

N° d'ordre : 2319



# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par **Willy AGUT**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : POLYMERES

## **Conception de nano-objets adaptatifs à base de polypeptides.**

Thèse dirigée par Sébastien LECOMMANDOUX et Daniel TATON

Soutenue le : 12 décembre 2008

Après avis de :

M. J.-F. GOHY  
M. C. MINGOTAUD

Professeur, CMAT, Université de Louvain  
Directeur de recherche, CNRS, IMRCP Université Toulouse

Rapporteur  
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M. H. CRAMAIL  
M. J.-F. GOHY  
M. C. MINGOTAUD  
Mme. A. BRULET  
M. S. LECOMMANDOUX  
M. D. TATON

Professeur, LCPO, Université Bordeaux 1  
Professeur, CMAT, Université catholique de Louvain  
Directeur de recherche, CNRS, IMRCP Université Toulouse  
Ingénieur de recherche, CEA, LLB Saclay  
Professeur, LCPO, ENSCPB  
Professeur, LCPO, Université Bordeaux 1

Examineur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur



A Aurélie  
A mes parents, à ma soeur



« La seule chose absolue dans un monde comme le nôtre, c'est l'humour. »

*Albert Einstein*

« L'homme de science le sait bien, lui, que seule la science, a pu, au fil des siècles, lui apporter l'horloge pointeuse et le parcmètre automatique sans lesquels il n'est pas de bonheur terrestre possible »

*Pierre Desproges*



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Yves Gnanou et Henri Cramail, directeurs respectifs du LCPO, pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Merci aux membre du jury, Madame Annie Brûlet et Messieurs Jean-François Gohy, Christophe Mingotaud et Henri Cramail pour avoir pris le temps de lire et juger ce manuscrit.

Je remercie profondément l'équipe enseignante de la LPCI 2002/2003, à savoir Messieurs Daniel Taton, Eric Papon, Henri Cramail, Stéphane Carlotti, Dominique Leclerc, Manu Ibarboure, José Alcorta... pour m'avoir fait découvrir le monde passionnant des polymères mais surtout pour m'avoir donné envie de continuer mes études sans quoi ce manuscrit n'existerait pas.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe avec qui j'ai eu la chance et la joie de travailler durant ces trois années : Seb, Christophe, Jeff, Steph, Isabelle, Valentine, Célia, Autumn, Anitha, Charles, Laurent, Kamal, Juan de Dios, Emilio, Réda. Merci pour tout et bon courage aux futurs docteurs !!!

Un grand merci à Annie Brûlet pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa pédagogie mais également pour son aide précieuse dans la réalisation et le traitement des expériences de diffusion neutronique, ainsi qu'à Olivier Sandre pour avoir enrichi ce travail avec ses ferrofluides.

Un remerciement général à toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler et qui ont contribué à l'avancée de mes travaux de thèse. Nico (GPC, DLS, RX ???), Manu (AFM, DSC), Sabrina (TEM), Annie (SANS), Olivier S (particules magnétiques), Cristiano (ATRP), Jérôme L (click) et Lucille (hyperthermie). Je ne voudrais surtout pas oublier Olivier P, celui qu'on appelle « le Patron », qui a su m'éclairer un grand nombre de fois et que je remercie énormément pour tous ses conseils et toutes les discussions que l'on a pu avoir tous les deux.

Je remercie l'ensemble des permanents du laboratoire avec qui j'ai pu avoir des discussions scientifiques enrichissantes, mais également des discussions non scientifiques tout aussi enrichissantes. J'ai eu la chance de réaliser ma thèse dans un laboratoire de sportifs (ils se reconnaîtront) avec qui j'ai pu me défouler que ce soit au foot, à la pala, au squash ou encore à la course à pied.

J'ai pu côtoyer au cours de ces trois années passées au LCPO un grand nombre de personnes avec qui j'ai pu lier des liens très forts. La logique veut que je parle tout d'abord des personnes avec qui j'ai passé ces trois années. Par ordre alphabétique, je voudrais tout d'abord remercier Bouk, parti au pays des kangourous. C'est sans doute la personne avec qui j'ai le plus d'affinités : on vient tous les deux du sud-ouest, on est passionné par le sport et en particulier le foot (j'ai eu la chance de jouer à ses côtés avec l'équipe du CAES durant ces deux dernières années mais cependant il faut qu'il se rende à l'évidence qu'il n'est pas un 9...), on a participé à pas mal de férias

même si je regrette qu'on en ai pas fait une ensemble (bientôt j'espère) et surtout on est passionné par les polymères... Merci à Cédric dit « Platoche », le roi de la glisse. Il doit son surnom à son superbe maillot de foot avec lequel il jouait au début de la thèse ainsi qu'à ses passements de jambes irréalistes. Bon courage chez les Phillies et essaie d'aller voir un match de base-ball cette fois... Merci à Flu. Que dire de lui si ce n'est que c'est la personne qui m'a fait le plus rire durant ces 28 dernières années. Il est arrivé sur la pointe des pieds au labo puis il s'est révélé en peu de temps et une fois la machine lancée, difficile de l'arrêter. Ses blagues, ses imitations (notamment celle de coach Courbis) et sa perpétuelle bonne humeur ont été à la base de la super ambiance au LCPO pendant ces trois années. Bon vent chez les caméléons et « si tu vois Dieu et bien dis lui qu'on paye trop d'impôts ! ». Merci à Jérôme, monsieur « No Limit ». Il n'est arrivé qu'en cours de thèse mais il faut dire qu'il s'est rapidement intégré à l'équipe grâce à sa finesse et à sa légèreté légendaires. Qu'il continue ! Merci à Julien, vainqueur à l'unanimité du meilleur déguisement qui lui a valu le surnom de « Tonton ». Comme l'a dit une personne le jour de sa soutenance : « tu es brillant ». Le genre de mec qui développe un modèle théorique tout en restant modeste. C'est quelqu'un de vrai, qui sait ce qu'il veut et je ne me fais pas de souci pour sa carrière. Juste un petit conseil : attention aux concombres !!! Merci aussi à Matthieu. Quel personnage... Major de promo du grand cru Master 2005, on pourrait se dire que Matthieu est calme et posé. En fait, cet homme devient incontrôlable en soirée ! Mais bon, c'est ça que j'aime chez lui : sa générosité. Il a toujours été présent pendant ces cinq années et c'est vraiment quelqu'un sur qui on peut compter. Bon vent sur la West Coast (en espérant que tu y restes 18 mois qu'on vienne te voir en vacances). Je tiens à insérer Nico dans ce premier groupe. Il a en effet toujours été présent et a été un des éléments moteurs du groupe. Et On le remercie beaucoup pour nous avoir prêté son appart pendant ce dernier mois de Janvier !!! Merci encore à tous les sept pour ces trois années inoubliables. De toute façon, we love Nico !!!

Et puis il y a ceux qui n'ont plus qu'un an à tirer. Ces trois là aussi méritent d'être connus. Tout d'abord, je tiens à remercier Charles. Je regrette simplement qu'on ne se soit pas rencontrés avant car c'est vraiment quelqu'un de bien. Que dire d'autre sinon que Laurent Gerra et autre Nicolas Canteloup peuvent aller se rhabiller. Jamais je n'ai vu quelqu'un maîtriser autant ses imitations en particulier, celle de Bacri (ah il est con lui !). Je garde également en mémoire, bien sûr, l'anecdote de « hé, il est marrant lui, un peu que c'est bien, c'est moi qui l'ai fait ! ». Merci aussi à Jean Réno (ou Raynaud je sais pas). Mais surtout, merci à ses parents de lui avoir donné ce prénom, ça lui as permis d'être la tête de lézard durant deux ans. En tout cas, je le remercie pour son indulgence parce que j'imagine que ça n'a pas dû être facile tous les jours... C'est sans doute la personne la plus passionnée que j'ai rencontré à ce jour (Daniel confirmera) et je reste persuadé qu'il ira loin dans ce qu'il fait (quand même pas jusqu'à Stockholm, il est marrant lui). Quand je dis « passionné », je veux bien sûr parler de la Science, pas du squash... Enfin, Merci à Anne-Claire qui reste à mes yeux une personne dont la bonne humeur permanente n'est plus à prouver et qui a su apporter un brin de folie au labo.

J'aimerais également remercier tous les autres thésardes et thésards que je n'ai pas encore cités. D'abord, les deuxième année : tout d'abord, Steph avec qui j'ai eu la chance de partager le labo et dont les « Willy, j'ai une question » m'ont toujours fait sourire ; Da Costa, courage et attention à la verrerie ; Bertrand, l'autre passionné avec Jeannot (ces deux là me font peur) ; Pinot simple flic, que je félicite pour le calendrier ; La poutre, oulà oulà (c'est le cri du diable...de tasmanie) ; Chantal, Liban libre ! ; Aurélie, c'est vrai qu'elle ressemble à Malaury. Puis les première année, à qui tout reste à faire (sans vouloir vous mettre la pression bien sûr...) : Anne-Laure, Célia, Samira, Laurent (merci pour les cours de biologie) et Aurélien.

A cette longue liste s'ajoute également les personnes passées par le laboratoire et avec qui j'ai pu tisser des liens d'amitié : Marie bla-bla, Babinot, Ben le boulet, Rachid, Christelle, Gégé, Virginie, Amélie, Romain, Andrès (le sosie de Robert de Noro), Clément. Sans oublier tous les post-docs : Gilles (le basque bondissant), Roger, Autumn, Stéphane, Feng (kkkrrrrmmmm !!!), Hari, Kari, Stéphane, Hassen, ...

Je tiens à remercier profondément Aurélie pour son soutien permanent, sa joie de vivre communicative mais également pour m'avoir supporté tout au long de ces trois ans (et même plus). Elle est un exemple à suivre et je lui témoigne ici tout mon amour. Je remercie aussi mes parents, ma sœur et ma belle-famille pour m'avoir permis d'avancer, encore et toujours.

Enfin, je voudrais remercier Sébastien Lecommandoux et Daniel Taton, mes deux mentors, pour plusieurs raisons : Tout d'abord, je les remercie pour tout ce qu'ils m'ont apporté durant toutes ces années. J'ai beaucoup appris à leurs côtés, ils ont su me transmettre leur passion pour la Science. Je les remercie aussi pour leur disponibilité et leur soutien permanent, ils ont toujours été là quand j'en avais besoin. Je leur exprime toute ma gratitude pour la liberté et la confiance qu'ils m'ont accordées. Je voudrais enfin mettre en avant leur simplicité qui m'a permis de me sentir à l'aise très rapidement, chose qui compte énormément à mes yeux. De plus, nous avons partagé de très agréables moments hors science qui resteront dans ma mémoire.

Merci à tous !!!



# SOMMAIRE

<i>Liste des abréviations</i> .....	3
Introduction générale.....	5
Chapitre I : Etude bibliographique de copolymères à blocs formant des nano-objets en milieu aqueux.....	9
Chapitre II : Stratégies de synthèse des copolymères à blocs adaptatifs.....	77
Chapitre III : Etude des propriétés d'auto-assemblage des copolymères à blocs en solution aqueuse.....	123
Chapitre IV : Partie expérimentale.....	189
Conclusion générale.....	211



## Liste des abréviations

AFM : microscopie à force atomique  
ATRP : polymérisation radicalaire par transfert d'atome  
C<sub>60</sub> : fullerène  
CES : chromatographie d'exclusion stérique  
CGC : concentration critique de gel  
CMC : concentration micellaire critique  
CMT : température critique de micellisation  
CuBr : bromure de cuivre  
d : épaisseur de la membrane des vésicules  
DLS : diffusion dynamique de la lumière  
DMF : diméthylformamide  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DOX : doxorubicine  
DP : degré de polymérisation  
DSC : analyse enthalpique différentielle  
HMTETA : 1, 1, 4, 7, 10, 10-hexaméthyltriéthylènetétramine  
I<sub>p</sub> : indice de polymolécularité  
IRTF : spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier  
LCST : température critique de séparation par abaissement de température  
M<sub>n</sub> : masse molaire moyenne en nombre  
NaCl : chlorure de sodium  
NCA : N-Carboxyanhydride  
PBLG : poly(L-glutamate de  $\gamma$ -benzyle)  
PGA : poly(acide glutamique)  
PMADAME : poly méthacrylate de 2-(diméthyle amino) éthyle)  
PSPE : poly(méthacrylate de 2-(diméthyle amino) éthyle)propane sultone  
R<sub>c</sub> : rayon du cœur des micelles  
R<sub>g</sub> : rayon de giration  
R<sub>H</sub> : rayon hydrodynamique  
RMN <sup>1</sup>H : résonance magnétique nucléaire du proton  
RMN <sup>13</sup>C : résonance magnétique nucléaire du carbone  
ROP : polymérisation par ouverture de cycle  
SANS : diffusion des neutrons aux petits angles  
TEM : microscopie électronique en transmission  
TFA : acide trifluoroacétique  
T<sub>g</sub> : température de transition vitreuse  
THF : tétrahydrofurane  
UCST : température critique de séparation par élévation de température  
UV : ultraviolet  
Z : nombre d'agrégation



# INTRODUCTION GENERALE



Depuis une dizaine d'années, on note un intérêt croissant dans l'utilisation de nanoparticules pour les applications biomédicales, notamment dans le relargage contrôlé de médicaments. Ces nanoparticules possèdent typiquement des tailles en solution comprises entre quelques nanomètres et quelques microns. Il existe à ce jour une grande variété de nano-objets : liposomes, micelles sphériques, dendrimères, vésicules polymères... Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à ceux formés à partir de copolymères à blocs pouvant adopter des morphologies de type micelle sphérique ou vésiculaire en solution.

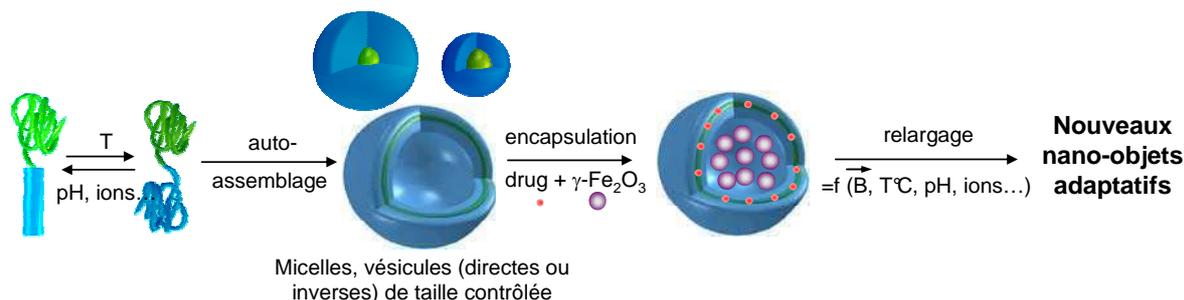
Les copolymères à blocs, comme les tensio-actifs, ont la particularité de s'auto-assembler en masse ou en solution pour donner lieu à une multitude de morphologies à l'échelle mésoscopique. Il est possible de prédire, grâce à des lois d'échelle, les dimensions caractéristiques du système connaissant les paramètres moléculaires des copolymères. Les techniques de polymérisation « vivante/contrôlée » permettent aujourd'hui d'accéder à des copolymères à blocs aux caractéristiques moléculaires (masses molaires, composition, architecture) relativement bien maîtrisées conduisant, après auto-assemblage, à des nanoparticules de morphologies et de tailles prédictibles.

Les copolymères à blocs représentent de bons candidats pour des applications biomédicales, notamment pour l'encapsulation et le relargage contrôlé de médicaments. Depuis quelques années, les équipes de recherche tentent de concevoir des nanoparticules fonctionnelles « sur mesure » de façon à augmenter leur efficacité en tant que nano-vecteurs. C'est dans ce contexte que s'est inscrit ce travail.

Depuis environ trois années, certaines thématiques de recherche du laboratoire s'orientent de plus en plus vers des aspects biologiques en privilégiant l'utilisation de copolymères à blocs à base de polypeptides. En effet, ces polymères possèdent des propriétés en solution tout à fait intéressantes de par leur complexité. Tout d'abord, ils permettent d'améliorer la biocompatibilité des composés car ils miment à la perfection les peptides naturels. Aussi, ils sont capables de changer de structure secondaire pouvant passer d'une conformation en hélice- $\alpha$ , à celle d'une pelote statistique ou d'un feuillet- $\beta$  en fonction de divers paramètres expérimentaux (pH, T...). Les travaux réalisés ces dernières années au laboratoire ont permis d'acquérir de solides compétences dans le domaine de l'auto-assemblage de copolymères complexes.

Le but aujourd'hui est de combiner les propriétés des polypeptides à celles de polymères stimulables non peptidiques. Pour cela, nous allons utiliser de tels mécanismes d'auto-assemblage pour réaliser la synthèse de nano-objets de taille mésoscopique et de forme contrôlée présentant une ou plusieurs fonctions dont la réponse peut être conditionnée par des variations environnementales. Nous qualifierons ces systèmes de « nano-objets adaptatifs », c'est-à-dire pouvant répondre à des stimuli variés (figure 1). On peut aussi imaginer incorporer différentes molécules (sondes fluorescentes, particules magnétiques  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, médicaments...) à l'intérieur de ces nanoparticules et contrôler leur propriétés structurales et de diffusion en fonction de la température ou du pH par exemple.

Ce projet a été réalisé dans le cadre d'une ACI « Jeunes chercheurs » dont le but est de concevoir de nouveaux matériaux multistimulables.



**Figure 1 : Stratégie adoptée pour le développement du projet combinant les différentes étapes de synthèse, d'auto-assemblage, d'encapsulation et d'évaluation des propriétés finales**

Ce manuscrit se compose de trois parties :

- Synthèse de copolymères diblocs linéaires à base de polypeptides
- Préparation et caractérisation de nano-objets formés
- Etude d'encapsulation de particules de ferrofluide.

Ce projet ambitieux, croisant les concepts de l'auto-assemblage, de l'ingénierie macromoléculaire, de l'encapsulation, des systèmes hybrides organique-inorganique et des systèmes stimulables constitue une thématique de recherche novatrice.

Dans le premier chapitre, nous présenterons l'état de l'art des systèmes auto-assemblés à base de copolymères à blocs en nous focalisant davantage sur ceux comportant un ou deux blocs stimulables. Nous nous intéresserons également aux copolymères à blocs à base de polypeptides puis nous terminerons par quelques exemples de systèmes micellaires utilisés dans les applications biomédicales comprenant des blocs stimulables ou/et peptidiques.

Le deuxième chapitre traitera des stratégies de synthèse développées pour élaborer les différents copolymères à blocs hybrides amphiphiles et multistimulables. La brique de base est constituée d'un copolymère de type rigide-flexible (rod-coil), dont la partie rigide est un polypeptide. La partie flexible est une chaîne synthétique à base soit d'unités oxyde d'éthylène et oxyde de propylène soit de méthacrylate d'alkyle. Ce bloc a été choisi du fait de son caractère stimuable au pH, à la température ou les deux.

Le troisième chapitre sera dédié à l'étude et la caractérisation complète en solution aqueuse des nanoparticules formées à partir des copolymères à blocs précédemment synthétisés. Nous tenterons également d'incorporer des particules magnétiques au sein des nanoparticules polymères afin de concevoir des systèmes pour l'imagerie ou l'hyperthermie.

Enfin, le quatrième chapitre commencera par une description des techniques de caractérisation par diffusion du rayonnement des nanoparticules en solution. Puis, il décrira les modes opératoires mis en place pour la synthèse des copolymères. Il énumérera enfin les différentes techniques utilisées pour les caractérisations chimiques et physico-chimiques de nos échantillons.

# Chapitre I

Etude bibliographique de  
copolymères à blocs formant des  
nano-objets en milieu aqueux



## **A- Auto-assemblage des copolymères à blocs en milieu aqueux... 13**

### **A-1 Auto-assemblage guidé par l'effet hydrophobe..... 14**

A-1-1 Généralités..... 14

A-1-2 Aspects théoriques ..... 16

A-1-2-1 Lois d'échelle..... 16

A-1-2-2 Champ moyen ..... 16

A-1-2-3 Considérations géométriques..... 17

A-1-3 Aspects expérimentaux..... 19

A-1-4 Auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles ..... 20

A-1-4-1 Dissolution directe ..... 20

A-1-4-2 Méthode des « co-solvants » ou « dissolution indirecte »..... 20

A-1-4-3 Réhydratation de film..... 21

A-1-4-4 Méthode de l'émulsification ..... 21

A-1-4-5 Influence d'autres paramètres sur l'auto-assemblage ..... 21

A-1-5 Auto-assemblage de copolymères à blocs stimulables ..... 22

A-1-5-1 Etude des copolymères à blocs présentant un bloc thermostimulable ..... 23

A-1-5-1-1 Polymères possédant une LCST ..... 23

A-1-5-1-2 Systèmes micellaires basés sur la LCST ..... 30

A-1-5-1-3 Polymères possédant une UCST ..... 31

A-1-5-2 Etude des copolymères à blocs présentant un bloc sensible au pH..... 37

A-1-5-2-1 Les polyacides faibles..... 38

A-1-5-2-2 Les polybases faibles ..... 38

A-1-5-2-3 Paramètres permettant de moduler pH\* ..... 39

A-1-5-2-4 Systèmes micellaires basés sur un changement de pH..... 39

A-1-5-3 Systèmes multistimulables ..... 41

A-1-5-3-1 pH-pH..... 42

A-1-5-3-2 Température-pH ..... 44

A-1-5-3-3 Température-température..... 45

A-1-5-3-4 Autres type de stimuli ..... 46

### **A-2 Auto-assemblage guidé par les complexations électrostatiques..... 46**

## **B- Auto-assemblage de copolymères à blocs « hybrides » à base de polypeptides ..... 49**

**B-1 Copolymères à blocs « hybrides » comportant un bloc peptidique soluble..... 51**

**B-2 Copolymères à blocs « hybrides » comportant un bloc peptidique insoluble..... 55**

<b>B-3 Copolymères à double blocs peptidiques : copolypeptides à blocs. ....</b>	<b>55</b>
<b>C- Exemples d'applications des copolymères à blocs en milieu aqueux.....</b>	<b>57</b>
<b>C-1 Relargage de principes actifs par diffusion .....</b>	<b>58</b>
<b>C-2 Relargage de principes actifs par application d'un stimulus externe (provoqué).....</b>	<b>60</b>
C-2-1 Systèmes sensibles au pH .....	60
C-2-2 Systèmes sensibles à la température .....	61
C-2-3 Systèmes sensibles à d'autres stimuli .....	63
<b>C-3 PIC pour la thérapie génique .....</b>	<b>65</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>65</b>

Nous ne traiterons pas ici le vaste domaine de l'auto-assemblage en solution des copolymères à blocs d'architecture ramifiée. Dans cette étude bibliographique, nous nous sommes limités aux cas des copolymères diblocs linéaires capables de s'auto-assembler en milieu aqueux comme solvant sélectif.

