5

A5.1. Supporting information (SI5)

SI5-I. Quantification of photo-dimerization and photo-crosslinking efficiency and reversibility for both D, H and T systems from absorption coumarin band decrease and increase according to cycloaddition and cleavage respectively monitored by UV-vis spectroscopy

Dimerization/de-dimerization rates at each times of irradiation are estimated from maximal absorbance measured for each ones. Concerning D and H, assuming that the initial absorption band corresponds to total de-dimerized form (single unimers), the maximal absorption band at t_0 ($A(t_0)$) is estimated at 100% of de-dimerization, in other terms 0% of dimerization. Other rates, where absorption band $A(t)$ going to decrease with the irradiation at 350 nm (dimerization) are thus deduced from these values (dimerization(t)).

Calculation of dimerization/de-dimerization rates:

$$\text{Dimerization (t)} = 100 - \frac{A(t) \times 100}{A(t_0)} (\%) \quad (\text{equation 1})$$

$$\text{De-dimerization (t)} = \frac{A(t) \times 100}{A(t_0)} (\%) \quad (\text{equation 2})$$

Concerning T, the initial approximation is reverse. Initial chains are already dimerized and absorption band corresponds to the minimal value of dimerization which continues to grow under irradiation at 254 nm (de-dimerization). In previous works, we estimated (by NMR and UV-vis spectroscopy) this rate of dimerization is above 97% (3% are de-dimerized) which corresponds to the initial absorbance value ($A(t_0)$).

Calculation of dimerization/de-dimerization rates for T:

$$\text{De-dimerization (t)} = 100 - \frac{A(t) \times 3}{A(t_0)} (\%) = \text{Dd(max)}$$

$$\text{Dimerization (t)} = 100 - \frac{A(t) \times \text{ddmax}}{A(\text{ddmax})} (\%)$$

SI5-II. Aging study of ND, NDx, NH, NHx and NT nanoparticles by DLS during 60 days in the dark at room temperature (20 °C), under natural light exposure at room temperature and heating at 37 °C.

Aging study monitored by DLS during 60 days

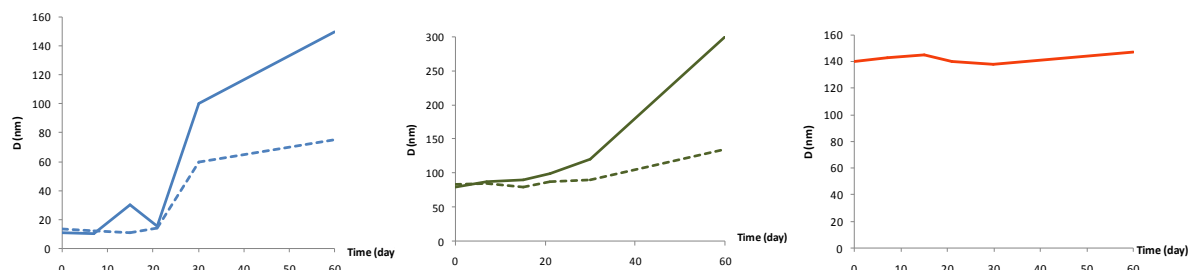


Figure SI5-1. Size distribution evolution during the 60 days of the aging study for D (left), H (middle) and T (right) at 60°C

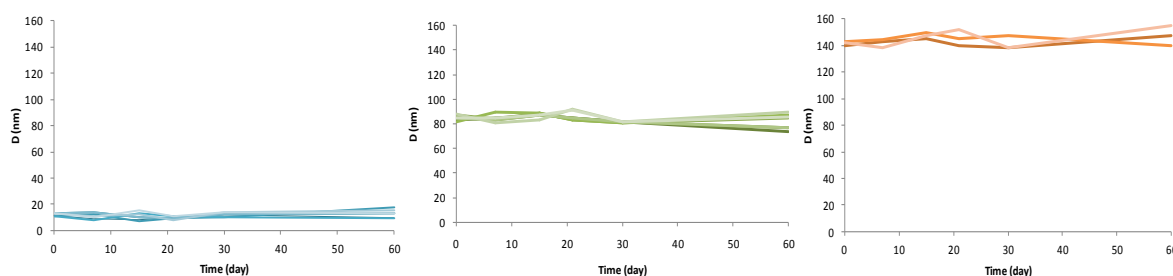


Figure SI5-2. Size distribution evolution during 60 days for D (left), H (middle) and T (right) at room temperature (20 °C), under natural light exposure at room temperature and heating at 37 °C.