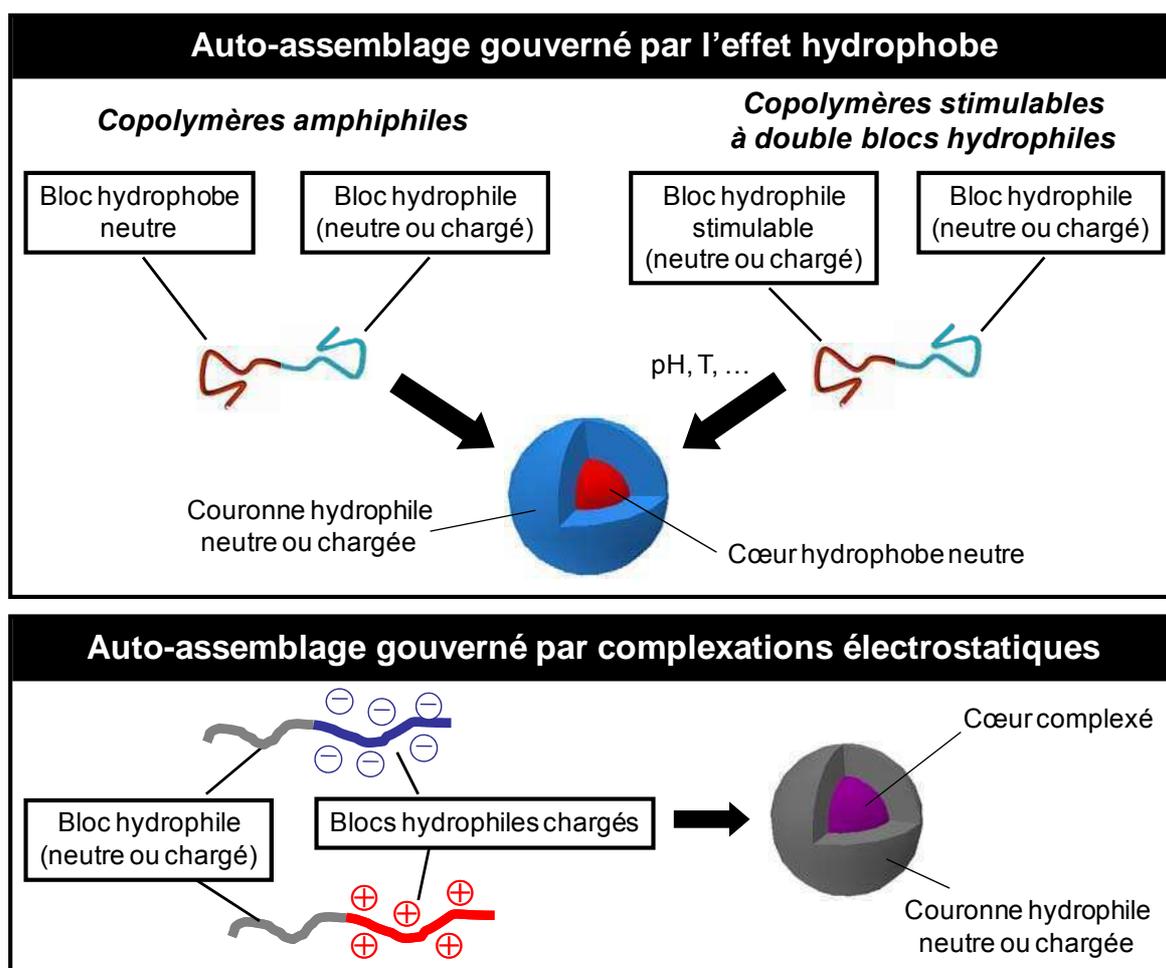
Le contrôle des masses molaires étant décisif pour obtenir les morphologies ciblées, les composés dont il est question ici ont été généralement synthétisés par des techniques de polymérisation « vivante/contrôlée », radicalaire ou ionique.

D'abord, les aspects phénoménologiques d'auto-assemblage dans l'eau des copolymères à blocs seront présentés, puis nous montrerons en quoi il est intéressant d'incorporer un bloc polypeptidique dans de tels composés. Enfin, nous montrerons quelques exemples d'applications de ces copolymères à blocs.

## **A- Auto-assemblage des copolymères à blocs en milieu aqueux**

L'auto-assemblage des copolymères à blocs en solution conduit à la formation d'agrégats micellaires de différentes morphologies et dont la taille varie de quelques nanomètres à plusieurs microns. Les aspects théoriques et physico-chimiques de ce processus d'agrégation ont été discutés en détails dans d'excellentes revues.<sup>1,2,3,4,5</sup>

Cette auto-organisation est dirigée par des forces motrices telles que l'effet hydrophobe, les interactions électrostatiques ou encore les liaisons hydrogène. Dans cette étude, seuls les deux premiers types d'interactions seront traités (Figure I-1). Pour plus d'informations sur la formation de systèmes auto-assemblés *via* l'établissement de liaisons H, le lecteur peut être renvoyé aux références.<sup>6,7,8,9</sup>



**Figure I-1** : Formation de nanoparticules à partir de l'auto-assemblage de copolymères à blocs en milieu aqueux en fonction de la force motrice.

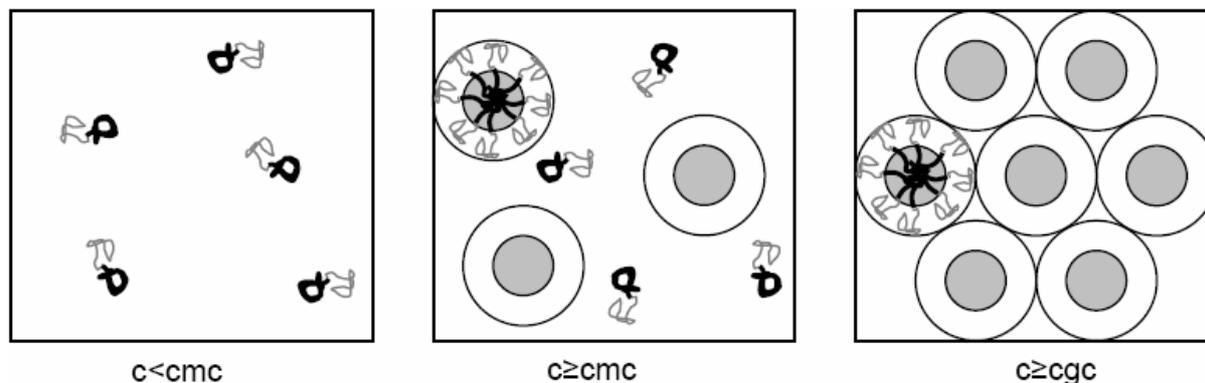
## **A-1 Auto-assemblage guidé par l'effet hydrophobe**

La formation d'agrégats en solution est le plus souvent générée par l'effet hydrophobe. Sont concernés à la fois les copolymères amphiphiles, c'est-à-dire constitués d'un bloc hydrophile et d'un bloc hydrophobe, mais aussi les copolymères (stimulables) à double blocs hydrophiles.<sup>10</sup> En effet, ces derniers, bien que solubles dans l'eau dans certaines conditions, vont s'auto-assembler sous l'action d'un stimulus externe pour former des nanoparticules par précipitation d'un des deux blocs rendu hydrophobe. On se retrouve alors dans la configuration d'un copolymère à blocs « classique » amphiphile. La partie qui va suivre englobe les deux types de systèmes.

### **A-1-1 Généralités**

Les copolymères à blocs de type A-b-B sont constitués de deux segments liés entre eux de façon covalente. Leur auto-assemblage est provoqué lorsque l'entropie qui favorise le désordre et donc la solubilité des blocs ne parvient pas à contrebalancer le coût énergétique des contacts répulsifs entre les blocs insolubles et le solvant. De manière à minimiser ces contacts répulsifs avec les molécules de solvant, les blocs insolubles s'agrègent : c'est le processus de micellisation. Il

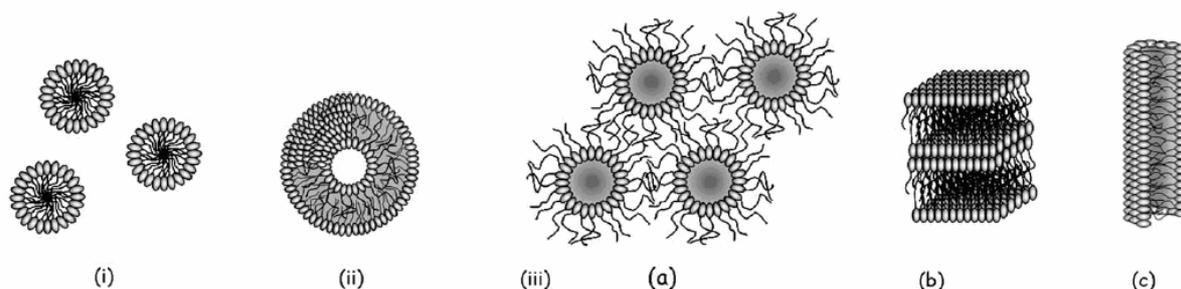
dépend de deux paramètres majeurs : la concentration micellaire critique (cmc) et la température micellaire critique (cmt). Le phénomène d'auto-assemblage n'a lieu que si la cmc ou la cmt est atteinte.



**Figure I-2 : Illustration de la concentration micellaire critique (cmc) et de la concentration critique de gel (cgc)<sup>11</sup>.**

Ainsi, en dessous de la cmc, les copolymères sont dissous moléculairement dans la solution (on parle de forme unimères) alors qu'au-dessus de cette valeur, les micelles multimoléculaires sont en équilibre avec les formes unimères. Ce comportement est donc analogue à celui des tensio-actifs de faible masse molaire (figure I-2).<sup>11</sup> En augmentant davantage la concentration en polymère au-delà de la « concentration critique de gel » (cgc), les micelles s'ordonnent en réseaux, formant ainsi des gels micellaires ordonnés.

Deux forces opposées sont responsables de la formation des micelles. La première est une force d'attraction entre les blocs insolubles qui entraîne leur agrégation, alors que la deuxième est une force de répulsion entre les blocs solubles conduisant à une limitation des tailles des objets formés. La balance entre ces deux forces est généralement dépendante de l'étirement des chaînes de polymères constituant le cœur, de la tension de surface à l'interface cœur-couronne, de la force des interactions entre les blocs (représenté par le paramètre d'interaction de Flory-Huggins,  $\chi$ ), de la masse molaire du copolymère (M) et de la fraction volumique ( $\Phi$ ) de chacun des deux blocs. Ainsi, en fonction de l'équilibre entre ces forces, des micelles de tailles et morphologies différentes (vésicules, micelles sphériques, cylindriques...) peuvent être obtenues (figure I-3).



**Figure I-3** : Exemples de morphologies obtenues en solution à partir de copolymères à blocs : (i) micelles sphériques ;(ii) vésicules et (iii) autres morphologies : (iiia) agrégats de micelles ;(iiib) structures lamellaires ;(iiic) micelles tubulaires ou cylindriques

## **A-1-2 Aspects théoriques**

Les systèmes micellaires sont ainsi caractérisés par des paramètres structuraux tels que le nombre d'agrégation  $Z$ , la taille globale  $R$ , le rayon du cœur  $R_C$ , et l'épaisseur de la membrane  $d$ . Différentes théories ont été développées pour prédire ces grandeurs en fonction des caractéristiques du copolymère à blocs (masse molaire  $M$ , degré de polymérisation des blocs  $A$  et  $B$ ,  $N_A$  et  $N_B$ ). Le but ici n'est pas de faire un état de l'art exhaustif des différentes théories développées à ce jour pour décrire le comportement des copolymères en solution, mais plutôt d'en tracer rapidement les grandes lignes.

### **A-1-2-1 Lois d'échelle**

Différentes théories ont été proposées pour décrire le comportement des copolymères en solution. En particulier, la théorie fondée sur des lois d'échelles a été décrite par de Gennes en 1978<sup>12</sup> pour des micelles de type « crew-cut », c'est-à-dire où les micelles sont caractérisées par un cœur de taille importante et une couronne fine. Plusieurs développements de cette théorie ont suivi : Daoud et Cotton ont étudié les comportements en bon solvant des micelles de type « star-like » (modèle des « blobs »)<sup>13</sup>, Zhulina et Birshtein ont examiné le cas particulier des copolymères diblocs en solvant sélectif<sup>14</sup> et ont identifié quatre régimes différents selon les valeurs de  $N_A$  et  $N_B$ . Par la suite, Halperin<sup>15</sup> a confirmé les résultats de Zhulina et Birshtein dans le cas des micelles de type « star-like », c'est-à-dire les micelles constituées d'une couronne plus grande que le cœur. Il faut souligner que toutes ces lois d'échelle prédisent que le nombre d'agrégation  $Z$  et le rayon du cœur  $R_C$  dépendent uniquement de la taille du bloc insoluble pour les micelles de type « star-like ». Plus récemment, Wu et Gao<sup>16</sup> ont montré que, dans un régime entre les micelles « crew-cut » et « star-like », le rayon du cœur est également relié à la taille du bloc soluble. Puis, Shusharina et al. se sont intéressés aux copolymères à blocs constitués d'un bloc polyélectrolyte ainsi que d'un bloc neutre en solvant sélectif.<sup>17</sup>

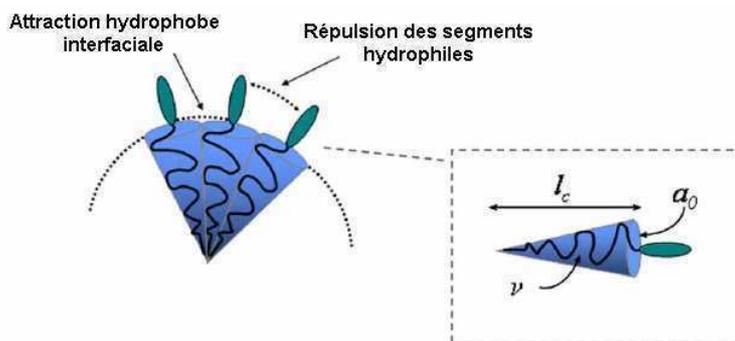
### **A-1-2-2 Champ moyen**

Dans le cas des modèles faisant appel aux théories de champ moyen, les premiers travaux sont apparus en 1983.<sup>18</sup> Noolandi et Hong ont étudié un système simple : la formation de micelles par un copolymère diblocs  $A$ - $b$ - $B$  en solvant sélectif. Ces auteurs ont déterminé la taille à l'équilibre des

micelles ainsi que la variation du nombre d'agrégation en fonction du degré de polymérisation du copolymère. Leurs résultats ont été comparés à des études expérimentales de diffusion de rayons-X et de neutrons et un parfait accord a été trouvé (tout comme avec les lois d'échelles précédemment obtenues par de Gennes). En parallèle d'autres modèles ont été développés par Leibler *et al.*<sup>19</sup> ou Nagarajan et Ganesh,<sup>20</sup> avec comme objectif, la compréhension et la prévision du phénomène d'auto-assemblage dans les systèmes de copolymères en solvant sélectif.

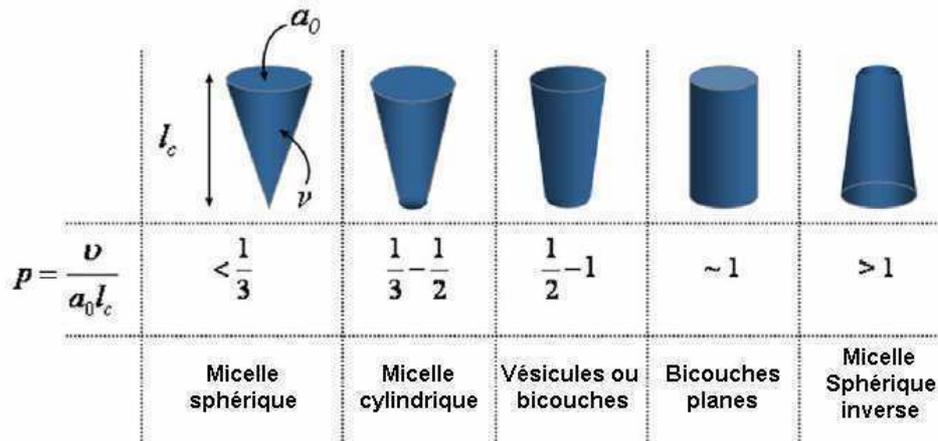
### A-1-2-3 Considérations géométriques

Parallèlement à ces travaux, il existe une théorie plus accessible fondée sur de simples considérations géométriques. Cette théorie, développée par Israelachvili pour des systèmes amphiphiles simples tels que les tensioactifs ou les lipides,<sup>21</sup> est parfaitement applicable et efficace pour l'analyse et la prédiction des morphologies obtenues par auto-assemblage de copolymères à blocs. Dans le cas où les forces attractives prédominent, l'aire interfaciale  $a_0$  par chaînes diminue et, inversement, si ce sont les forces répulsives qui prédominent (figure I-4). La compétition entre ces deux forces opposées, qui dépendent beaucoup de la géométrie des deux blocs, va être à l'origine des différentes morphologies précédemment évoquées (micelles, vésicules...).



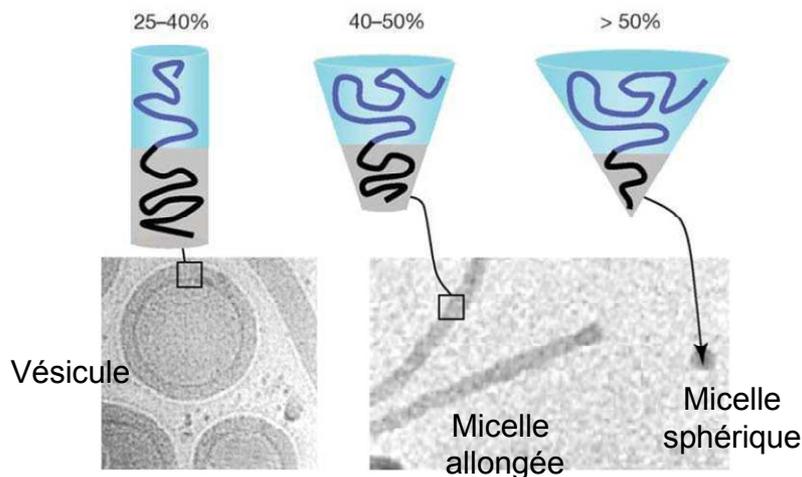
**Figure I-4 : Forces attractives et répulsives contribuant à la formation des agrégats micellaires en solution d'après Israelachvili et al.<sup>21</sup>**

Les hypothèses d'Israelachvili prennent en compte trois paramètres : l'interface  $a_0$ , le volume  $v$  occupé par les chaînes hydrophobes et leur longueur maximale  $l_c$  exprimés par la relation :  $p = v/a_0 l_c$  avec  $p$ , le paramètre d'empilement qui permet de prédire la structure finale de l'auto-assemblage (figure I-5).



**Figure I-5** : Influence des paramètres moléculaires sur la morphologie du système micellaire :  $v$ ,  $a_0$  et  $l_c$  représentent, respectivement, le volume, l'aire interfaciale et la longueur des blocs hydrophobes.<sup>21</sup>

Plus récemment, et par analogie avec l'approche d'Israelachvili, Discher et Eisenberg<sup>22</sup> ont tenté de regrouper les nombreux résultats expérimentaux obtenus sur l'étude de l'auto-assemblage des copolymères amphiphiles, pour prédire la morphologie des objets formés en fonction de la fraction massique du bloc hydrophile,  $f$ . Une valeur de  $f \sim 35 \pm 10\%$  favoriserait ainsi la formation de vésicules, alors que des micelles sphériques sont généralement obtenues pour  $f > 50\%$ . Les morphologies cylindriques apparaissent pour des fractions massiques en blocs hydrophiles comprises entre 40 et 50% (figure I-6).



**Figure I-6** : Morphologies attendues pour un copolymère amphiphile dans l'eau en fonction de la fraction massique du bloc hydrophile,  $f$ , selon Discher et Eisenberg.<sup>23</sup>

Ces mêmes auteurs ont également prédit l'évolution de l'épaisseur de la membrane ( $d$ ) d'une vésicule de copolymères à blocs en fonction de sa masse molaire ( $M_w$ ) :  $d \sim M_w^{0.55}$ .<sup>23</sup>

### **A-1-3 Aspects expérimentaux**

D'un point de vue expérimental, les systèmes micellaires sont généralement décrits à travers les paramètres structuraux suivants.<sup>4</sup>

- cmc et cmt
- Morphologie
- $M_m$ , la masse molaire de la micelle
- Z, le nombre d'agrégation
- $R_g$ , le rayon de giration
- $R_H$ , le rayon hydrodynamique
- $R_C$ , le rayon du cœur
- L, l'épaisseur de la couronne
- d, l'épaisseur de la membrane (dans le cas d'une vésicule)

De nombreuses techniques expérimentales sont utilisées pour étudier les systèmes micellaires et ainsi mettre en lumière les différents aspects du processus d'auto-assemblage en solution, la structure globale des micelles ainsi que celle de leur cœur et couronne. Le tableau I-1 regroupe les techniques expérimentales les plus utilisées pour déterminer ces paramètres structuraux ainsi que les aspects dynamiques des systèmes micellaires.

Techniques expérimentales	Caractéristiques des systèmes micellaires
Microscopie électronique en transmission (MET)	Morphologie, taille, d
Diffusion des neutrons aux petits angles (SANS)	$R_g$ , $R_C$ , L, $M_m$
Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)	
Diffusion statique de la lumière (SLS)	$R_g$ , $A_2$ , $M_m$ , cmc
Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	$R_H$
Chromatographie d'exclusion stérique (CES)	$R_H$ , dynamique de l'équilibre micellaire
Ultracentrifugation	Densité des micelles, $M_m$ , ration entre micelles et unimères
Spectroscopie de fluorescence	cmc, cmt, dynamique des chaînes
Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	Dynamiques des chaînes
Techniques viscosimétriques	$R_v$ , $R_H$ , viscosité intrinsèque

**Tableau I-1 : Techniques expérimentales pour la caractérisation des micelles.**<sup>4</sup>

### **A-1-4 Auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles**

Nous nous intéressons ici aux copolymères diblocs amphiphiles composés d'un bloc hydrophile et d'un bloc hydrophobe. Au-delà des caractéristiques moléculaires, la méthode de préparation des nanoparticules est également un facteur clé pour contrôler les mécanismes (cinétiques et thermodynamiques) du processus d'auto-assemblage des copolymères à blocs. En réalité, il n'existe pas de méthodes universelles permettant de préparer des nanostructures en solution à base de copolymères. Les expériences menées ont montré que la méthode de préparation des solutions de copolymères est tout aussi importante que la synthèse des composés. Les quatre méthodes de préparation les plus utilisées dans ce domaine sont présentées ci-après.

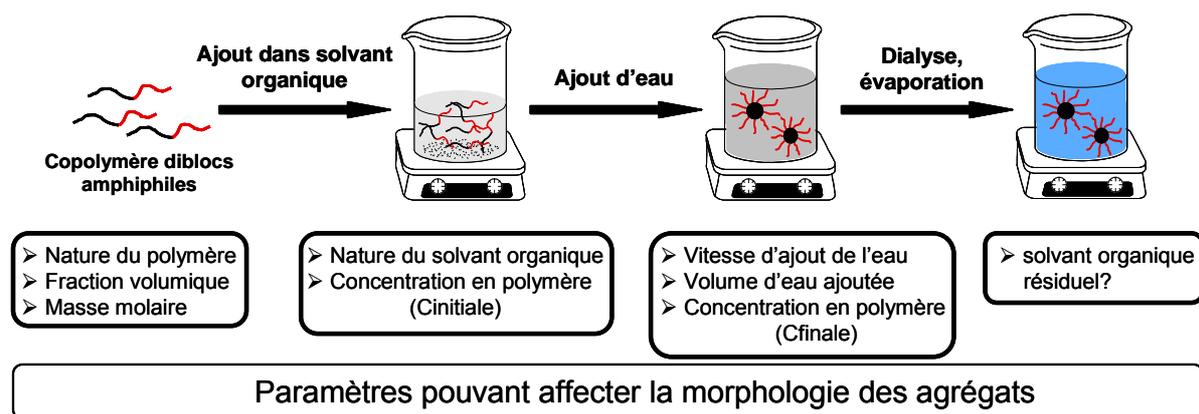
#### **A-1-4-1 Dissolution directe**

Cette technique consiste à solubiliser le copolymère à blocs amphiphiles directement dans l'eau. En général, l'auto-assemblage a lieu progressivement sous agitation jusqu'à ce que l'équilibre thermodynamique soit atteint. La cinétique d'auto-organisation dépend à la fois des paramètres expérimentaux comme la température, la présence d'additifs, etc... et des propriétés intrinsèques macromoléculaires comme la masse molaire, la fraction volumique entre les blocs hydrophobes et hydrophiles et la température de transition vitreuse (T<sub>g</sub>) du segment hydrophobe.

L'obtention d'agrégats isolés bien définis dans l'eau apparaît pour des systèmes très asymétriques dont le bloc hydrophile est majoritaire.<sup>24</sup> Il est parfois nécessaire de procéder à la dissolution des copolymères dans de l'eau à une température supérieure à la T<sub>g</sub> des blocs hydrophobes afin de leur conférer une plus grande mobilité et de faciliter l'échange unimères/micelles.

#### **A-1-4-2 Méthode des « co-solvants » ou « dissolution indirecte »**

Pour des copolymères peu solubles dans l'eau, l'emploi d'un co-solvant organique miscible avec l'eau devient nécessaire. Cette technique comprend trois étapes. Dans un premier temps, le copolymère est solubilisé dans un solvant organique non sélectif (thermodynamiquement bon pour les deux blocs) miscible avec l'eau (DMF, DMSO, THF, acétone...). On ajoute ensuite progressivement l'eau, en contrôlant la vitesse et la quantité dans la phase organique, sous agitation. L'auto-organisation a lieu de manière progressive de façon à minimiser le contact entre les blocs hydrophobes et l'eau. La quantité d'eau à ajouter dépend à la fois de la concentration et de la masse molaire du copolymère.<sup>25</sup> Plus ces grandeurs sont élevées, plus la quantité d'eau à ajouter est faible. Par cette méthode, la morphologie des objets formés après micellisation n'est cependant pas nécessairement à l'équilibre thermodynamique. En effet, la taille et la forme des agrégats peut évoluer en fonction du temps, mais également en fonction de la quantité d'eau ajoutée.<sup>26</sup> La dernière étape consiste à éliminer le solvant organique par dialyse ou par évaporation s'il s'agit de solvants volatils. Bien que le protocole expérimental soit simple, il implique un nombre important de paramètres qui peuvent affecter l'auto-assemblage (schéma I-1).



**Schéma I-1** : Préparation d'agrégats micellaires par la méthode de « dissolution indirecte ». <sup>24</sup>

#### **A-1-4-3 Réhydratation de film**

Ce processus consiste à solubiliser le copolymère dans un solvant organique volatil pas nécessairement miscible avec l'eau, puis à évaporer ce dernier. Les chaînes polymères vont ainsi s'auto-assembler en masse dû à l'incompatibilité des deux blocs. Après avoir ainsi obtenu un film nano-organisé, la quantité d'eau nécessaire est ajoutée et la solution est agitée pendant au moins une semaine, avant d'être analysée. L'eau ajoutée provoque ainsi l'hydratation progressive du film induisant la formation de structures auto-assemblées dans l'eau à partir d'un système déjà pré-organisé. En fait, cette technique a d'abord été utilisée avec succès pour la préparation de vésicules unilamellaires issues de phospholipides. <sup>27</sup>

La préparation de nanostructures de copolymères à blocs obtenus par cette méthode de réhydratation de film a été récemment utilisée par Bates <sup>28</sup> et Discher <sup>29</sup> pour des copolymères PEO-*b*-PCL ayant une fraction massique en PCL comprise entre 0.3 et 0.7.

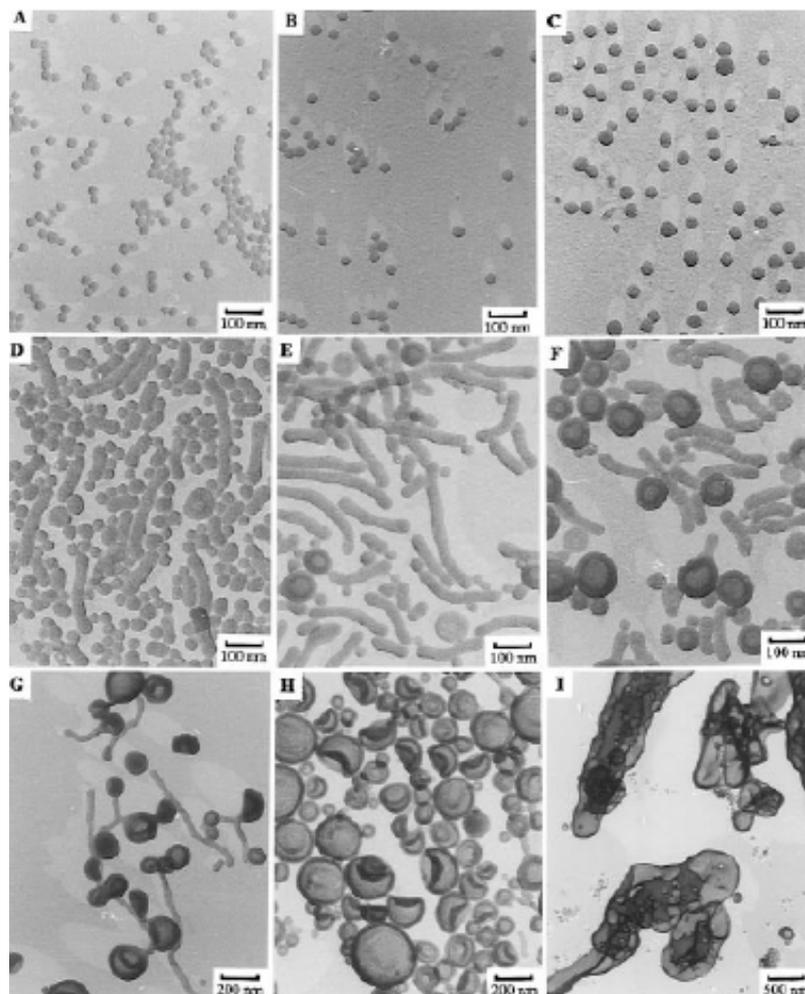
#### **A-1-4-4 Méthode de l'émulsification**

La méthode de l'émulsification « huile dans eau » pour la préparation de nanoparticules à base de copolymères à blocs nécessite tout d'abord la dissolution des composés dans un mélange contenant de l'eau et un solvant organique non miscible à l'eau (par exemple le dichlorométhane). Les blocs hydrophiles présentent ainsi une affinité pour la phase aqueuse alors que les segments hydrophobes sont dissous dans les nano-gouttes formées par la phase organique. Par conséquent, il est nécessaire d'agiter vigoureusement la solution afin d'obtenir une bonne dispersion de la phase organique dans une phase continue. L'utilisation des ultrasons est souvent requise pour optimiser cette dispersion. Les agrégats micellaires sont obtenus après élimination du solvant organique par évaporation ou par dialyse.

#### **A-1-4-5 Influence d'autres paramètres sur l'auto-assemblage**

Bien que la méthode de mise en solution des copolymères à blocs soit primordiale pour obtenir une morphologie ciblée, d'autres paramètres peuvent perturber le phénomène d'auto-assemblage. Par exemple, l'addition d'une espèce tel un sel, peut influencer la morphologie des

nanoparticules en solution. Ainsi, en ajoutant du NaCl dans une solution de copolymères PAA<sub>25</sub>-*b*-PS<sub>410</sub> à différentes concentrations, les auteurs ont observé l'évolution d'une morphologie de type « crew-cut » vers la formation en bâtonnets, puis de vésicules.<sup>30</sup> Le sel va, en effet, perturber le pouvoir stabilisant de la couronne hydrophile composée d'un polyacide faible chargé (figure I-7).



**Figure I-7** : Systèmes micellaires de PAA<sub>25</sub>-*b*-PS<sub>410</sub> obtenus sans présence de sel (A) et en présence de NaCl à différentes concentrations (en mmol/L) : (B) 1.1 ;(C) 2.1 ;(D) 3.2 ;(E) 4.3 ;(F) 5.3 ;(G) 10.6 ;(H) 16.0 ;(I) 21.0.<sup>30</sup>

### **A-1-5 Auto-assemblage de copolymères à blocs stimulables**

Dans cette partie, seul le cas des copolymères stimulables à double blocs hydrophiles a été considéré. De tels composés sont définis comme subissant des changements réversibles de propriétés en solution en réponse à une variation externe des conditions expérimentales. Cette variation peut être de nature physique ou chimique ; en provoquant un changement de morphologie, de solubilité, de la balance hydrophile/hydrophobe ou encore le relargage de molécules bioactives. Cela inclut aussi la combinaison de plusieurs de ces réponses en même temps. Pour ces raisons, les auto-assemblages à base de copolymères à blocs stimulables présentent un intérêt pour un certain nombre d'applications telles que la catalyse,<sup>31</sup> l'encapsulation et le relargage de

médicaments<sup>32,33,34,35,36</sup> ou plus généralement le domaine des nanosciences.<sup>37</sup> La possibilité de contrôler le processus d'assemblage des copolymères permet, en effet, de moduler leurs performances, par exemple, en confinant des sites catalytiques au sein du microenvironnement d'une micelle ou en provoquant le relargage sélectif de médicaments préalablement encapsulés.

De nombreux systèmes micellaires à base de copolymères à blocs stimulables ont été développés, notamment ceux répondant à des changements de température ou de pH,<sup>38,39,40,41,42</sup> particulièrement intéressants pour des applications biologiques en raison des différences de pH pouvant exister entre l'état « normal » et l'état pathologique. Par exemple, le pH extracellulaire des tumeurs<sup>43</sup> est légèrement plus acide que celui des cellules du sang ou des tissus sains.

D'un point de vue pratique, la préparation des agrégats micellaires consiste à d'abord solubiliser les chaînes copolymères dans l'eau. L'application du stimulus externe provoque ensuite un changement de solubilité d'un des blocs.

Deux catégories de stimuli peuvent être utilisées pour moduler la réponse d'un système polymère : d'une part, les stimuli dits chimiques comme le pH ou la force ionique, et d'autre part, les stimuli physiques affectant les interactions moléculaires grâce à des sources énergétiques, comme la température ou l'application d'un champ électrique.

Nous présenterons, dans un premier temps, les changements de conformation des chaînes macromoléculaires en réponse à un changement de température et/ou de pH, à travers des exemples significatifs. Nous étudierons les systèmes « multistimulables » parfois qualifiés de « schizophrènes », c'est à dire capables de former des micelles et des micelles inverses en fonction des contraintes extérieures.

### **A-1-5-1 Etude des copolymères à blocs présentant un bloc thermostimulable**

La température correspond au stimulus le plus utilisé pour perturber la solubilité des copolymères à blocs, et ce de manière réversible. On distingue deux cas de comportement : les polymères précipitant en chauffant (LCST : lower critical solution temperature) et, inversement, ceux qui se solubilisent en chauffant (UCST : upper critical solution temperature).

#### ***A-1-5-1-1 Polymères possédant une LCST***

En réalité, la plupart des polymères peuvent être solubilisés en élevant la température. D'autres en revanche s'agrègent. Cette propriété de solubilité inversement dépendante de la température est caractéristique des polymères qui se solubilisent par abaissement de la température, mais qui précipitent en augmentant la température au-delà d'une valeur critique notée LCST. Dans l'eau en particulier, cette température correspond au domaine sur le diagramme de phase où la contribution enthalpique des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et les chaînes polymères devient minoritaire devant le gain entropique du système. En fait, l'enthalpie  $\Delta H$  favorise la dissolution du polymère en raison des liaisons hydrogène formées entre les unités monomères et les molécules d'eau. En revanche, ces dernières sont incapables de créer des liaisons hydrogène avec les

groupements apolaires du polymère et doivent par conséquent se réorienter autour de ces domaines. Ce phénomène a pour effet de diminuer l'entropie de mélange  $\Delta S$ .

A haute température, le terme entropique domine le terme enthalpique. L'énergie libre de mélange, égale à  $\Delta H - T\Delta S$ , peut passer d'une valeur négative (favorable) à positive (défavorable) en augmentant la température. Le remplacement des interactions polymère-eau par des interactions polymère-polymère fait précipiter le polymère dans l'eau.

La température critique à laquelle se produit cette séparation de phase est évidemment dépendante de la structure des polymères, notamment la balance mettant en jeu les interactions hydrophiles/hydrophobes et les liaisons hydrogène. Taylor et Cerankowski ont proposé comme règle générale que la LCST est gouvernée par la balance hydrophile/hydrophobe du polymère.<sup>44</sup>

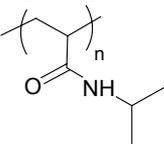
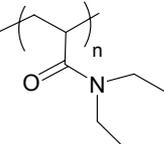
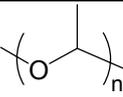
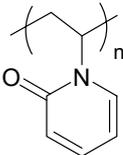
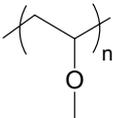
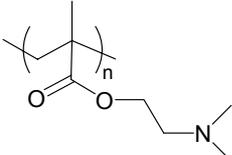
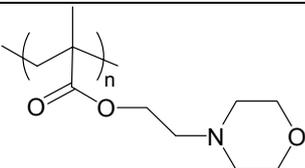
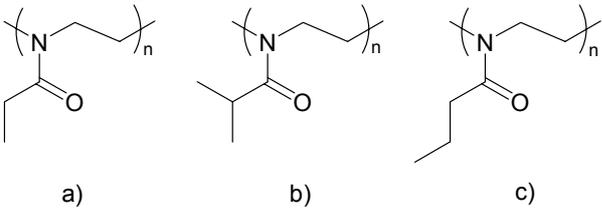
De nombreux polymères possédant une LCST ont déjà été étudiés comme indiqué dans le tableau I-2 présentant ceux les plus fréquemment utilisés.

Le PNIPAAm est de loin le polymère thermosensible le plus étudié dans la littérature. Il est connu, tout comme le PVCL et le PVME, pour former des mésoglobules dans l'eau,<sup>45,46</sup> dans des régimes de concentration dilués ou très dilués (1 à 1000ppm) pour des températures supérieures à sa LCST. Les chaînes polymères changent de conformation pour passer de pelote statistique thermodynamiquement stable, à basse température, à des « globules » mono- ou polymoléculaires en fonction de la concentration, à des températures supérieures à la valeur critique, sans précipitation du système. Ce phénomène est encore assez mal compris à ce jour.

Le régime très dilué (<1ppm) est décrit notamment par Wu et coll. ; on observe une transition « pelote-globule » qui correspond à la précipitation d'une seule chaîne de PNIPAAm.<sup>47,48</sup> Le régime est tellement dilué que la probabilité de contact entre deux globules est très faible.

Dans le régime semi-dilué (10-1000 ppm), Pelton et coll.<sup>49</sup> ont travaillé sur le PNIPAAm et ont montré la formation de particules de taille bien définie en élevant la température au-delà de la LCST. Lorsqu'on atteint une zone proche de la température critique du PNIPAAm, certaines chaînes collapsent et jouent le rôle de points de nucléation, et coagulent ensuite de manière homogène par attraction des forces de Van der Waals, jusqu'à devenir des particules stables en solution, appelées aussi des globules.

Il est important de rappeler que l'attraction des forces de Van der Waals entre deux particules en solution augmente proportionnellement avec leur diamètre. L'énergie potentielle de répulsion, quant à elle, augmente proportionnellement avec le carré de la taille. Par conséquent, au fur et à mesure qu'une particule grandit par agrégation en solution, les forces de répulsion augmentent plus rapidement que les forces d'attraction d'autant plus que le potentiel de charge est important.