SI5-III. Nile Red loading study realized on ND, NDx, NH, NHx and NT

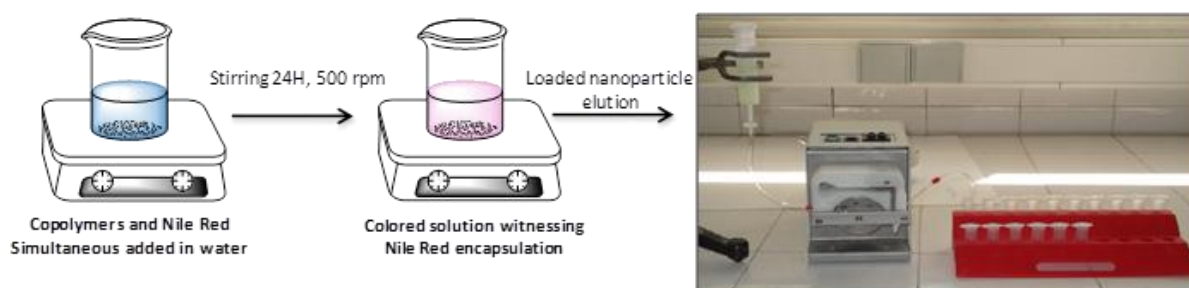


Figure SI5-3. Illustration of loading processing and loaded nanoparticles elution through a peristaltic pump.

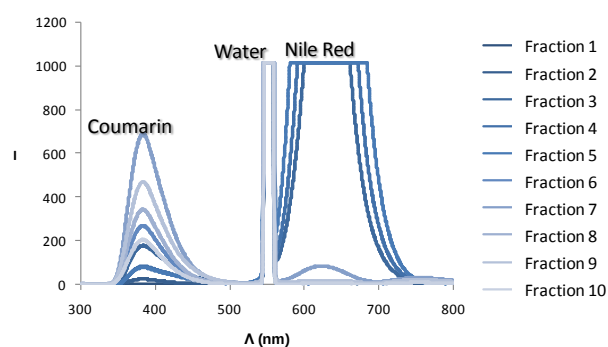


Figure SI5-4. Emission spectra of eluted fractions from ND encapsulated solutions recorded from 300 to 800 nm under $\lambda_{\text{excitation}} = 552$ nm.

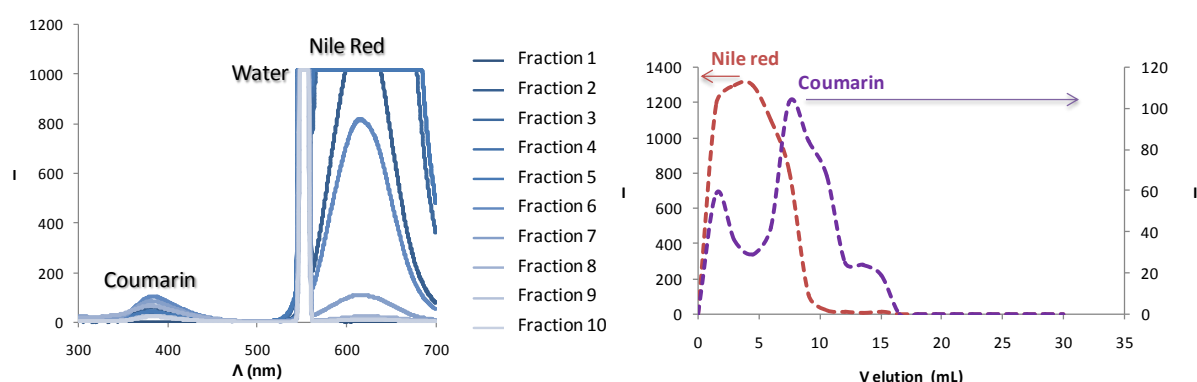


Figure SI5-5. Emission spectra recorded from 300 to 700 nm under $\lambda_{\text{excitation}} = 552$ nm (left) and respective reported maxima emission intensities of Nile Red and coumarin for each eluted fractions from NDx encapsulated solutions.