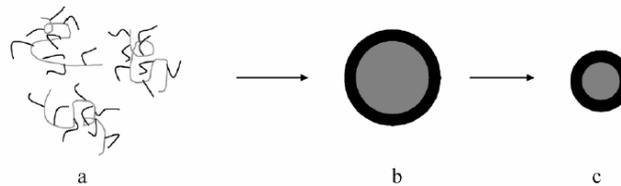
Polymères thermosensibles	Structures	LCST (°C)	ref
Poly (N-isopropylacrylamide) <b>PNIPAAm</b>		32	50
Poly (N,N'-diethylacrylamide) <b>PDEAAm</b>		25-32	51
Poly (oxyde de propylène) <b>PPO</b>		10-20	52
Poly (N-vinylcaprolactame) <b>PVCL</b>		32-40	53
Poly (methyl éther de vinyle) <b>PVME</b>		32-40	54
Poly (méthacrylate de 2-(diméthyle amino) éthyle) <b>PMADAME</b>		32-46	55
Poly (N-morpholino éthyl méthacrylate) <b>PMEMA</b>		34-54	56
Poly(2-oxazoline) : a) éthyl, b) i-propyl, c) n-propyl		a) 60 b) 38 c) 27	57,58,59

**Tableau I-2 : Liste (non exhaustive) d'homopolymères présentant une LCST.**

Dans le cas du PNIPAAm, le mécanisme de coagulation peut être évité avec des chaînes dotées à leur extrémité d'une charge introduite *via* l'amorceur, le persulfate d'ammonium. Ces résultats sont analogues avec les travaux d'Alexander et Napper qui ont synthétisé des particules de latex de polystyrène isométriques sans tensioactif par ce même mécanisme de nucléation-coagulation<sup>60</sup>. Toutes ces analyses sont basées sur l'approche DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek), développée dans les années 1940, qui décrit l'équilibre des forces entre surfaces dans un liquide combinant les effets attractifs de Van der Waals et de répulsions électrostatiques. De plus, il a

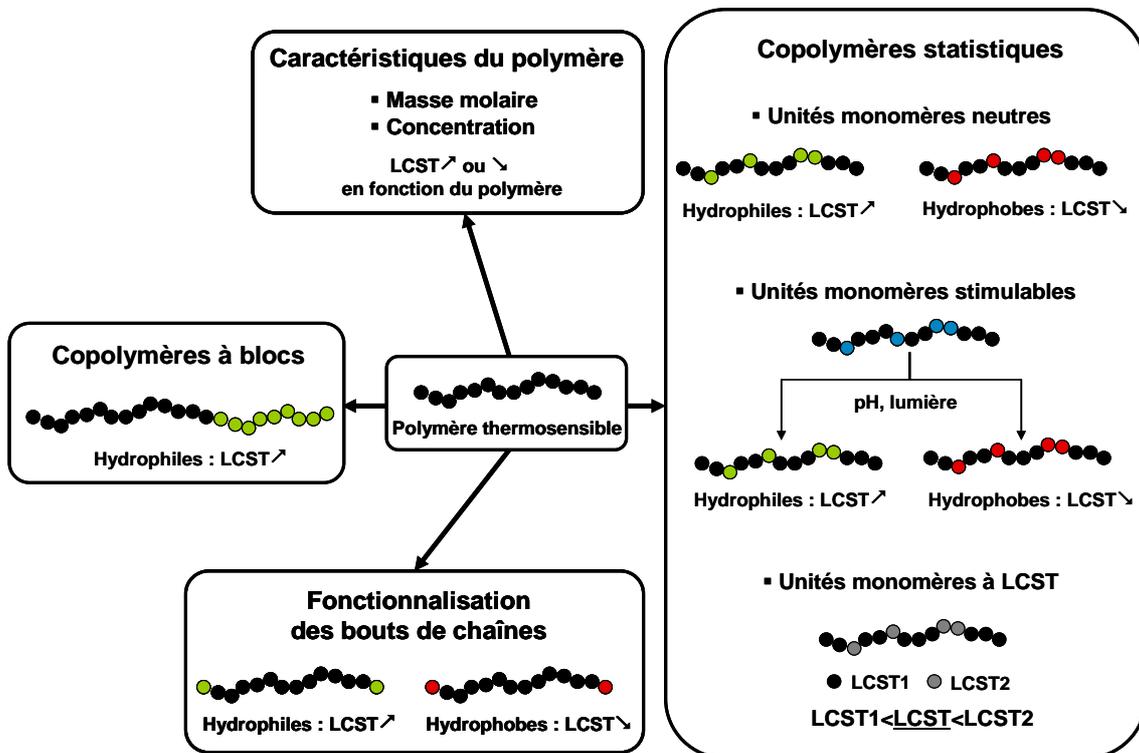
été montré que les forces d'attraction de Van der Waals restent faibles dans le cas de deux globules polymères à LCST en solution dans l'eau, même pour des températures supérieures à la LCST, car ils contiennent environ 75% d'eau.<sup>48</sup>

En revanche, pour les solutions concentrées, on observe une précipitation macroscopique du système. Afin de remédier à cela, l'homopolymère thermosensible, notamment le PNIPAAm, le PVCL ou encore le PVME, peut être lié à un polymère hydrophile stabilisant (à blocs, greffé, statistique) et ainsi permettre l'obtention de globules stables pour des concentrations plus importantes.<sup>46</sup> A basse température ( $T < LCST$ ), les chaînes copolymères sont présentes en solution aqueuse sous forme de pelote statistique (figure I-8 a). En chauffant au-delà de la LCST, le bloc hydrophobe précipite et des mésoglobules se forment, stabilisées par les unités hydrophiles, dont la taille peut varier de 50 à 300nm en fonction du degré d'hydratation de leur cœur hydrophobe (figure I-8 b). Si l'on continue d'augmenter la température, on observe un collapse des agrégats formés et donc une diminution de taille due à la déshydratation du cœur (figure I-8 c).<sup>61</sup>



**Figure I-8 : Modèle décrivant la formation de mésoglobules dans le cas de copolymères greffés PVCL-g-PEO en chauffant : a) 20°C, b) 45°C, c) 60°C<sup>61</sup>**

Il est possible de moduler la température critique d'un polymère thermosensible en faisant varier différents paramètres moléculaires, comme illustré dans le schéma I-2.



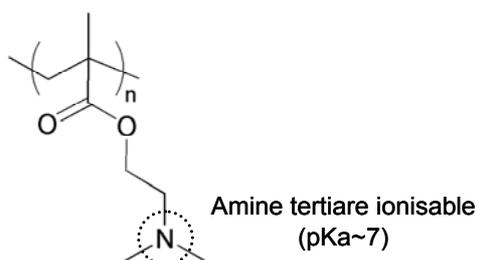
**Schéma I-2 : Paramètres pouvant influencer la LCST d'un polymère thermosensible.**

### A-1-5-1-1 Distribution des masses molaires

Il ressort que le contrôle des masses molaires peut être un facteur important. En effet, il a été montré que des polymères bien définis de faible dispersité des masses molaires synthétisés par polymérisation radicalaire contrôlée, possèdent des transitions de phase plus étroites que des composés polymoléculaires obtenus par polymérisation radicalaire « conventionnelle ».<sup>62</sup>

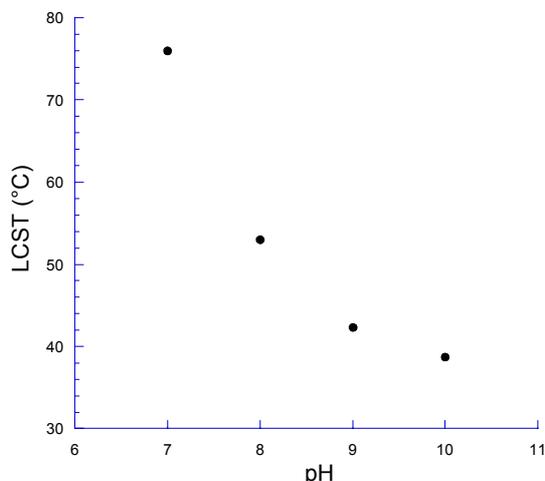
### A-1-5-1-2 Masse molaire

Le cas du polymère thermosensible PMADAME est intéressant, car sa LCST peut être modulée non seulement par la variation de sa masse molaire, mais également par changement du pH de la solution aqueuse (schéma I-3).



**Schéma I-3 : Structure chimique du PMADAME.**

Ce polymère est une polybase faible soluble dans l'eau à pH neutre et acide. En milieu basique, les groupements amines tertiaires sont déprotonés conférant au polymère une LCST entre 32 et 47°C, en fonction de la masse molaire et du pH. Par exemple, à pH=8, la LCST varie de 47 à 32°C lorsqu'on augmente la masse molaire de 950 à 24600 g.mol<sup>-1</sup>, du fait de la variation de la balance hydrophile/hydrophobe.<sup>55</sup> Ici, le caractère hydrophobe est apporté par les fonctions diméthyle de l'amine tertiaire. La LCST de la PMADAME peut être également modifiée par simple variation du pH, comme l'ont montré Müller *et al.* (figure I-9).<sup>63</sup>



**Figure I-9 : Evolution de la LCST d'une solution aqueuse de PMADAME<sub>133</sub> (c=0.1% mas.) en fonction du pH.<sup>55</sup>**

On remarque que la LCST de la PMADAME augmente lorsque le pH diminue, en raison de la protonation progressive des groupements amines augmentant le caractère hydrophile du polymère modifié. La raison physique de cette augmentation de solubilité vient du fait que les contre ions compensent la charge totale des chaînes polymères et possèdent un grand degré de liberté dans la solution en raison de leur entropie translationnelle élevée. Cela conduit à une augmentation de la solubilité du polymère, puisque le mouvement de ce dernier dépend de celui des contre ions.<sup>64</sup>

Une autre méthode de choix pour moduler la LCST d'un polymère est d'avoir recours à la copolymérisation statistique ou séquentielle. Différents types d'unités peuvent en effet être incorporés à la chaîne principale de façon à modifier la balance hydrophile/hydrophobe.<sup>44,65,66,67,68,72,73</sup>

### A-1-5-1-1-3 Copolymérisation statistique avec des unités monomères neutres

La copolymérisation statistique d'un monomère formant un polymère à LCST avec un monomère hydrophile tend à augmenter la LCST du copolymère statistique ainsi généré. Inversement, la copolymérisation avec un monomère hydrophobe diminue la LCST par rapport à l'homopolymère de référence. Par exemple, la copolymérisation du NIPAAm avec un monomère hydrophile (acrylamide, Am) ou hydrophobe (N-test butyl-acrylamide, N-tBAAm) conduit à des valeurs de LCST très différentes (figure I-10).<sup>69</sup>

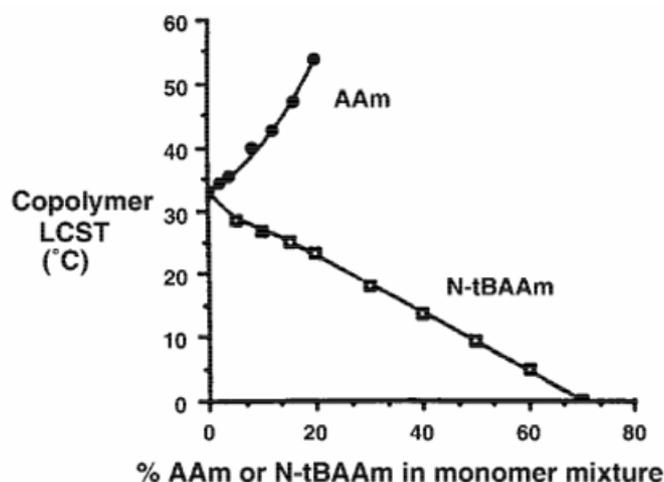


Figure I-10 : Effet de la copolymérisation du NIPAAm avec de l'acrylamide (comonomère hydrophile) et du N-test butyl-acrylamide (comonomère hydrophobe).<sup>69</sup>

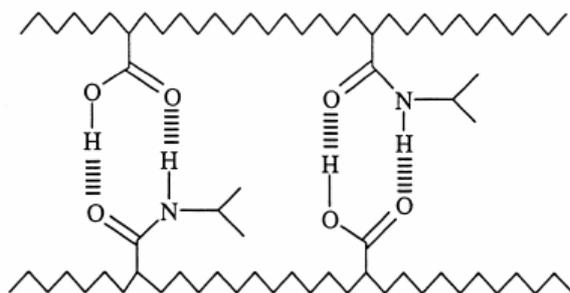
Hennink et al. ont décrit la copolymérisation du NIPAAm avec le méthacrylate de monolactate de 2-hydroxyéthyle (HEMA-monolactate : monomère hydrophobe) porteur de groupements pendants lactates hydrolysables. Ceci a pour effet de diminuer la LCST jusqu'à 12°C en fonction de la fraction en monomères hydrophobes. Le fait d'hydrolyser ensuite les groupements hydrophobes lactates tend à ré-augmenter le caractère hydrophile du système, par conséquent à augmenter la LCST.<sup>70</sup>

#### **A-1-5-1-4 Copolymérisation statistique d'unités monomères ayant des LCST différentes**

Une autre voie consiste à copolymériser de manière statistique deux monomères dont les homopolymères correspondants possèdent chacun une LCST. Ainsi, la température critique va osciller entre deux valeurs, en fonction de la fraction de chacun des deux blocs.<sup>71,72,73</sup> Par exemple, Lutz et al.<sup>72</sup> ont proposé la synthèse d'un copolymère statistique à base de deux monomères de différentes LCST : le méthacrylate de 2-(2-méthoxyéthoxy)éthyle (MEO<sub>2</sub>-MA) et l'oligo méthacrylate d'éthylène glycol (OEGMA), présentant une LCST de 26°C et de 90°C, respectivement. Les auteurs ont montré que la variation de la température critique du copolymère varie linéairement avec sa composition. Il est donc possible d'ajuster la température critique entre 26 et 90°C simplement en jouant sur la composition du mélange initial des monomères.

#### **A-1-5-1-5 Copolymérisation statistique avec des unités stimulables**

Il est également possible d'incorporer des unités monomères dont la solubilité sera modifiée par l'application d'un autre stimulus que la température, comme par exemple le pH comme déjà indiqué avec l'exemple de la PMADAME. Comme autre exemple, la copolymérisation statistique du NIPAAm avec des unités d'acide acrylique : les auteurs ont montré l'influence du pH sur la LCST du copolymère.<sup>74,75</sup> Pour des pH < pKa de l'acide acrylique (~4.2), la température critique diminue avec le pH et est inférieure à celle de l'homopolymère PNIPAAm du fait de l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaires entre les unités NIPAAm et acide acrylique protonées, ce qui augmente le caractère hydrophobe du copolymère (schéma I-4). Au-delà de pH=4.2, la majorité des unités PAA sont ionisées ce qui tend à augmenter l'hydrophilie du système ; par conséquent la LCST devient trop importante pour être mesurée expérimentalement.



**Schéma I-4 : liaisons hydrogène intermoléculaires entre les unités NIPAAm et acide acrylique.<sup>74</sup>**

Lee et al. ont également mis en évidence la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires entre les unités MADAME et acrylamide. Plus le taux d'unités acrylamide est élevé, plus les liaisons hydrogène sont nombreuses, par conséquent la LCST diminue du fait de l'augmentation du caractère hydrophobe du copolymère.<sup>76</sup>

De manière plus originale, des études ont montré que la LCST peut être affectée par l'introduction d'unités monomères changeant de conformation sous l'action de la lumière. La capacité de certains composés à répondre à la fois à la température et à la lumière a été introduite dans le

milieu des années 80 avec le cas des gels de polyacrylamide renfermant des groupements chromophores azobenzènes.<sup>77</sup> L'irradiation à  $\lambda=350-400\text{nm}$  provoque un changement de conformation *trans-cis*. La conformation *trans* confère au polymère un caractère plus hydrophobe provoquant l'abaissement de la LCST du polyacrylamide ; inversement lorsque les groupements azobenzènes sont sous leur conformation *cis*.<sup>78,79,80,81</sup>

### **A-1-5-1-1-6 Copolymérisation séquentielle**

La copolymérisation séquentielle d'un polymère thermosensible permet également de faire varier la LCST mais de façon moins sensible que dans le cas de la copolymérisation statistique. Différentes équipes ont observé que l'ajout d'un bloc hydrophile peut, en effet, augmenter le caractère hydrophile du copolymère résultant, augmentant par conséquent sa LCST.<sup>38,82,83,84</sup> Le système PNIPAAm-*b*-poly(acide glutamique) (PNIPAAm-*b*-PGA) a été étudié et une LCST vers 38-39°C a été mesurée, soit une augmentation de 6-7°C par rapport à l'homopolymère PNIPAAm.<sup>83</sup> D'autres auteurs ont montré le même comportement en faisant varier la composition.<sup>84</sup>

### **A-1-5-1-1-7 Incorporation de groupement aux extrémités de chaînes**

L'incorporation de groupements hydrophiles ou hydrophobes aux extrémités de chaînes d'un polymère thermosensible est un autre moyen de modifier notablement sa LCST.<sup>85</sup> En effet, le phénomène d'agrégation commence tout d'abord par les extrémités de chaînes du fait de leur grande mobilité.<sup>38</sup> Okano et al. ont ainsi montré l'influence de l'incorporation de groupements hydrophiles et hydrophobes terminaux sur la LCST du PNIPAAm, par comparaison avec les résultats d'une copolymérisation statistique. Concernant l'incorporation d'entités hydrophobes, la LCST diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente (PNIPAAm- $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$ ,  $n=3, 6, 8, 12, 18$ ).<sup>86</sup> Inversement, l'incorporation d'entités hydrophiles aux extrémités des chaînes de PNIPAAm tend à augmenter la LCST de façon très importante ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ).<sup>87</sup> Comme attendu, la variation de la LCST dépend toutefois de la nature chimique du groupement terminal. L'influence d'un groupement alcool est ainsi beaucoup plus importante que celle d'une fonction amine, ce qui est corrélé avec la possibilité de formation de liaisons hydrogène avec les molécules d'eau.

### **A-1-5-1-2 Systèmes micellaires basés sur la LCST**

La propriété de changement de solubilité dans l'eau en fonction de la température a été mise à profit pour développer des systèmes micellaires à base de copolymères à blocs capables de s'agréger de manière réversible. Les micelles à couronne thermosensible sont généralement issues de l'auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles. Discutons sur le cas de micelles dont le cœur est formé par le bloc thermostimulable associé à des blocs hydrophiles (non stimulables). Pour des températures inférieures à la LCST du bloc thermosensible, le copolymère à blocs est sous forme de chaînes libres. L'augmentation de température provoque l'agrégation des blocs thermosensibles et la formation d'agrégats stabilisés par les blocs hydrophiles empêchant la précipitation du système.

Différentes morphologies ont été mises en évidence selon la nature du bloc hydrophile associé au bloc thermosensible, généralement le PNIPAAm.

Les mésoglobules correspondent à la morphologie la plus répandue. A titre d'exemple, les copolymères à blocs PNIPAAm-*b*-PEO conduisent à des mésoglobules par agrégation des blocs PNIPAAm et stabilisation par les blocs PEO.<sup>88,89,90</sup> D'autres systèmes double hydrophiles ont été développés.<sup>91,92,93</sup> Le polymère N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide (PHPMA), par exemple a été utilisé lors de l'étude du copolymère PNIPAAm-*b*-PHPMA. La taille et la masse molaire des particules formées à partir de l'auto-assemblage des copolymères à blocs PNIPAAm-*b*-PHPMA diminuent avec la fraction de HPMA dans le copolymère.<sup>93</sup>

Mc Cormick et al. ont été les premiers à décrire la formation de vésicules polymères en chauffant une solution aqueuse de copolymères à double blocs hydrophiles,<sup>94</sup> PNIPAAm-*b*-poly(méthacrylamide de N-(3-amino propyle) hydrochloride) (PNIPAAm-*b*-PAMPS). Ils ont montré que la vitesse de chauffe est un paramètre crucial pour l'obtention de telles vésicules. Pour obtenir une distribution en taille étroite, la solution doit être chauffée à 0.1°C/min (schéma I-5). A une concentration de 5mg/mL, une augmentation de la température de 25 à 45°C sur 5min conduit à une distribution en taille plus large.

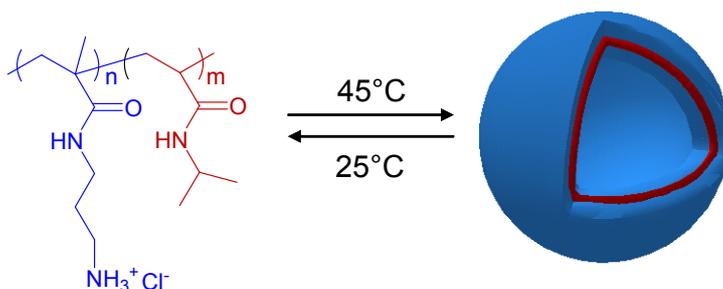


Schéma I-5 : Formation de vésicules à partir du copolymère à blocs PMAPS-*b*-PNIPAAm.<sup>94</sup>

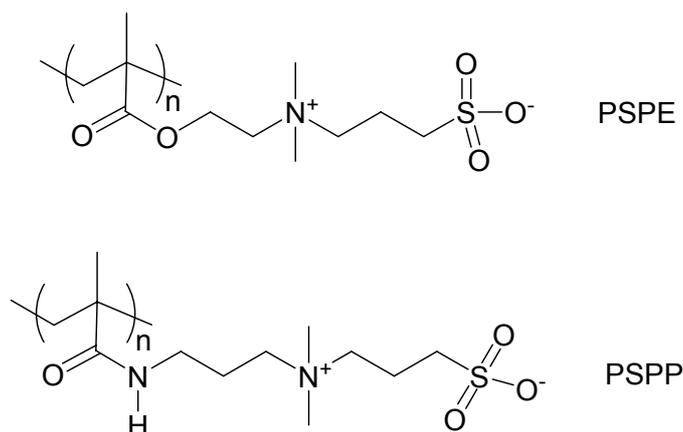
Les mêmes auteurs ont également obtenu cette morphologie pour le système à double blocs thermosensibles PNIPAAm-*b*-PMADAME.<sup>95</sup> Les études ayant été menées à pH=7.4, la LCST de la PMADAME est très élevée et par conséquent ce bloc ne joue le rôle que du bloc hydrophile dans ces conditions. Le système PNIPAAm-*b*-PEO a également été synthétisé avec un ratio permettant un auto-assemblage sous forme de vésicules.<sup>96</sup>

### A-1-5-1-3 Polymères possédant une UCST

Ici sont décrits les polymères dont la solubilité dans l'eau augmente en élevant la température. Ces polymères doivent leur insolubilité, à basse température, à la présence d'interactions électrostatiques intra- et intermoléculaires. Ils appartiennent à la famille des polyélectrolytes zwitterioniques c'est-à-dire qu'ils possèdent à la fois des charges positives et négatives. Ils se différencient des polyampholytes (polymères possédant également les deux charges) par le fait que les deux charges sont portées par la même unité monomère.<sup>97,98,127</sup>

Les polysulfobetaines sont des polymères zwitterioniques, ayant la particularité de posséder une UCST dans l'eau. Ces polymères possèdent en position latérale, un groupement protoné

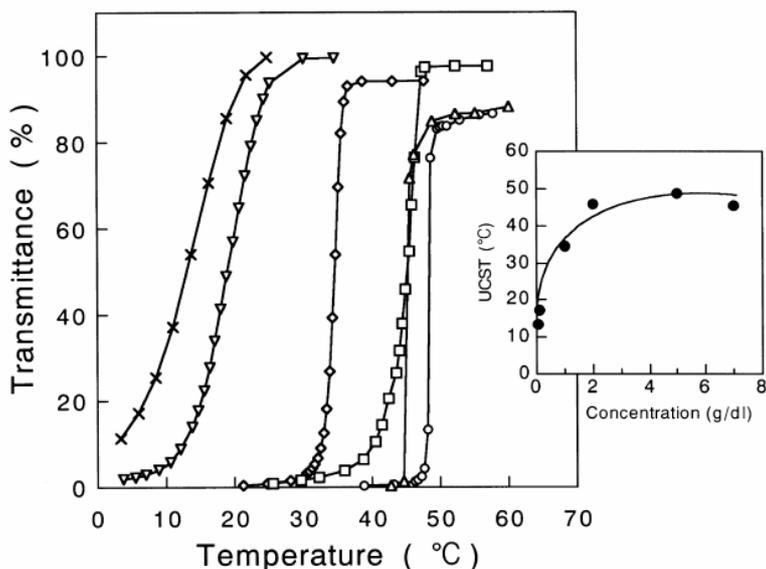
(généralement une fonction amine tertiaire) et un groupement sulfate,  $\text{SO}_3^-$ , chargé négativement. Ces deux charges sont séparées par  $n$  groupements méthylènes dont le nombre varie ( $n= 2, 3$  ou  $4$ ). A basse température, ces polymères sont insolubles en raison de la présence d'interactions électrostatiques intra- et intermoléculaires qui se rompent par un apport d'énergie thermique, c'est-à-dire par augmentation de la température au-delà de la valeur critique (UCST). Les deux polysulfobetaines les plus étudiés dans la littérature sont le poly(méthacrylate de 2-(méthyle amino) éthyle)propane sultone (PSPE, également noté PDMAPS) et le poly(méthacrylamide de 2-(méthyle amino) éthyle)propane sultone (PSPP) dont les structures sont illustrées ci-dessous (schéma I-6).



**Schéma I-6 : Structure chimique des polysulfobetaines : PSPE et PSPP**

Le PSPE et le PSPP présentent une UCST vers  $15^\circ\text{C}$ <sup>99</sup> et vers  $10^\circ\text{C}$ ,<sup>100</sup> respectivement. Comme précédemment, il est possible de moduler, comme pour la LCST, la température critique (UCST) à travers la variation de divers paramètres.

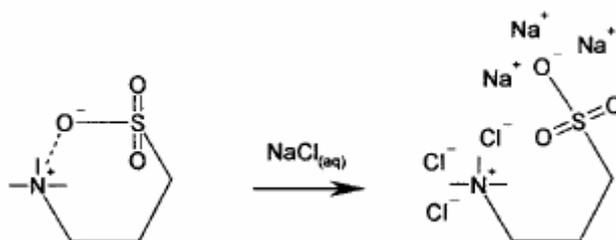
La UCST est par exemple dépendante à la fois de la concentration et de la masse molaire du polymère. Le fait d'augmenter une de ces deux variables d'ajustement a pour effet d'accroître les interactions intra- et interchaînes augmentant ainsi la température critique. Schulz et al. ont été les premiers à étudier ces paramètres sur le comportement en milieu aqueux du PSPE et à montrer leur influence sur sa UCST.<sup>101</sup> La UCST du PSPE augmente d'environ  $40^\circ\text{C}$  lorsqu'on augmente sa concentration en solution de  $0.05$  à  $7\text{g/dL}$ , comme le montre la figure I-11.<sup>102</sup>



**Figure I-11** : Evolution de la UCST du PSPE mesurée à différentes concentrations : ( $\times$ ) 0.05g/dL, ( $\nabla$ ) 0.1g/dL, ( $\diamond$ ) 1g/dL, ( $\square$ ) 2g/dL, ( $\circ$ ) 5g/dL, ( $\Delta$ ) 7g/dL.<sup>102</sup>

Bendejacq et al. ont confirmé ce comportement en réalisant un diagramme de phase UCST=f( $\phi$ pol) des deux polymères.<sup>103</sup>

Une des propriétés remarquables en solution aqueuse des polyzwitterions est l'augmentation de leur solubilité par ajout d'un électrolyte simple (généralement NaCl) : c'est l'effet antipolyélectrolyte.<sup>103</sup> Comme expliqué précédemment, les deux charges opposées portées par la même unité monomère interagissent provoquant ainsi l'agrégation du polymère dans l'eau à basse température. L'ajout de sel va induire un écrantage des charges se traduisant par une expansion des chaînes polymères (schéma I-7). L'addition de sel augmente donc la solubilité de ces polymères diminuant ainsi la température critique.

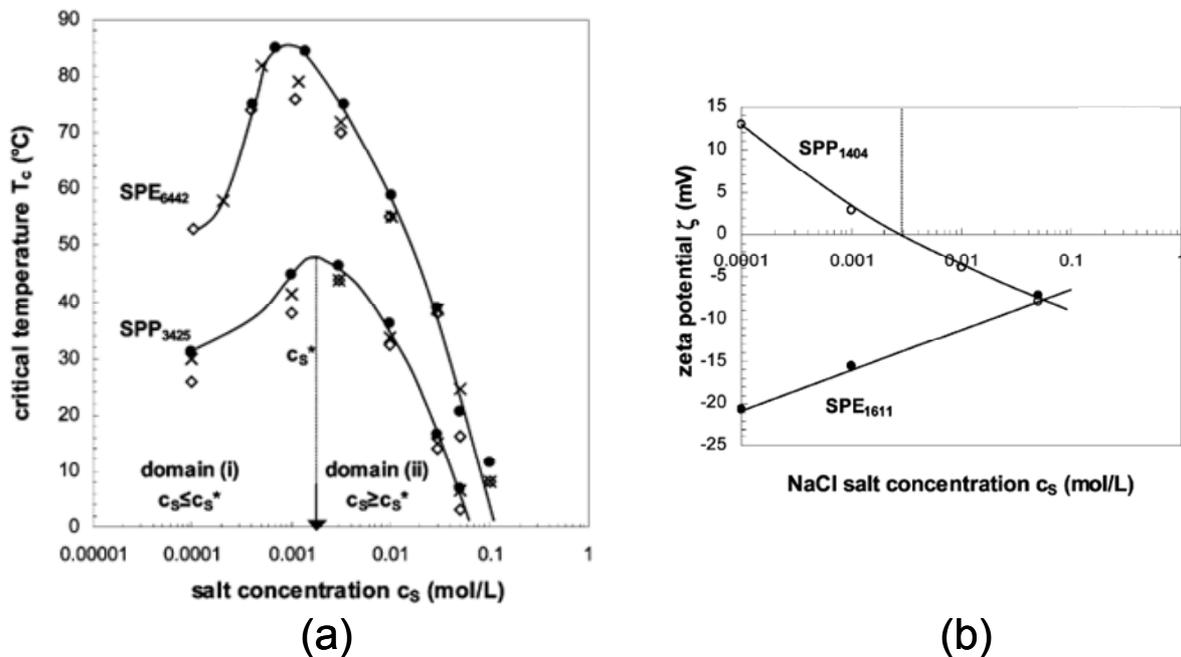


**Schéma I-7** : Interactions intramoléculaires avec et sans sel (NaCl).<sup>104</sup>

Cet écrantage est expliqué par l'effet Coulomb : l'ajout de sel diminue la longueur de Debye, c'est-à-dire la distance jusqu'à laquelle deux charges ont un effet l'une sur l'autre. Cependant, l'ajout d'une petite quantité de NaCl ( $<5 \cdot 10^{-2}$  mol/L) permet d'augmenter la LCST. Ceci a été observé en 1987 sans avoir toutefois été expliqué.<sup>105</sup> Puis, Tam et al. ont étudié le comportement en milieu aqueux du PSPE-*b*-C<sub>60</sub>, avec et sans sel, en fonction de la température.<sup>106</sup> Les auteurs ont noté que la

UCST du système, égale à 32°C pour une force ionique nulle, augmentait jusqu'à environ 50°C pour  $c_s \sim 2 \cdot 10^{-2} M$ . En dessous de la température critique, les interactions électrostatiques entre les charges opposées rendent le polymère insoluble dans l'eau. L'augmentation de la température critique par ajout de sel est due à l'écrantage de la faible quantité de paires d'ions non complexées. Ceci a pour effet de diminuer la solubilité des chaînes polymères dans l'eau en augmentant la proportion d'interactions électrostatiques. Puisque la température critique est liée à l'énergie thermique nécessaire pour rompre ces interactions, la UCST du polymère est supérieure en présence d'une petite quantité de sel qui atteint une valeur limite lorsque la UCST est maximum. Cette concentration correspond à la situation où tous les ions libres du polymère sont écrantés par les sels. Au-delà de cette valeur, la UCST tend à diminuer, jusqu'à 13°C pour  $c_s = 1M$ , car les interactions électrostatiques intra- et intermoléculaires sont écrantées en facilitant la solubilisation du polymère.

Plus récemment, des études montrant des résultats similaires ont été réalisées avec le PSPE et le PSPP.<sup>103</sup> (figure I-12 a)



**Figure I-12 : Influence de la concentration en NaCl (a) sur la UCST et (b) sur la valeur du potentiel zêta du PSPE<sub>6442</sub> et du PSPP<sub>3425</sub> pour différentes fraction massiques en polymère :  $w_p = (\diamond) 0.0006, (\times) 0.0012, (\bullet) 0.003$ .**<sup>103</sup>

En se basant sur des mesures de potentiel zêta, les auteurs ont expliqué l'augmentation de la température critique pour de faibles concentrations en sels. Ils ont mis en évidence des asymétries de charges dans le domaine des faibles concentrations en sels ( $< 2 \cdot 10^{-3} M$ ) : positives pour le PSPP et négatives pour le PSPE. Les auteurs ont avancé que cet excès de charges négatives pour le PSPE était dû à l'hydrolyse partielle des unités SPE en unités acide acrylique durant la polymérisation (cette réaction secondaire a été confirmée par RMN). Concernant l'excès de charges positives, il pourrait être la conséquence d'une quaternisation incomplète, mais ceci n'a pas été réellement démontré. Dans les deux cas, ces excès de charges sont compensés par l'ajout de NaCl.

L'augmentation du potentiel zêta pour le PSPE<sub>1611</sub> (figure I-12 b) ne peut être dû qu'à la complexation préférentielle des ions Na<sup>+</sup> avec les groupements sulfonates SO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Les amines tertiaires -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N<sup>+</sup>- laissées libres vont alors compenser l'asymétrie de charges en se complexant avec les unités acides acryliques, ce qui se traduit par une augmentation de la température critique. Inversement, le potentiel zêta du PSPP<sub>1404</sub> diminue en rajoutant NaCl : cette fois, ce sont les ions Cl<sup>-</sup> qui complexent préférentiellement les groupements amines laissant cette fois libres les entités sulfonates. Ces dernières vont alors compenser l'asymétrie de charges en interagissant avec les fonctions amines tertiaires non quaternisées en provoquant également une augmentation de la UCST.

Il a été montré que les groupements sulfonates interagissent préférentiellement avec les fonctions amines quaternaires -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N<sup>+</sup>- plutôt qu'avec les ions Cl<sup>-</sup>.<sup>107</sup> Ceci permet de comprendre pourquoi les ions Na<sup>+</sup> et non Cl<sup>-</sup> se complexent avec les chaînes de PSPE (schéma I-8)



Schéma I-8 : Interactions des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> avec le PSPE

Les amines quaternaires du PSPE sont « plus électropositives » que celles du PSPP en raison, d'une part, du groupement ester plus électronégatif et, d'autre part, du moindre nombre de groupements CH<sub>2</sub> reliant ce groupement ester à la fonction ammonium. De ce fait, les amines du PSPE sont plus à même de se lier avec des anions, c'est-à-dire avec les groupements sulfonates. Ceci explique pourquoi les ions Cl<sup>-</sup> complexent plus facilement les fonctions amines quaternaires du PSPP que celles du PSPE (schéma I-9)

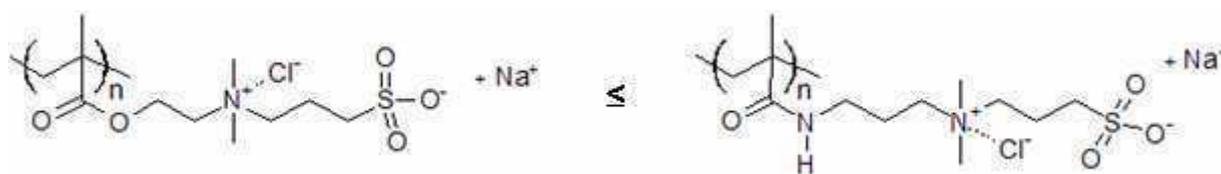
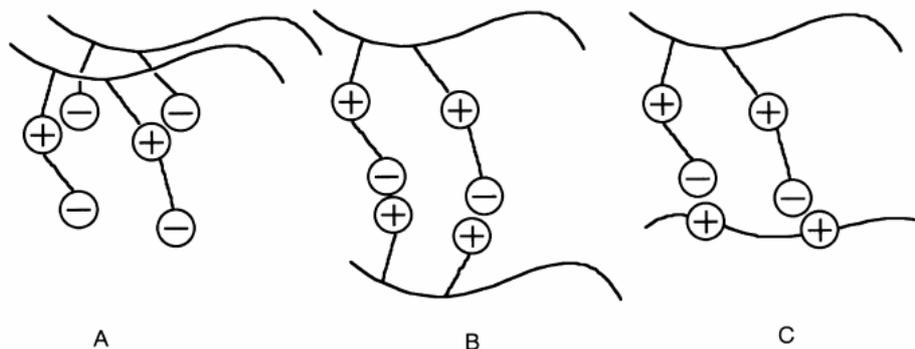


Schéma I-9 : Interactions des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> avec le PSPE (à gauche) et le PSPP (à droite)

La UCST d'une polysulfobetaine peut également être modifiée par l'introduction dans la solution aqueuse d'un polyélectrolyte anionique ou cationique. Osada et al.<sup>102</sup> ont étudié la complexation du PSPE avec le poly(2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonique) (polyAMPS : anionique), le polyN-[3-(diméthylamino)propyl]acrylamide chlorure (PDMAPAA-Q : cationique) et le x, y-ionène bromure (x=3, 6 ; y=3, 4 : cationique) dans l'eau. La UCST diminue notablement pour de faibles quantités du polyanion polyAMPS ajoutées (1 mM) à la solution de PSPE, et disparaît pour des concentrations plus importantes. Ce changement de température critique indique clairement la

présence de fortes interactions. L'addition du polycation PDMAPAA-Q avec un ratio de  $R=0.17$ , (avec  $R$  le ratio molaire entre le polyélectrolyte et le PSPE) provoque la chute de la UCST de  $65^{\circ}\text{C}$  à  $15^{\circ}\text{C}$ . Le mélange avec l'ionène cationique montre un comportement similaire de la UCST avec également un minimum pour une valeur de  $R\sim 0.1-0.17$ . Ainsi, lorsque le ratio  $R$  concernant l'ajout de polycations augmente, la UCST décroît tout d'abord, passe par un minimum puis augmente. Même si il est difficile d'appréhender les différents effets observés entre l'ajout de polyanions et polycations, la géométrie des complexes de polyélectrolytes peut être mise en avant, selon les auteurs, pour expliquer ces phénomènes (schéma I-10).



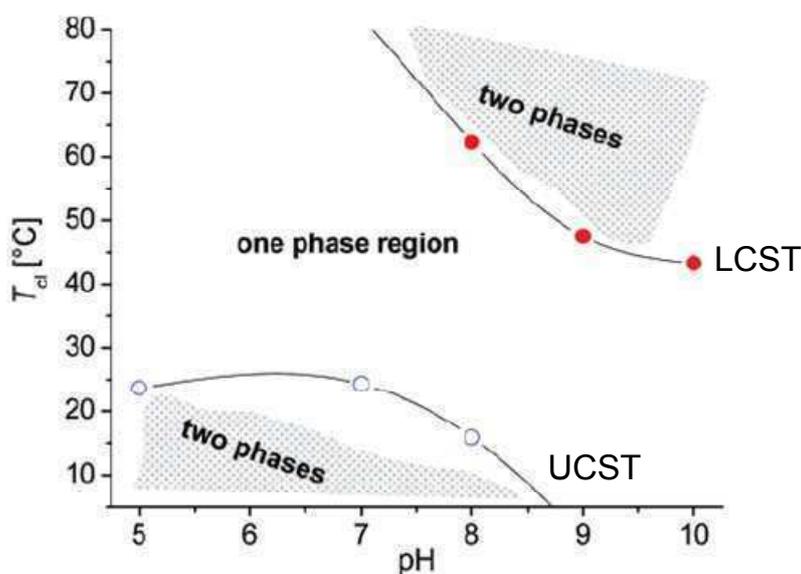
**Schéma I-10 : Complexation du PSPE avec : (A) un polyanion, (B) un polycation, (C) un polycation ionène.<sup>102</sup>**

La solubilité du complexe pourrait être due aux groupements anioniques libres du PSPE (schéma I-9 A), ce qui tendrait à diminuer la UCST. En revanche, la complexation du PDMAPAA-Q et du ionène avec le PSPE se fait par l'intermédiaire des groupements sulfonates du PSPE (schéma I-9 B et C). Les groupements ammoniums du PSPE seraient entourés par deux chaînes principales hydrophobes, diminuant leur capacité à solubiliser le complexe. De plus, cet effet tend également à diminuer la mobilité des chaînes, c'est-à-dire l'entropie ; ainsi, la UCST augmente.

Une autre méthode permettant d'obtenir des systèmes à UCST consiste à complexer des polyélectrolytes avec des ions multivalents. En règle générale, les complexes polymères-polymères demeurent trop stables pour être déstabilisés par augmentation de la température à des valeurs inférieures à la température d'ébullition du solvant. Jiang et al.<sup>108</sup> ont rapporté récemment le comportement dans l'eau du système poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(2-vinylpyridine protonée) (PEO-*b*-P2VPH<sup>+</sup>)-persulfate de potassium ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). A pH acide ( $\text{pH}=1.3$ ), le bloc P2VP est chargé positivement dû à la protonation des groupements latéraux. Ainsi, les interactions entre charges positives de ce bloc et les ions divalents  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  vont former le cœur des micelles, la couronne étant constituée par les blocs PEO. Par analogie avec les polysulfobetaines, l'élévation de température au-delà de  $40^{\circ}\text{C}$  conduit à la rupture de ces interactions et à la solubilisation totale du copolymère.

Suivant la même idée, la PMADAME, polymère connu pour avoir une LCST en solution ( $\sim 40^{\circ}\text{C}$ ), a été complexée avec des ions trivalents à base de cobalt : l'hexacyanocobaltate(III)  $[\text{Co}(\text{CN})_6]^{3-}$  dans un régime de pH où les fonctions amines tertiaires latérales sont protonées

(pH<9).<sup>109</sup> La UCST peut ainsi être modulée en jouant sur la concentration en ions trivalents. Par exemple, elle évolue de 10°C à 25°C lorsque la concentration en ions  $[\text{Co}(\text{CN})_6]^{3-}$  est augmentée de 0.5 à 4 mM. La PMADAME étant également sensible au pH, la valeur de la UCST peut aussi varier avec ce paramètre expérimental. Comme montré sur la figure I-13, le polymère complexé possède une UCST uniquement dans la gamme de pH où il est protoné c'est-à-dire pour des valeurs inférieures à pH=9.