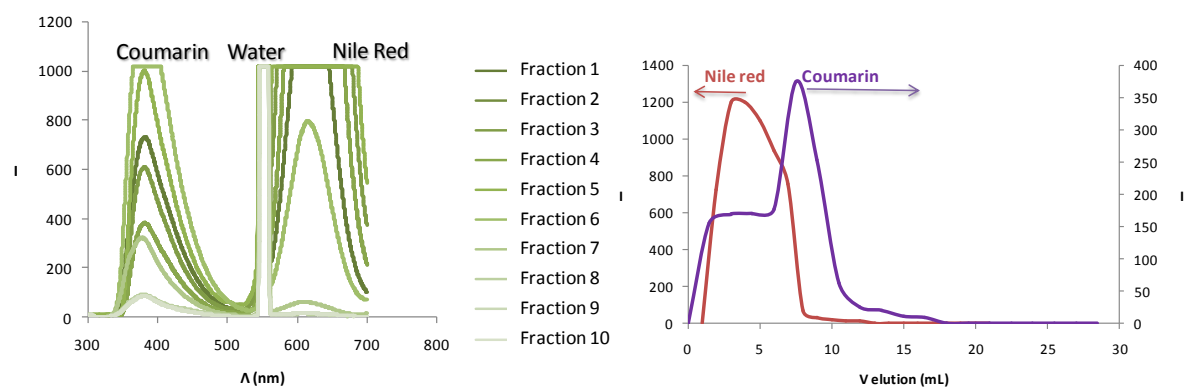


Figure SI5-6. Emission spectra recorded from 300 to 700 nm under $\lambda_{\text{excitation}} = 552$ nm (left) and respective reported maxima emission intensities of Nile Red and coumarin for each eluted fractions from NH encapsulated solutions.

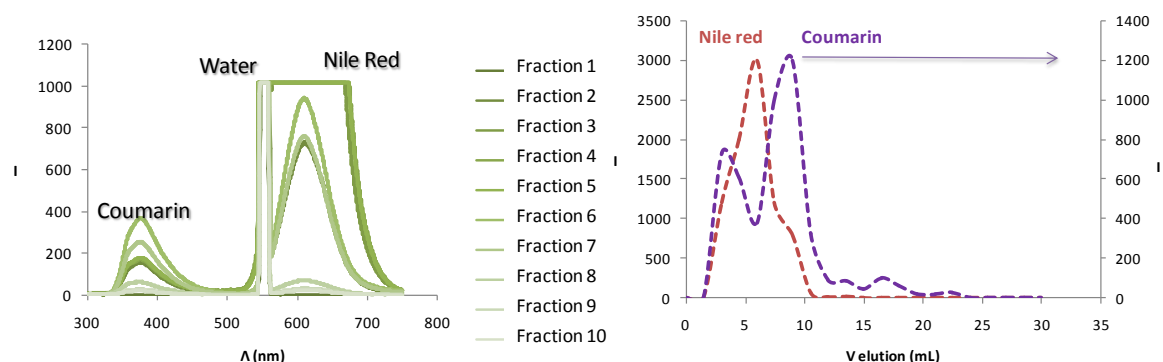


Figure SI5-7. Emission spectra recorded from 300 to 700 nm under $\lambda_{\text{excitation}} = 552$ nm (left) and respective reported maxima emission intensities of Nile Red and coumarin for each eluted fractions from NHx encapsulated solutions.