**Figure I-13 : Evolution de la UCST (○) et de la LCST (●) du PMADAME<sub>100</sub> ; 1.2mM  $[\text{Co}(\text{CN})_6]^{3-}$  en fonction du pH.<sup>109</sup>**

L'originalité de ce système vient du fait qu'il possède à la fois une UCST, apportée par la complexation entre le polymère chargé et les ions trivalents, et une LCST, comme indiqué précédemment.

### **A-1-5-2 Etude des copolymères à blocs présentant un bloc sensible au pH**

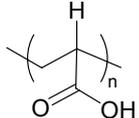
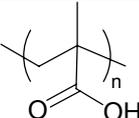
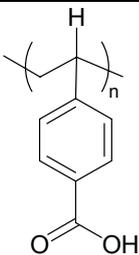
Le pH est l'autre stimulus de choix pour manipuler la conformation des chaînes polymères. Ceux possédant des groupements latéraux ionisables présentent un caractère acido-basique au sens de Brønsted, et répondent à un changement de pH. Lorsqu'ils sont chargés, on les appelle polyélectrolytes. De façon analogue au cas des polymères thermosensibles, la transition de phase réversible se produit à une valeur critique du pH noté pH\*.

Ainsi, une chaîne polyélectrolyte en milieu aqueux passe d'une conformation étirée due aux répulsions électrostatiques à une conformation de pelote statistique plus ou moins compacte, par modification du pH. Lorsque la chaîne polymère n'est pas chargée, le polymère est hydrophobe et l'on se retrouve dans une situation analogue à celle d'un polymère neutre.

**A-1-5-2-1 Les polyacides faibles**

Les polyacides subissant une transition ionisation/déionisation pour des pH compris entre 4 et 8 sont utilisés comme polymères sensibles au pH. Ceux portant un groupement carboxylique avec un pKa de 5-6, sont les acides faibles les plus représentatifs. Ils sont transformés en polyélectrolytes à pH basique avec des répulsions électrostatiques entre les chaînes macromoléculaires et sont neutres à pH acide.

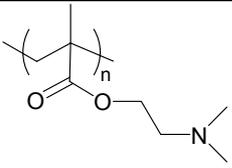
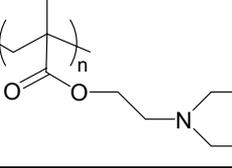
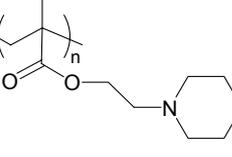
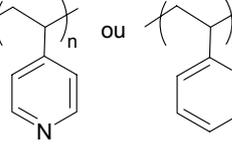
Parmi ces polyacides faibles, le poly(acide acrylique) (PAA)<sup>110</sup> et le poly(acide méthacrylique) (PMAA)<sup>111</sup> sont les plus fréquemment employés dans la littérature. Le PMAA montre une transition de phase plus nette que son homologue PAA. En effet, le groupement méthyle est à l'origine de l'effet hydrophobe, par conséquent, les chaînes adoptent une conformation plus compacte à pH acide que dans le cas du PAA. Plus le polymère est hydrophobe, plus sa conformation en solution est compacte en dessous du pH\*. D'autres exemples de polyacides sont donnés dans le tableau I-3.

Polyacides faibles	Structures	pKa	ref
Poly (acide acrylique) PAA		4.5	110
poly (acide méthacrylique) PMAA		5.3	111
poly (acide 4-vinyl benzoïque) PVBA		7.1	112

**Tableau I-3 : Polyacides les plus étudiés.**

**A-1-5-2-2 Les polybases faibles**

Le poly(méthacrylate de 2-(méthyle amino) éthyle) (PMADAME)<sup>111</sup> et le poly(méthacrylate de 2-(éthyle amino) éthyle)<sup>113</sup> (PMADAE) sont des exemples de polybases sensibles au pH. Ils contiennent des groupements aminés pouvant être protonés en milieu acide. Ils sont donc transformés en polyélectrolytes à pH acide. Comme indiqué précédemment, le groupement éthyle du PMADAE induit un effet hydrophobe plus important que dans le cas de la PMADAME. D'autres exemples de polybases sont indiqués dans le tableau I-4.

Polybases faibles	structures	pKa	ref
Poly (méthacrylate de 2-(diméthyle amino) éthyle) PMADAME		8	111
Poly (méthacrylate de 2-(diéthyle amino) éthyle) PMADAE		7.3	113
Poly (méthacrylate de N-éthyl morpholino) PMEMA		4.9	113
Poly (4 ou 2-vinylpyridine) PVP		5.9	114

**Tableau I-4 : Polybases les plus étudiées.**

#### **A-1-5-2-3 Paramètres permettant de moduler pH\***

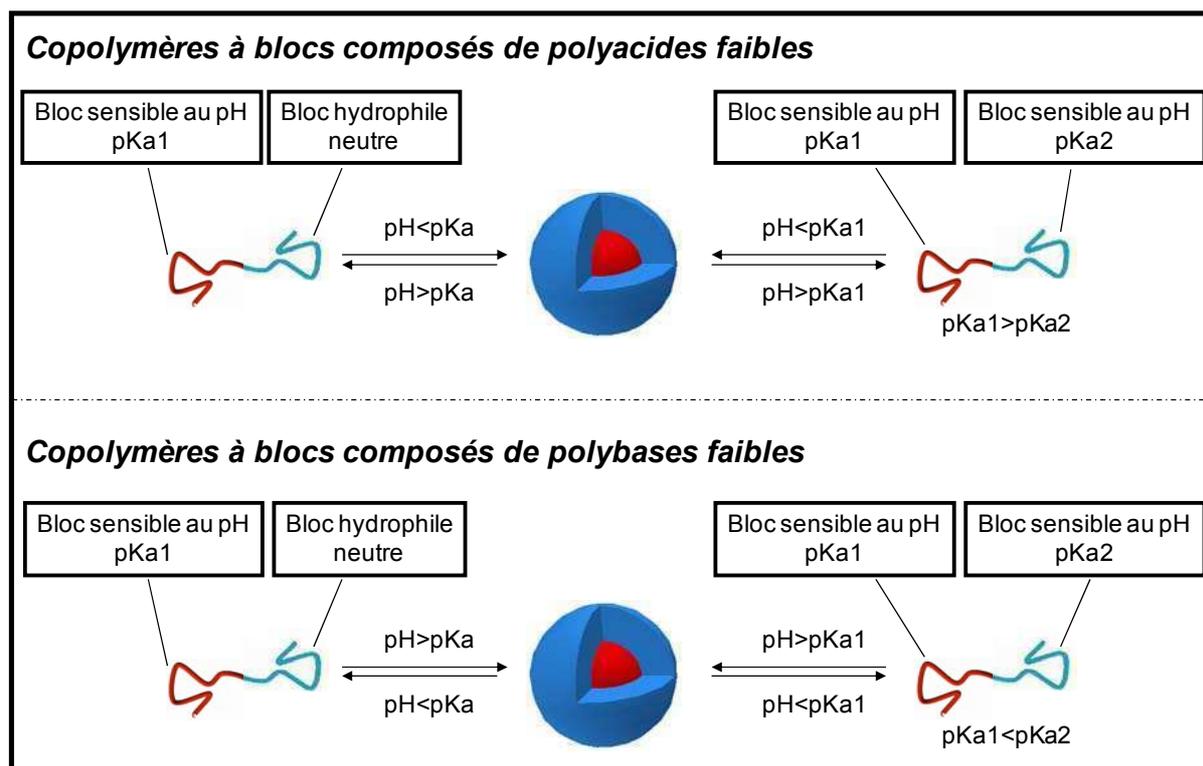
De même que pour la température, il est essentiel de cibler le pH au pH\* en vue d'applications spécifiques. La gamme de pH à laquelle la transition de phase se produit peut être modulée par deux stratégies : par introduction des groupements ionisables dont le pKa est proche de la gamme de pH désirée ou bien en incorporant des groupements hydrophiles ou hydrophobes dans le polymère.

La valeur intrinsèque du pKa doit être adoptée comme première considération dans le choix d'un polymère sensible au pH pour l'application désirée. Cependant, le pKa, valeur du pH à laquelle la moitié des groupements sont ionisés, est relié au pH\*, mais la transition de conformation à pH\* n'a pas lieu exactement à pKa. Cette transition est gouvernée par la balance entre les répulsions électrostatiques et l'effet hydrophobe.

Pour une polybase faible, incorporer des groupements hydrophobes tend à diminuer pH\*. Au contraire, pH\* augmente pour les polyacides.<sup>110</sup>

#### **A-1-5-2-4 Systèmes micellaires basés sur un changement de pH**

La micellisation induite par un changement de pH représente également une voie intéressante pour la formation d'agrégats en milieu aqueux. Parmi les nombreux systèmes développés, on peut distinguer ceux comprenant un cœur hydrophobe formé par un bloc sensible au pH (polyacide ou polybase) et une couronne stabilisante neutre<sup>114,115,116,117</sup> et ceux composés de deux blocs ionisables ayant des pKa différents (figure I-14).<sup>118,119,120,121,122</sup>



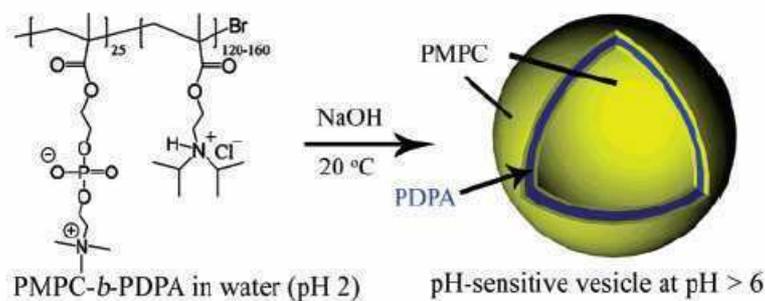
**Figure I-14** : Différentes voies d'accès à l'obtention de nanoparticules formées par l'auto-assemblage de copolymères à blocs sensibles au pH.

Webber s'est par exemple intéressé au système P2VP-*b*-PEO.<sup>114</sup> A pH acide, les groupements amines du P2VP sont protonés rendant le copolymère entièrement soluble, c'est-à-dire à l'état d'unimères en solution. L'addition de NaOH provoque la déprotonation des entités ionisées jusqu'à atteindre la valeur critique pH\* où les blocs P2VP s'agrègent pour former le cœur hydrophobe des micelles.

L'influence du taux de charge de la couronne hydrophile ainsi que l'ajout de sel ont également été analysés sur des micelles de polyélectrolytes.<sup>119</sup> Pour cela, les auteurs ont utilisé trois blocs différents pour former la couronne : un bloc neutre, PEO, un bloc moyennement chargé, PMADAME et un très fortement chargé, PMADAME quaternisée avec du chlorure de benzyle (Q-PMADAME) en gardant le même bloc hydrophobe PMADAEE. Les micelles sont donc formées à pH basique, c'est-à-dire lorsque les blocs de PMADAEE sont déprotonés. La taille des micelles formées est gouvernée à la fois par le nombre d'agrégation et par le gonflement de la couronne. Une augmentation du taux de charges diminue le nombre d'agrégation du cœur hydrophobe des micelles et accentue le gonflement de la couronne, du fait des répulsions électrostatiques. L'ajout de sel, quant à lui, va provoquer des comportements opposés en écrantant les charges.

On distingue également les systèmes micellaires stabilisés par une couronne zwitterionique, par exemple, le système poly[2-(méthacryloyloxy)éthyl de phosphorylcholine]-*b*-poly(méthacrylate de 2-(diisopropyle amino)éthyle) (PMPC-*b*-PDPA). Les chaînes de PMPC-*b*-PDPA sont à l'état

d'unimères à pH acide car les blocs PDPA sont protonés et donc hydrophiles. En augmentant le pH entre 5 et 7, les chaînes PDPA se déprotonent et deviennent hydrophobes conduisant à la formation de micelles<sup>123</sup> ou de vésicules<sup>124</sup> (schéma I-11) en fonction de la fraction volumique en PDPA.



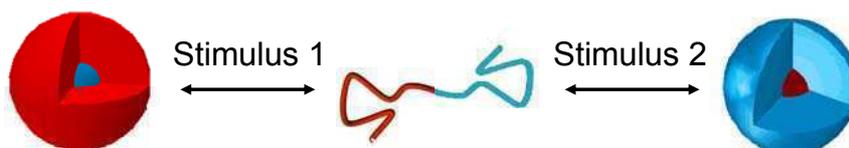
**Schéma I-11 : Formation des vésicules à partir du copolymère PMPC-b-PDPA.<sup>124</sup>**

Le PSPE peut également être utilisé comme polymère zwitterionique pour stabiliser des micelles formées par changement de pH. Des copolymères PSPE-*b*-PMADAEe et PSPE-*b*-PDPA ont été étudiés dans l'eau en fonction du pH. Tous les deux forment des micelles sphériques à pH > 8.<sup>125</sup>

Il est important de rappeler que les copolymères à blocs formés à partir de polybases ou de polyacides faibles s'auto-assemblent de manière réversible, tant que la concentration en sels n'excède pas une valeur de l'ordre de 0.5-1M. En effet, le fait d'introduire NaOH ou HCl dans la solution engendre une augmentation de la concentration en sel (NaCl). Par conséquent, plus le nombre de cycles augmentation/diminution du pH est élevé, plus la concentration en sel augmente en favorisant l'écrantage des charges des chaînes polyélectrolytes, ce qui entraîne une conformation plus compacte des chaînes. Lorsque les charges sont complètement écrantées, on se retrouve alors dans la situation d'un polymère neutre, c'est-à-dire de conformation de type pelote statistique.

### **A-1-5-3 Systèmes multistimulables**

Il s'agit maintenant d'étudier l'association de deux polymères stimulables dans une structure de copolymères à blocs (figure I-15). Nous allons nous intéresser, dans un premier temps, aux composés multistimulables par variation du pH et de la température qui seront notés : pH-pH, température-pH et température-température.



**Figure I-15 : Obtention de nanoparticules obtenues par l'auto-assemblage de copolymères à blocs multistimulables**

Armes a qualifié ces systèmes de « schizophrènes »<sup>126</sup>. En effet, en se plaçant dans des conditions telles que les deux blocs soient solubles, ces copolymères à blocs ont la capacité de s'auto-assembler pour former des systèmes micellaires directs ou inverses, et de manière réversible en fonction des paramètres extérieurs.

Nous donnerons aussi quelques exemples de systèmes multistimulables comportant un bloc sensible au pH ou à la température, associé à un bloc sensible à un autre stimulus, par exemple la force ionique.

### **A-1-5-3-1 pH-pH**

Nous nous intéressons ici aux copolymères à blocs constitués d'un polyacide et d'une polybase capables de s'auto-assembler dans l'eau pour former des micelles et des micelles inverses en fonction du pH. On les qualifie de polyampholytes dans la mesure où ils possèdent à la fois des charges positives et négatives.

Mc Cormick et Lowe ont passé en revue le comportement en milieu aqueux de ces systèmes.<sup>127</sup> Une des caractéristiques des polyampholytes (en particulier ceux possédant des unités acides et basiques) est liée à la présence d'un point isoélectrique en solution, désigné PI. Ce point est défini comme la valeur du pH à laquelle le polyampholyte est électriquement neutre.<sup>127</sup> La solubilité au PI est très dépendante de la composition du copolymère. Par exemple, les polyampholytes à base de polymères statistiques ont tendance à être solubles au PI alors que ceux constitués par des copolymères à blocs sont solubles en deçà et au-delà du PI mais précipitent aux alentours de cette valeur caractéristique.<sup>127</sup>

La valeur du PI peut être mesurée expérimentalement par différentes techniques, typiquement par des mesures de potentiel zêta, en mesurant la charge globale du système à différents pH. La valeur pour laquelle la charge s'annule correspond au PI. Une autre méthode consiste à mesurer l'absorbance ( $\lambda=550\text{nm}$ ) d'une solution de polyampholytes en fonction du pH. Pour des valeurs proches du PI, la solution devient turbide en raison des attractions électrostatiques entre les charges opposées provoquant la formation de gros agrégats en solution. Le PI correspond au pH indiquant le milieu de la zone d'agrégation. Des mesures de viscosité peuvent également permettre de déterminer le PI. En effet, au PI, les chaînes de polyampholytes sont électriquement neutres et présentent donc une conformation compacte ce qui se reflète par le fait que la viscosité réduite ( $\eta_{\text{red}}$ ) passe par un minimum. Aux pH inférieurs et supérieurs, la charge globale devient préférentiellement positive ou négative. Ainsi, la viscosité réduite augmente car les chaînes adoptent une conformation plus étirée du fait des répulsions électrostatiques.

Le PI peut enfin être calculé à partir d'équations théoriques prenant en compte le pKa des deux unités monomères ainsi que le rapport molaire des unités acides et basiques.<sup>111</sup>

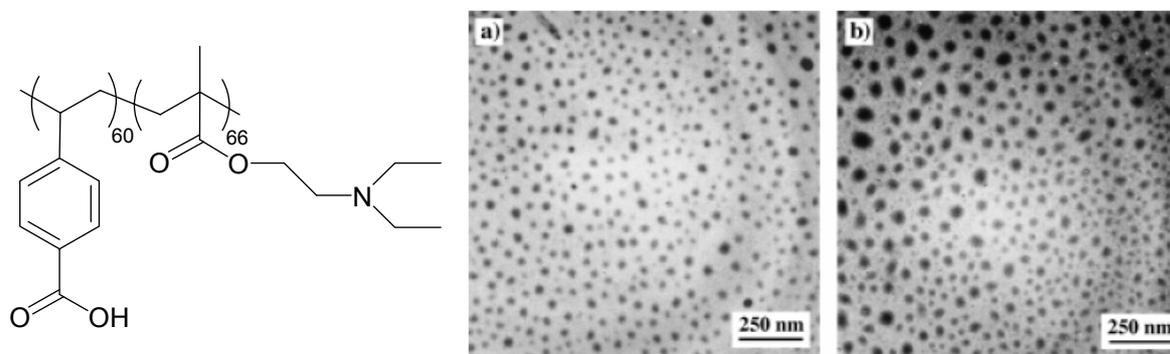
Concernant les polyampholytes riches en fonctions acides, Patrickios et al. ont proposé d'utiliser l'équation :

$$pH_{PI} = pKa - \log \left[ \frac{R}{2} \left\{ -\frac{1-R}{R} + \left( \left( \frac{1-R}{R} \right)^2 + \frac{4}{R} 10^{(pKa-pKb)} \right)^{1/2} \right\} \right]$$

Alors que pour les polyampholytes contenant une majorité de fonctions basiques, l'équation est :

$$pH_{PI} = pK_b + \log \left[ \frac{1}{2} \left\{ \frac{1-R}{R} + \left( \left( \frac{1-R}{R} \right)^2 + \frac{4}{R} 10^{(pK_a - pK_b)} \right)^{1/2} \right\} \right]$$

Différents systèmes « schizophrènes » répondant au pH ont été développés, par exemple le PMADAE**E**-*b*-poly(4-vinylbenzoïque) (PMADAE**E**-*b*-PVBA).<sup>128</sup> A pH = 2, les blocs PMADAE**E** sont protonés et solubles dans l'eau contrairement à ceux neutres à base de PVBA qui précipitent et forment le cœur hydrophobe de micelles. A pH = 10, on observe un comportement inverse et la formation de micelles à cœur de PMADAE**E** stabilisées par une couronne de PVBA chargée négativement.



**Figure I-16 : Clichés de TEM a) micelles à cœur de PMADAE**E** à pH=10 ; b) micelles à cœur de PVBA à pH=2 à partir du copolymère PVBA<sub>60</sub>-*b*-PMADAE**E**<sub>66</sub>.<sup>128</sup>**

Des clichés obtenus par TEM ont confirmé l'obtention de micelles sphériques (figure I-16). A des pH intermédiaires, typiquement entre 6.8 et 8.3, la valeur de la charge globale du système est proche de zéro, par conséquent les blocs s'agrègent conduisant à la formation d'agrégats dont le diamètre est supérieur au micron comme l'indiquent les mesures de tailles observées par diffusion de la lumière.

Les mêmes auteurs ont décrit un comportement identique pour le système PMADAE**E**-*b*-PSEMA (le PSEMA résulte de la réaction de l'anhydride succinique sur le poly(méthacrylate de 2-(hydroxy éthyle)) en fonction du pH.<sup>129</sup>

Comme discuté précédemment, la balance hydrophile/hydrophobe d'un polyélectrolyte oriente sa conformation en solution. Tam et al. ont mis en évidence cette propriété sur le système PMADAE**E**-*b*-PMAA.<sup>130</sup> Les micelles formées à pH = 2 ont un diamètre hydrodynamique plus important ( $R_H = 50\text{nm}$ ) que celles formées à pH = 10 ( $R_H = 20\text{nm}$ ). Une explication possible est que la conformation des blocs PMADAE**E** à pH basique est plus compacte que celle des segments PMAA à pH acide. L'ajout de sel a permis de vérifier cette hypothèse, car le sel a deux effets : il permet d'écranter les charges de la couronne hydrophile mais également de déshydrater le cœur de PMAA par différence de pression osmotique. Ainsi, 0.2M de sel suffisent à diviser par deux la taille des micelles à pH = 2.

En revanche, l'ajout de sel n'a quasiment aucun effet sur la taille des cœurs de PMADAEAE du fait de leur conformation très compacte.