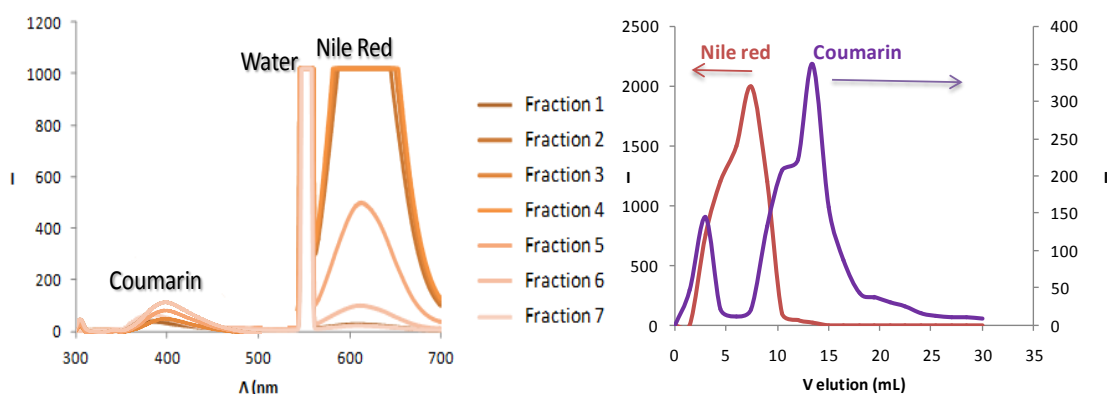


Figure SI5-8. Emission spectra recorded from 300 to 700 nm under $\lambda_{\text{excitation}} = 552$ nm (left) and respective reported maxima emission intensities of Nile Red and coumarin for each eluted fractions from NT encapsulated solutions.

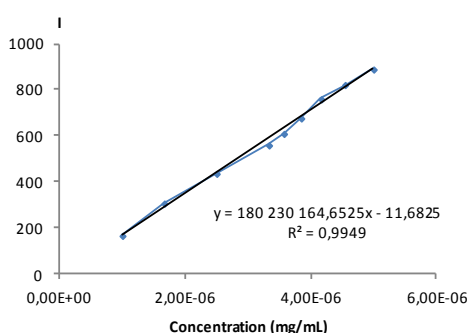


Figure SI5-9. Nile Red calibration curve obtained from maxima intensities of Nile Red emission band for concentrations varying from 1.10^{-6} to 5.10^{-6} mg/mL.

Knowing initial concentration in polymer (5.10^{-5} mg/mL, Pi) and the amount of Nile Red initially introduced (5.10^{-6} mg/mL, NRi), loading efficiency (D.L.E.) and capacity (D.L.C.)

are determined for each nanoparticle solution from calibration curve to estimate the encapsulated Nile Red concentration (NRe) and then according to the following calculation:

Calculations of D.L.E. and D.L.C. rates:

$$\text{D.L.E.} = \frac{NRe}{NRe_i} * 100 (\%) \quad (\text{equation 3})$$

$$\text{D.L.C.} = \frac{NRe}{Pi} * 100 (\%) \quad (\text{equation 4})$$

A5.2. Bandes d'émission de la coumarine à différentes concentrations, suivies par spectrofluorimétrie pour la détermination de la CAC des copolymères D, H et T et enregistrées de 300 à 500 nm sous $\lambda_{\text{excitation}} = 310$ nm.

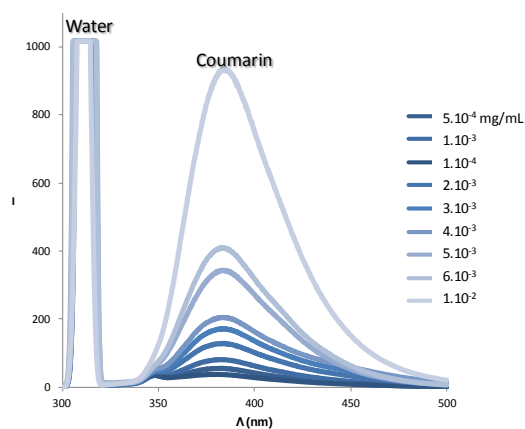


Figure A5-1. Coumarin emission band evolution according to concentration for D.

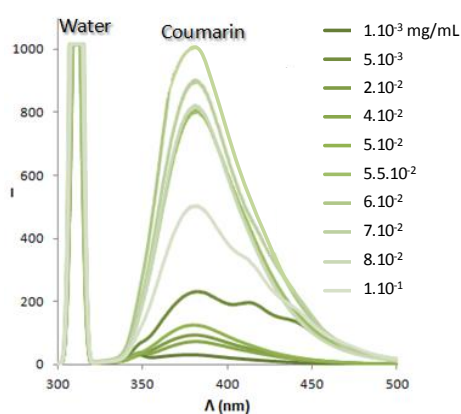


Figure A5-2. Coumarin emission band evolution according to concentration for H.