De façon plus surprenante, le système PMADAME-*b*-PMAA a également montré des propriétés « schizophrènes » en fonction du pH.<sup>131</sup> Le bloc PMADAME possède une LCST vers 35-40°C à pH basique donc reste normalement soluble à température ambiante. Les auteurs ont toutefois observé la formation d'objets de diamètre compris entre 150 et 200 nm à pH = 10-12 pour le copolymère PMAA<sub>11</sub>-*b*-PMADAME<sub>49</sub>. Ils expliquent ce résultat par le fait que la température critique du PMADAME est diminuée jusqu'à une valeur proche de la température ambiante par l'ajout d'un bloc PMAA chargé. Ce résultat est toutefois en contradiction avec ceux issus de l'étude sur le même système et ayant montré que la formation de micelles à pH basique avait lieu à 50°C et non pas à température ambiante.<sup>132</sup>

### A-1-5-3-2 Température-pH

La capacité d'un copolymère à blocs à répondre à la fois à un effet de pH et de température élargit encore les possibilités d'utilisation de ces composés. Plusieurs groupes se sont ainsi focalisés sur l'étude de tels systèmes.<sup>133,134,135,136</sup>

Liu *et al.* ont par exemple synthétisé le système PPO-*b*-PMADAEAE qui a la faculté de former des micelles et des micelles inverses en fonction du pH et de la température.<sup>133</sup> A 5°C et pH = 6.5, le copolymère se dissout sous forme de chaînes libres. En augmentant le pH à pH > 8.5 par ajout de NaOH, on rend le bloc PMADAEAE insoluble en entraînant la formation de micelles sphériques à cœur de PMADAEAE. La formation de micelles sphériques inverses, c'est à dire à cœur de PPO, est aussi réalisable en augmentant la température de la solution d'unimères à 40°C à pH = 6.5. La détermination des valeurs de pH et T critiques pour la formation des micelles est obtenue par DLS (figure I-17).

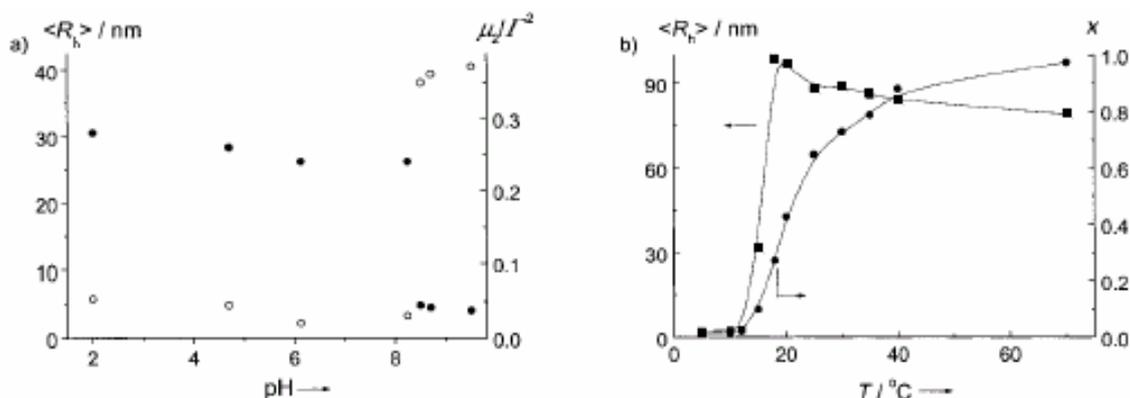


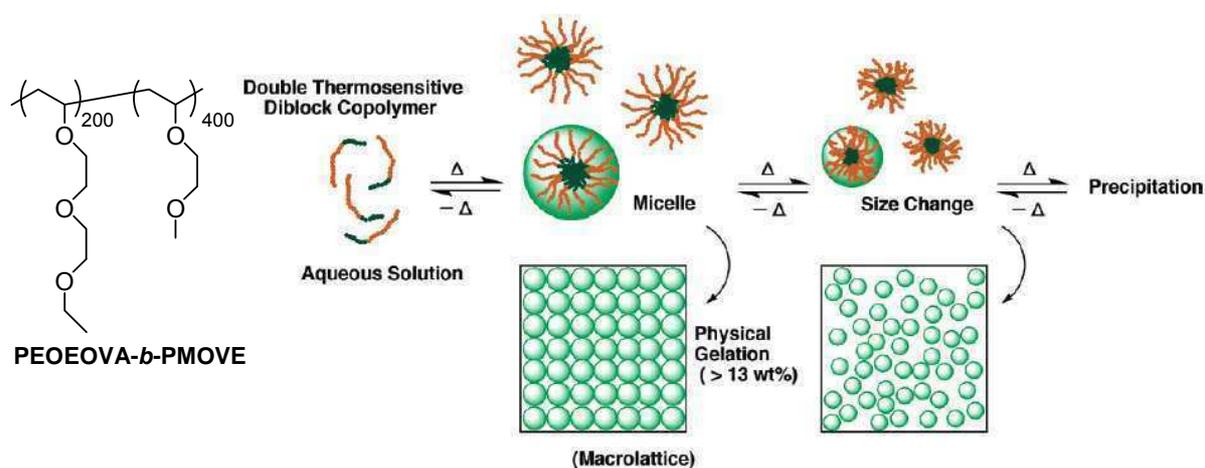
Figure I-17 : (a) Variation du rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) (○) et indice de dispersité (●) en fonction du pH pour un copolymère PPO<sub>33</sub>-*b*-PMADAEAE<sub>42</sub> en milieu aqueux à 5°C; (b) Variation de l'intensité diffusée par DLS  $X$  (●) et du rayon hydrodynamique (■) en fonction de la température pour le même dibloc à pH 6.5.<sup>133</sup>

### **A-1-5-3-3 Température-température**

On peut distinguer deux familles de copolymères à blocs : ceux à double LCST<sup>137,138,139,140,141</sup> et ceux possédant un bloc à LCST et l'autre à UCST.

#### **A-1-5-3-3-1 LCST-LCST**

Donc, on observe deux transitions de phase différentes : une première provoquant la précipitation du bloc ayant la LCST la plus basse en formant des micelles stabilisées par le deuxième bloc encore hydrophile. L'augmentation progressive de la température fera précipiter le deuxième bloc. Aoshima et al. ont synthétisé des copolymères à blocs vinyliques avec des groupements esters pendants de longueurs et de LCST différentes. Le poly[2-(2-éthoxy)éthoxyéthyle vinyl éther]-*b*-poly(2-méthoxyethylvinyl éther) (PEOEOVE-*b*-PMOVE) présente notamment quatre comportements différents en fonction de la température (figure I-18).<sup>138</sup>



**Figure I-18 : Structure chimique et comportement en milieu aqueux d'une solution de PEOEOVA-*b*-PMOVE en fonction de la température.**<sup>138</sup>

A faible température ( $< 20^\circ\text{C}$ ), le copolymère est soluble dans l'eau car les deux blocs sont hydrophiles. Entre 42 et  $55^\circ\text{C}$ , le PEOEOVE s'agrège (LCST $\sim 41^\circ\text{C}$ ) et forme le cœur hydrophobe des micelles formées. Une augmentation de la concentration au-delà de 13% wt. laisse place à la formation d'un gel qui redevient liquide entre 57 et  $63^\circ\text{C}$  en raison de la déshydratation partielle de la couronne PMOVE (LCST $\sim 70^\circ\text{C}$ ) et donc de la diminution des tailles des particules. Enfin, au-delà de  $63^\circ\text{C}$ , on observe une précipitation du composé, les deux blocs étant entièrement déshydratés.

#### **A-1-5-3-3-2 LCST-UCST**

L'autre famille concerne donc des copolymères à blocs plus rares ayant une LCST et une UCST. En fonction de la température, ils sont ainsi capables de former des micelles et des micelles inverses en passant par un état intermédiaire où les polymères adoptent une conformation de chaînes libres. Laschewsky et al. ont été les premiers à décrire de tels composés porteurs d'un bloc à LCST, le PNIPAAm, et d'un autre à UCST, le PSPP.<sup>142,143</sup> Les auteurs ont montré la formation de micelles et de micelles inverses par des mesures de diffusion de lumière, notamment en observant une

augmentation de l'intensité diffusée en dessous 10°C et au-delà de 32°C. D'autres systèmes aux mêmes comportements ont par la suite été étudiés.<sup>144,145</sup>

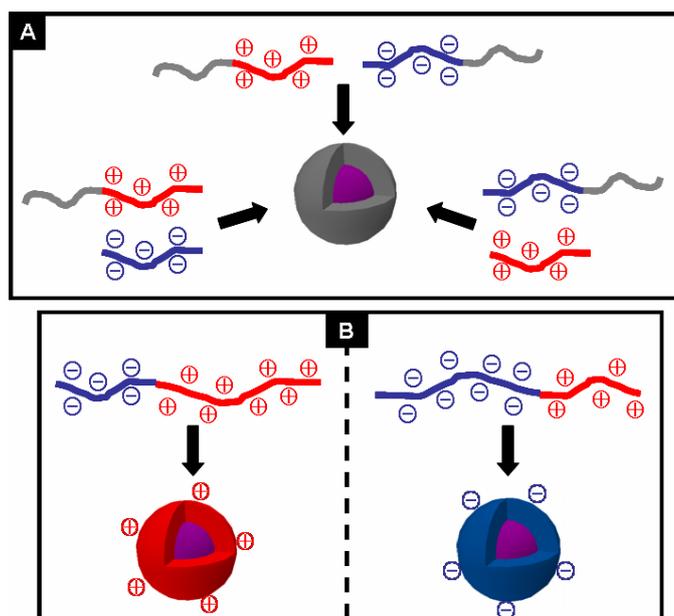
#### ***A-1-5-3-4 Autres type de stimuli***

Il est possible de combiner la température ou le pH avec un autre stimulus, par exemple la force ionique. Le PMEMA est, comme nous l'avons mentionné précédemment, un polymère possédant une LCST à pH basique entre 34 et 54°C, en fonction de sa masse molaire. Ce polymère est également capable de précipiter pour des pH intermédiaires, typiquement vers pH=6.7, par addition d'électrolyte, plus précisément de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'intérêt de ce polymère est qu'il peut être associé soit à une polybase<sup>56,113</sup> soit à un polyacide.<sup>112,146</sup> Les micelles à cœur de PMEMA se forment à pH=6.7 en présence de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) et les micelles inverses, à pH basique dans le premier cas, et à pH acide dans le deuxième cas.

## ***A-2 Auto-assemblage guidé par les complexations électrostatiques***

La formation de liaisons électrostatiques entre polyélectrolytes de charges opposées est l'autre force motrice principale pour l'auto-assemblage de copolymères à blocs en solution. Parmi toutes les études basées sur les complexes électrostatiques,<sup>147</sup> nous nous sommes intéressés aux complexes polyioniques (PIC) c'est-à-dire aux agrégats formés par la complexation électrostatique de copolymères chargés. Ces complexes sont également parfois appelés complexes de blocs ionomères (BIC) ou complexes interpolyélectrolytes (IPEC).

La figure I-19 montre les différentes possibilités pour obtenir ces complexes polyioniques à partir de copolymères diblocs. La première (A) se réfère aux systèmes capables de former des agrégats électrostatiques solubles dans l'eau grâce à la présence des blocs hydrophiles neutres. Ces systèmes nécessitent la stoechiométrie des charges portées par les deux composés différents. L'autre possibilité (B) est d'utiliser des polyampholytes asymétriques où l'excès d'une des charges va permettre la stabilisation des objets formés par complexation.



**Figure I-19** : Différentes voies d'accès aux agrégats électrostatiques solubles dans l'eau issus de l'auto-assemblage de copolymères diblocs.

Si on s'intéresse d'abord aux systèmes comportant un bloc hydrophile neutre, il est intéressant de noter que les complexes qu'ils forment sont stables sur une gamme de pH plus importante par comparaison avec les complexes polyélectrolytes des homopolymères correspondants. L'équipe de Kataoka s'est beaucoup intéressée à la formation de nanoparticules par complexation électrostatique<sup>148,149,150,151,152,153</sup> notamment au système PEO-*b*-PLys / PEO-*b*-PAsp. Pour des degrés de polymérisation similaires, le mélange des copolymères conduit, pour une valeur de pH intermédiaire (7.29), à la formation de micelles électrostatiques dont le cœur est formé par complexation entre les blocs PAsp chargés négativement et les blocs PLys chargés positivement, les chaînes de PEO formant la couronne stabilisante. En synthétisant des tailles de blocs rigoureusement identiques, les auteurs ont obtenu des vésicules électrostatiques, appelées « PICsomes ».<sup>151</sup> Pour cela, ils ont utilisé le même copolymère à blocs précurseur PEO-*b*-poly( $\beta$ -benzyl-L-aspartate) (PEO-*b*-PBLA), qu'ils ont ensuite modifié pour obtenir les systèmes PEO-*b*-PAsp chargés négativement et PEO-*b*-PAsp-AP chargés positivement.

Gohy et al. ont aussi montré que des blocs chargés ayant des degrés de polymérisation différents peuvent également s'auto-assembler, à condition que le nombre de charges positives et négatives soient relativement proche. Ils se sont, en effet, focalisés sur l'étude du système PEO-*b*-PMAA / PEO-*b*-P2VP.<sup>154</sup> Le copolymère PEO-*b*-PMAA forme des micelles à coeur de PMAA à pH<6 ( $R_H = 55\text{nm}$ ) alors que le composé PEO-*b*-P2VP s'auto-assemble à pH>6.1 ( $R_H = 25\text{nm}$ ). Le mélange des deux copolymères conduit à une augmentation de la taille des agrégats formés ( $R_H = 85\text{nm}$ ) entre  $2 < \text{pH} < 6.1$ , signe de la complexation électrostatique entre les deux blocs chargés.

Adams et al. ont étudié l'influence de la taille des blocs PEO pour le mélange PEO-*b*-PMADAAE / PEO-*b*-PAsp<sup>155</sup> et ont montré que plus la taille du bloc PEO est importante, plus la dispersion en taille des micelles ainsi formées est faible.

Une autre voie pour générer des complexes polyioniques consiste à utiliser un copolymère à blocs constitué d'un bloc hydrophile neutre et d'un bloc chargé mélangé à un polyélectrolyte de charge opposée,<sup>156,157,158,159,160</sup> par exemple, le système PEO-*b*-PMAA / poly(*N*-ethyl-4-vinylpyridinium bromide) (PEVP).<sup>158</sup> Ce dernier est un polycation qui, par conséquent, se protone à pH neutre et basique. Des mesures d'absorbance ont montré une augmentation de la turbidité de la solution d'environ 20% à partir de pH = 5 preuve de la complexation entre polycation et polyanion. Les auteurs ont confirmé la formation de micelles en comparant ces résultats avec un mélange d'homopolymères PMAA / PEVP où, dans ce cas, la turbidité atteint une valeur maximale, preuve de la précipitation du système.

Les polyampholytes peuvent également former des complexes électrostatiques. Comme signalé précédemment, ce sont des copolymères contenant un polycation composé de  $N_c$  unités monomères et un polyanion comportant  $N_a$  unités monomères. Si les deux blocs sont symétriques (même taille et même nombre d'unités monomères chargés), la solution de copolymères précipite de la même façon qu'un polyélectrolyte standard, la connexion entre les deux blocs jouant un rôle minoritaire. En revanche, si le copolymère est très asymétrique, par exemple  $N_a \gg N_c$ , il peut conduire à des agrégats de type micelles sphériques. Dans ce cas, le cœur de ces micelles est formé par complexation entre les polycations et une partie des polyanions, l'autre partie formant la couronne hydrophile.

Jérôme et al. ont ainsi montré la formation de nanoparticules à morphologie vésiculaire pour le système asymétrique PMAA<sub>49</sub>-*b*-PMADAME<sub>11</sub>.<sup>131</sup> A pH=7, c'est-à-dire au-delà du PI (~5), les charges négatives portées le long des blocs PMAA sont en excès et, une partie seulement va se complexer avec les unités PMADAME chargées positivement pour former la membrane hydrophobe des vésicules, l'autre partie permettant la stabilisation de ces agrégats. En plus des mesures réalisées par diffusion de la lumière, la morphologie a été confirmée par TEM (figure I-20).

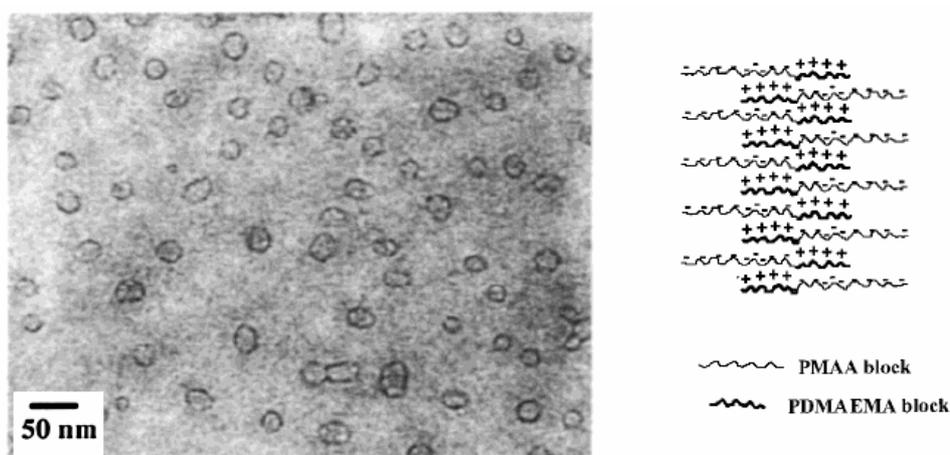


Figure I-20 : Clichés TEM du copolymère PMAA<sub>49</sub>-*b*-PMADAME<sub>11</sub> en solution dans l'eau ( $c=0.01\%$  mas.) à pH=7 ainsi que sa représentation schématique.<sup>131</sup>

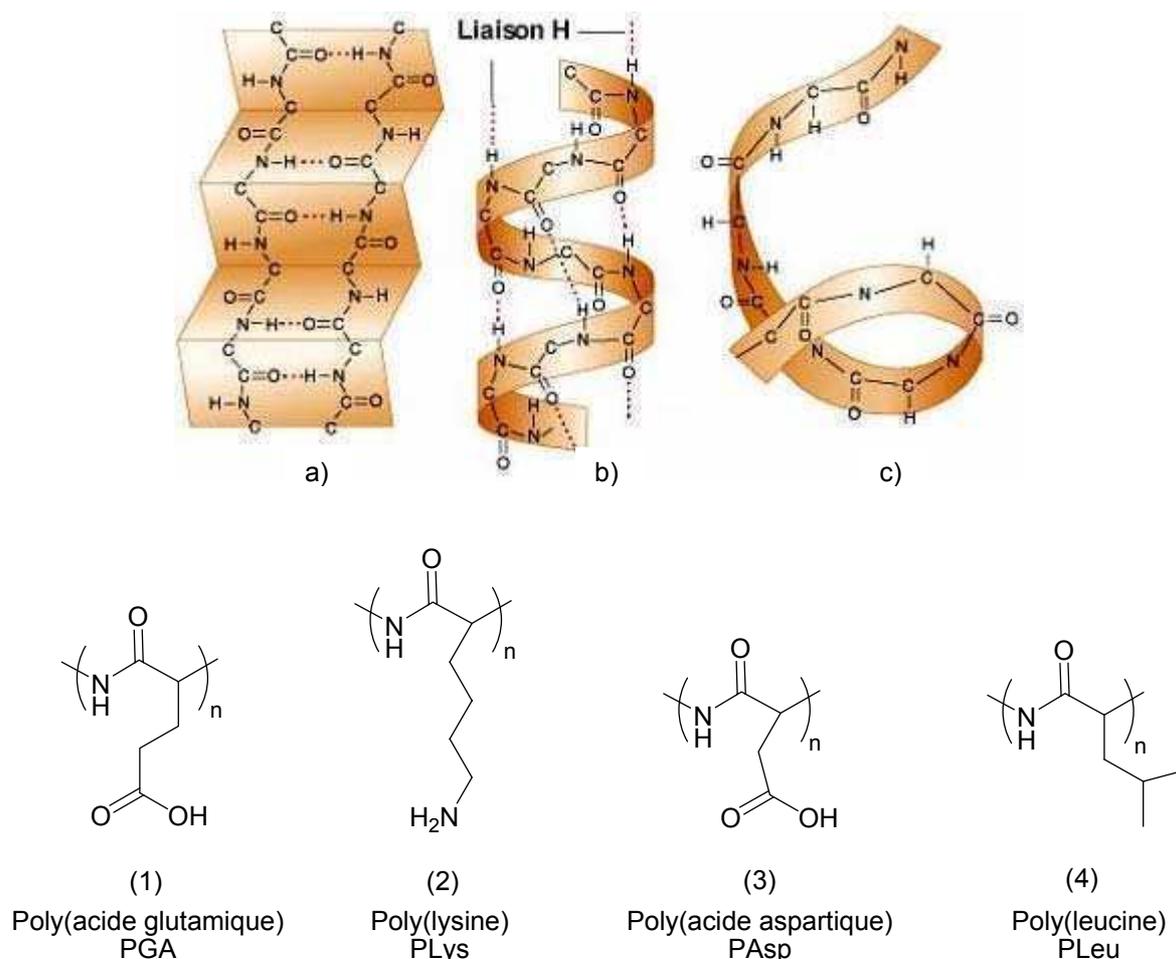
Ces systèmes électrostatiques, quel que soit leur mode de formation, sont fortement dépendants de la concentration en sels en solution. En effet, à partir d'une concentration critique ( $c \sim 0.35M$ ) les agrégats sont dissous en solution.<sup>158</sup> Cependant, il est important de noter que la stabilité du complexe électrostatique dépend aussi de l'hydrophobie du polymère complexant ainsi que de la nature des groupements chargés.