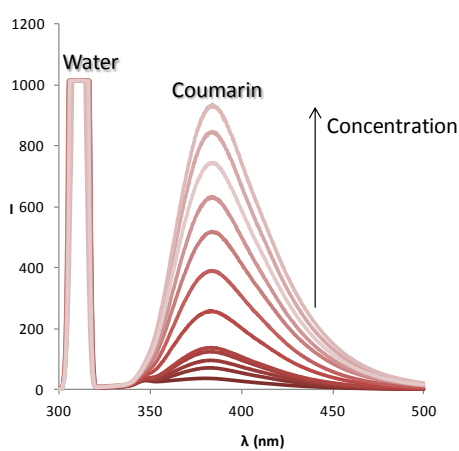


Figure A5-3. Coumarin emission band evolution according to concentration for T.

Auto-assemblage de copolymères amphiphiles photo-stimulables à base de polyoxazoline

Résumé

Trois architectures de copolymères (dibloc, tribloc et hétérogreffé) amphiphiles photo-stimulables à base de polyoxazoline et de groupements photo-sensibles de type coumarine sont étudiées dans ce travail. Ces copolymères s'auto-assemblent en milieu aqueux sous forme de nanoparticules de morphologies sphériques, ovales mais également de nanofibres hélicoïdales de plusieurs micromètres de longueur. Selon les cas, les morphologies sont induites par de la cristallisation des motifs coumarine entre eux ou bien des interactions polyoxazoline-coumarine. Par ailleurs, la photo-réponse des nanoparticules a été examinée après irradiation UV des groupements coumarine, capables de dimériser de manière réversible selon la longueur d'onde utilisée. Elle diffère selon l'architecture du copolymère qui constitue les nanoparticules et donne lieu à des phénomènes de (pré-)photo-dimérisation ou photo-réticulation du cœur de celles-ci avec des réversibilités sous UV variables et un maximum d'efficacité dans le cas des copolymères triblocs. La stabilité de ces auto-assemblages a également été examinée avant et après exposition UV. Dans tous les cas, l'irradiation des nanoparticules améliore leur stabilité en température et dans le temps avec un effet maximal dans le cas de la pré-photodimérisation (tribloc). Enfin, la réticulation et la cristallisation se sont révélées être des freins au piégeage de molécules hydrophobes, illustrées ici avec le Nile Red, alors que les copolymères diblocs se sont révélés être les systèmes les plus efficaces. En somme, les nanoparticules de copolymères triblocs présentent le meilleur compromis entre stabilité, efficacité UV et piégeage.

Mots clés : *Polyoxazoline – Coumarine – Auto-assemblage – Photo-sensible – Amphiphile*

Self-assembly of photo-responsive amphiphilic copolymers based on polyoxazoline

Abstract

Three photo-responsive amphiphilic copolymer architectures (diblock, triblock and heterografted) based on polyoxazoline and coumarin photo-sensitive units are studied in this work. These copolymers self-assemble in water into spherical or ovalic nanoparticles and also supramicrometer helicoidal nanofibers. Depending on the macromolecular architectures, these morphologies are induced by crystallization of coumarin units or polyoxazoline-coumarin interactions. Moreover, the nanoparticle photo-response is examined after the UV-exposure of coumarin units, that are able to reversibly dimerize according to the wavelength used. This photo-response varies with the copolymer structure and leads to (previous) photo-dimerization or photo-crosslinking phenomena. These latter present various photo-reversibility behaviors under UV and a maximal efficiency for triblock copolymers. The nanoparticle stability was additionally studied before and after UV-irradiation. In both cases, the nanoparticle stability is improved towards time and temperature with a maximal impact for the previous photo-dimerization (triblock). Finally, the crosslinking and the crystallization appear as brakes for the hydrophobic molecule entrapment, illustrated here by Nile Red, whereas diblock copolymers seem to be the most efficient systems. To conclude, previously photo-dimerized nanoparticles (triblock) are the best way combining stability, UV-efficiency and entrapment.

Key words: *Polyoxazoline – Coumarin – Self-assembly – Photo-responsive – Amphiphilic*

Laboratoire : Equipe Ingénierie et Architectures Macromoléculaires ICGM UMR 5253