## **B- Auto-assemblage de copolymères à blocs « hybrides » à base de polypeptides**

Les polypeptides naturels ou synthétiques sont constitués de résidus R d' $\alpha$ -acides aminés qui sont les briques élémentaires de toute espèce vivante.<sup>161,162</sup> L'élaboration de polypeptides s'effectue par polymérisation des acides aminés correspondants en formant des liaisons amides entre les différentes unités : les liaisons peptidiques (O-CO-NH-CHR). En tant que polyamides, les polypeptides peuvent être étirés sous forme de fibres ou de films. Leurs utilisations comme modèles de protéines naturelles pour l'étude de différents processus biologiques constituent le principal intérêt de ces matériaux polymères. Tout comme les protéines naturelles, les polypeptides synthétiques peuvent s'auto-organiser et donner lieu à la formation de structures secondaires : hélices, feuillettes ou plus simplement pelote statistique (figure I-21), de par la formation de liaisons hydrogène, principales forces stabilisatrices de la conformation des polypeptides. Ils ont ainsi l'étonnante capacité d'adapter leurs propriétés physico-chimiques en transitant d'une structure secondaire à l'autre, et ce de manière réversible en réponse à différents stimuli (pH, température, force ionique...).

Certains polypeptides présentent ainsi plusieurs conformations selon les conditions de leur utilisation (pH, température, force ionique...). C'est le cas, en particulier, si la chaîne latérale de l' $\alpha$ -acide aminé contient une fonction chimique présentant plusieurs états, sensible à un ou plusieurs paramètres extérieurs.

L'exemple le plus trivial est celui des polypeptides comportant un groupement ionisable en position latérale. Si ils peuvent se structurer en hélice- $\alpha$  ou s'associer en séquence- $\beta$  quand les groupements sont neutres, ces structures ne sont pas énergétiquement favorables quand les chaînes latérales sont ionisées. Dans ce cas, le comportement du polypeptide est de type polyélectrolyte, conduisant à une conformation désordonnée (pelote), la chaîne cherchant à minimiser les interactions électrostatiques défavorables en s'étirant.



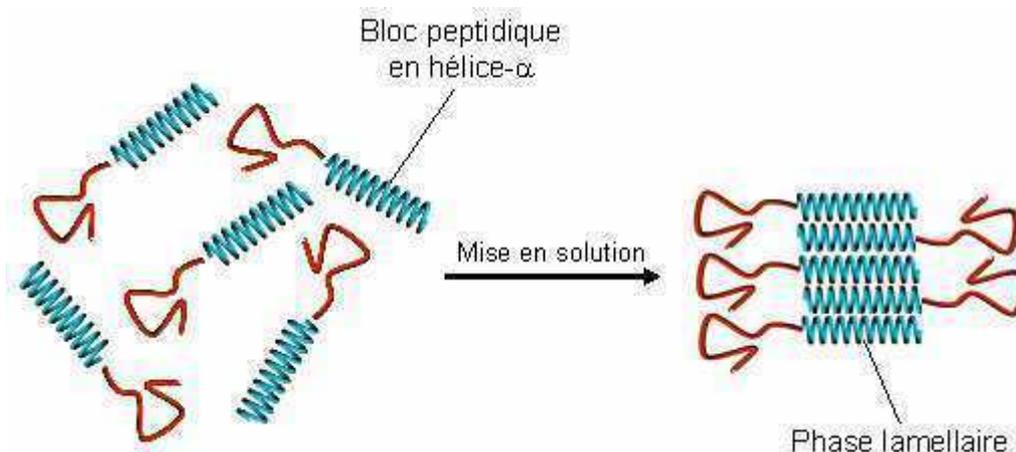
**Figure I-21** : Structures secondaires des polypeptides : a) feuillet  $\beta$ ; b) hélice  $\alpha$ ; c) pelote statistique et structures chimiques de quelques polypeptides synthétiques.

Ces polypeptides présentent généralement une transition de structuration secondaire sensible au pH, à la force ionique ou encore à la présence de complexant. C'est le cas en particulier du poly(acide glutamique) (PGA) (figure I-21 (1)) qui, dans l'eau, subit une transition réversible pelote/hélice- $\alpha$  selon l'état des fonctions carboxyliques latérales dont le pKa se situe vers 4.1.<sup>163,164</sup>

La poly(L-lysine) (PLys) (figure I-21 (2)) est, quant à elle, sensible au pH et à la température. Elle présente une transition pelote/hélice- $\alpha$  en fonction du pH due aux fonctions amines, transition se situant vers pH = 10.4.<sup>165</sup> Au-delà de cette valeur, la PLys présente également une transition hélice- $\alpha$ /feuillet- $\beta$  en fonction de la température.<sup>166,167,168,169</sup> La conformation en hélice- $\alpha$  de la PLys est métastable, la conformation en feuillet- $\beta$  étant énergétiquement favorable. Cette transition est donc réversible et semble dépendre de la longueur de la PLys.<sup>168</sup> La cinétique dépend, elle, de la température.

Il paraît donc intéressant de combiner les propriétés des polymères synthétiques « classiques », c'est-à-dire non peptidiques, avec les propriétés de structuration et de stimulation de segments peptidiques afin d'obtenir des copolymères « hybrides » synthétiques peptidique/non peptidique.

D'une part, la présence de blocs structurés en hélice- $\alpha$  ou associés sous forme de feuillet- $\beta$  permet de diversifier les propriétés d'auto-assemblage en solution par rapport aux copolymères flexibles. Le comportement des hélices- $\alpha$  en solution peut être assimilé à celui d'un bâtonnet rigide conférant au niveau moléculaire des propriétés différentes de celles des blocs non peptidiques (vinyliques). Lorsqu'un bloc se structure en hélice- $\alpha$ , les chaînes ont tendance à s'aligner parallèlement et à s'associer. Inclure des segments qui ont la capacité de se structurer sous forme de bâtonnets dans un copolymère à blocs amphiphiles permet ainsi de contraindre l'association en domaine bidimensionnel avec la formation d'interfaces planes qui favorise l'obtention de vésicules ou de membranes, c'est cette idée qui a été exploitée par un certain nombre d'équipes (Figure I-22).<sup>170,171,172,173,174</sup>



**Figure I-22 : Structuration des blocs peptidiques en hélice- $\alpha$  en solution**

D'autre part, l'utilisation de blocs peptidiques dont les transitions entre différentes structures secondaires peuvent être contrôlées offre la possibilité de moduler l'état d'agrégation par modification des paramètres environnementaux.<sup>170,171,174,175,176</sup>

Enfin, la biocompatibilité et la fonctionnalité des segments peptidiques en font des composants très intéressants, par exemple des nano-vecteurs biomimétiques, pour des applications biomédicales ou pour entrer dans la composition de substances thérapeutiques administrables.<sup>177,178</sup>

Parmi les différents copolymères à blocs « hybrides » développés à ce jour, on peut distinguer ceux constitués d'un bloc peptidique soluble dans l'eau de ceux comprenant un bloc insoluble en milieu aqueux.

### ***B-1 Copolymères à blocs « hybrides » comportant un bloc peptidique soluble.***

Ces systèmes sont capables de s'auto-assembler dans l'eau pour former différentes morphologies, principalement des micelles et des vésicules, dont la partie hydrophobe est

généralement formée par le bloc synthétique hydrophobe et la couronne par le polypeptide synthétique hydrophile.

Les équipes de Schlaad<sup>179</sup> et de Lecommandoux<sup>180</sup> se sont notamment intéressées aux composés  $PB_{27-119}-b-PGA_{20-145}$ . Différentes techniques de caractérisation (DLS, SLS, SANS et TEM) ont permis de mettre en évidence les morphologies obtenues, en fonction de la composition des blocs. Ces copolymères adoptent des morphologies micellaire ou vésiculaire. Pour des fractions molaires en PGA < 70-75%, on obtient des micelles de rayon hydrodynamiques inférieurs à 40 nm alors que les vésicules ( $R_H = 50-90\text{nm}$ ) se forment pour des fractions en PGA plus faibles, typiquement comprises entre 17 et 54%. Les mêmes morphologies ont pourtant été obtenues avec le copolymère  $PB_{40}-b-PGA_{100}$  où la fraction volumique en PGA est très majoritaire (71%).<sup>181,182</sup> Les mesures de DLS et de SANS ont démontré la capacité du bloc PGA à changer de structure secondaire en fonction du pH : les chaînes passent d'une conformation de type pelote statistique (pH > 6) à celle d'une hélice- $\alpha$  (pH < 5). Néanmoins, ce changement de conformation n'a pas d'influence sur la morphologie des agrégats. Les expériences réalisées en SANS laissent à penser que le nombre d'agrégation est constant.<sup>180</sup> On peut s'attendre toutefois à ce que le rayon hydrodynamique des agrégats soit sensiblement réduit dans la mesure où la longueur des chaînes PGA, sous leur forme ionisée, donc étirée, est plus importante que dans le cas d'une conformation en hélice- $\alpha$ . La diminution du  $R_H$  a été observée pour les systèmes  $PB_{48}-b-PGA_{56-145}$  et reste inférieure à 20%.<sup>179</sup> En revanche, aucun changement de taille pour les systèmes  $PB_{48}-b-PGA_{24-64}$  n'a été décelé.<sup>180</sup>

Les micelles de  $PI_{49}-b-PLys_{123}$ , également étudiées par Lecommandoux *et al.*<sup>183</sup> montrent un rayon hydrodynamique de 44 nm à pH=6 (pelote statistique) et de 23 nm à pH = 11 (hélice- $\alpha$ ), ce qui correspond à une diminution de taille de presque 50% (figure I-23). Cette propriété est beaucoup moins marquée pour le copolymère  $PB-b-PGA$  de composition très proche (48-*b*-114) avec une diminution de seulement 8%. La déstabilisation des hélice- $\alpha$  du PGA peut être une explication de même qu'un repliement en une conformation moins compacte que celles des chaînes de PLys en hélice- $\alpha$ .

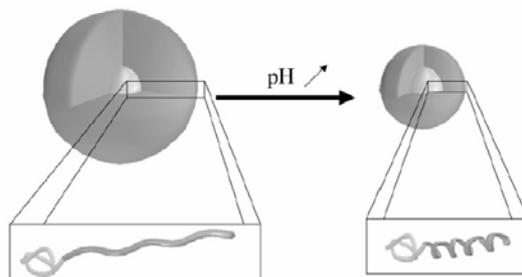
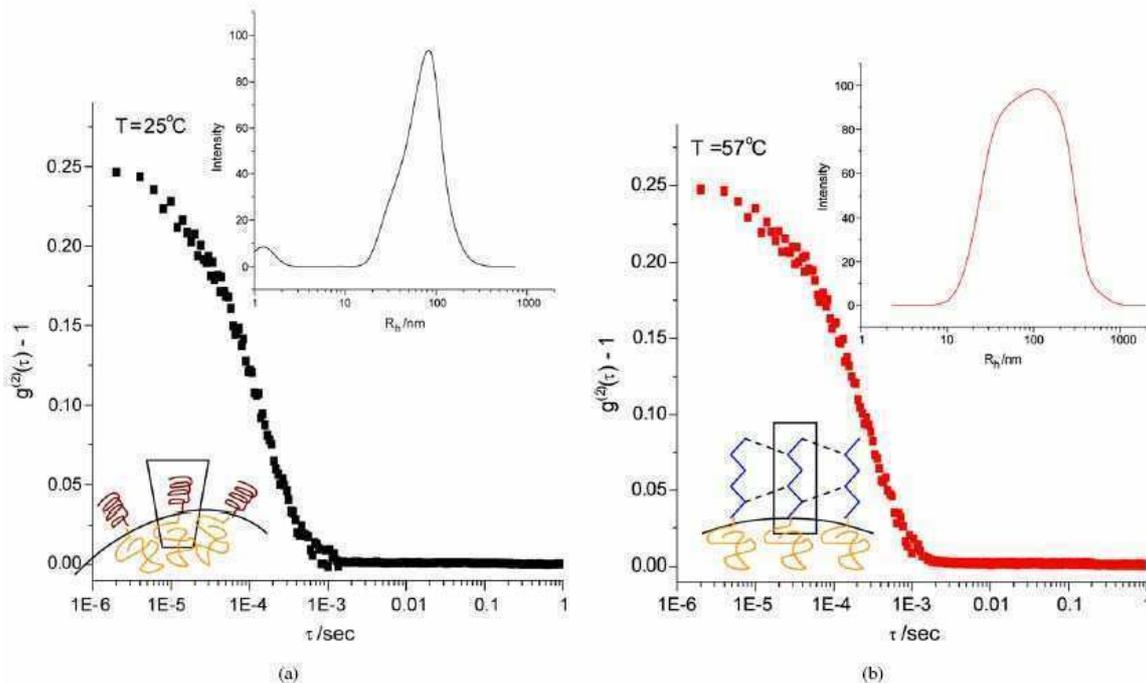


Figure I-23 : Micelles à base de  $PI_{49}-b-PLys_{123}$  obtenues en conditions acide et basique.<sup>183</sup>

En plus de sa capacité à répondre au pH, la PLys peut également changer de conformation en fonction de la température. Savin *et al.* ont mis à profit cette double propriété en se penchant sur l'étude du système  $PLys_{27}-b-PBut_{107}$ .<sup>184</sup> La fraction du bloc hydrophile PLys étant faible (~20%), les chaînes de copolymères s'auto-assemblent sous forme de vésicules, comme le confirment les études

par DLS et TEM. A température ambiante, l'augmentation du pH induit une diminution des tailles des vésicules d'environ 20 nm (de  $R_H \sim 90$  nm à pH acide à  $R_H \sim 70$  nm à pH basique) expliqué par un changement de conformation secondaire des chaînes de PLys formant la couronne stabilisante.

Pour des solutions de copolymères à pH acide, les tailles des vésicules restent inchangées par augmentation de la température. En revanche, à pH = 10.9, c'est-à-dire au-delà du pKa de la PLys ( $\sim 10.4$ ), la taille des vésicules augmentent, passant de 70 nm à 25°C à 140 nm à 65°C. A cette dernière température, les chaînes de PLys adoptent une conformation en feuillet- $\beta$  (comme le montre les spectres de CD) engendrant des liaisons hydrogène inter-chaînes. Des associations inter-vésicules sont donc possibles, ce qui expliquerait l'augmentation de taille à haute température (figure I-24). A noter que cette structure semble irréversible car les tailles observées restent constantes après plusieurs jours à température ambiante. En revanche, le fait de diminuer le pH déstabilise cette conformation de feuillet- $\beta$  et le  $R_H$  mesuré revient à sa valeur d'origine pour cette gamme de pH, à savoir 90 nm.



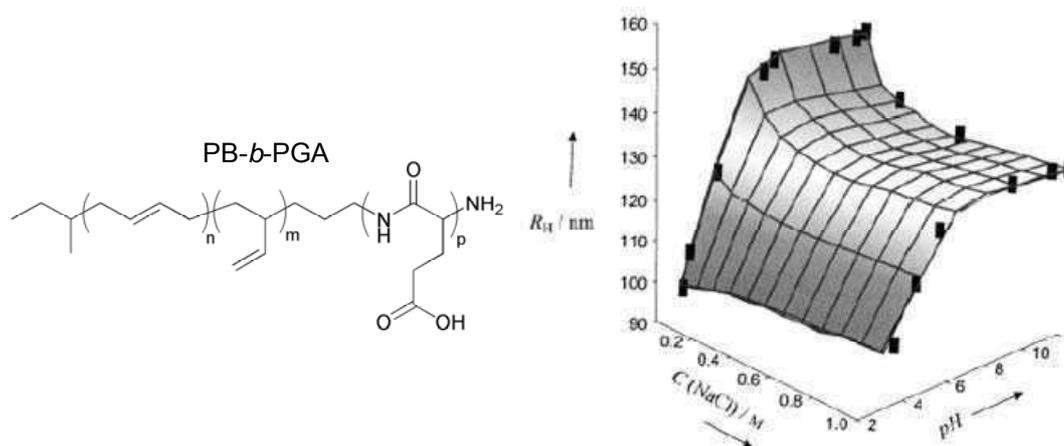
**Figure I-24 : Fonctions d'auto-corrélation des vésicules de PB-*b*-PLys à pH=10.9 et T=25°C (a) et 57°C (b). Les encadrés du haut représentent les distribution des tailles en mode contin et ceux du bas, la schématisation de la conformation des chaînes de PLys : (a) hélice- $\alpha$ , (b) feuillet- $\beta$ .<sup>184</sup>**

Ouchi et al. ont étudié le comportement en milieu aqueux du système PLA<sub>95,180</sub>-*b*-PAsp<sub>47-270</sub> à différents pH (4.4 à 8.6).<sup>185</sup> La taille des agrégats augmente avec le pH du fait de la déprotonation des blocs de PAsp formant la couronne, et est multiplié par 4 pour le système PLA<sub>95</sub>-*b*-PAsp<sub>70</sub>. Les auteurs ont suggéré, outre l'étirement des chaînes de PAsp à pH basique, que le nombre d'agrégation est plus faible pour les micelles préparées à pH acide. Cependant, quelle que soit la composition du copolymère, la morphologie obtenue est toujours micellaire, de type sphérique avec un rayon

hydrodynamique compris entre 10 et 80 nm. Ceci peut être lié au caractère semi-cristallin des chaînes de PLA, ce qui contraint le système à rester dans un état figé et non à l'équilibre thermodynamique.

D'autres types de morphologies ont été mises en évidence, notamment par Klok et al. qui ont observé la formation d'agrégats cylindriques lors de l'étude du copolymère PS-*b*-PLys quelle que soit la longueur du bloc peptidique PLys.<sup>186</sup>

Récemment, il a été montré que des micelles ou vésicules stimulables à des variations de pH peuvent être obtenues à partir de copolymères à blocs à base de polypeptides (en particulier du PGA), et ce même dans des conditions de forte salinité. En effet, contrairement aux blocs polyélectrolytes « simples », les polyélectrolytes peptidiques subissent non seulement une variation de charge lors du changement de pH, mais aussi une modification de leur conformation.<sup>182</sup> Par exemple, les vésicules formées à partir des copolymères polybutadiène-*b*-PGA subissent une variation de volume importante, et ce même en présence d'une forte concentration en sel comme le montre la figure I-25.



**Figure I-25 : Structure du copolymère Polybutadiène-*b*-PGA (à gauche) et variation du rayon hydrodynamique des vésicules formées à partir de l'auto-assemblage du PB-*b*-PGA en fonction de la force ionique (concentration en sel NaCl) et de la valeur du pH (à droite).<sup>182</sup>**

Des systèmes multistimulables à base de copolymères à blocs comportant au moins un bloc peptidique soluble ont également été développés.

Une étude récente a montré la capacité du copolymère à blocs « hybrides » PNIPAAm<sub>65</sub>-*b*-PGA<sub>110</sub> à s'auto-assembler sous forme de micelles et de micelles inverses en fonction du pH et de la température.<sup>187</sup> En effet, le copolymère est soluble dans l'eau à pH neutre et basique : le PGA est ionisé et le PNIPAAm ne précipite qu'au-delà de 32°C. En diminuant le pH, les chaînes de PGA se protonent et adoptent une conformation en hélice- $\alpha$  ce qui renforce leur caractère hydrophobe. Néanmoins, la morphologie issue de cet auto-assemblage telle que révélée par TEM montre que seules des micelles sont présentes en solution avec des tailles importantes,  $R_H = 53\text{nm}$ . En partant des conditions où les deux blocs sont solubles et en augmentant la température jusqu'à 45°C, les blocs PNIPAAm précipitent et forment le coeur de micelles.

## ***B-2 Copolymères à blocs « hybrides » comportant un bloc peptidique insoluble.***

Les systèmes concernés dans ce paragraphe comportent un bloc synthétique hydrophile et un bloc peptidique hydrophobe.

Yonese et al. ont étudié le comportement dans l'eau du système PEO<sub>113</sub>-*b*-poly(L-glutamate de  $\gamma$ -méthyle)<sub>20,50</sub> (PEO-*b*-PMLG<sub>20,50</sub>).<sup>188</sup> Des études en diffusion de la lumière ont montré la présence de « gros » agrégats sphériques ( $R_H \sim 250$ nm). Contrairement à ce qu'avancent les auteurs, cette valeur de rayon hydrodynamique semble plutôt correspondre à des vésicules qu'à des micelles sphériques. En effet, la force motrice de l'auto-assemblage est gouvernée par l'effet hydrophobe entre blocs peptidiques présents en solution sous forme d'hélice- $\alpha$ , ce qui favoriserait la formation de phases lamellaires et donc de vésicules. Des analyses complémentaires, comme l'imagerie, permettraient de confirmer la morphologie exacte de ces agrégats.

Cho et al. se sont intéressés de près à des systèmes similaires, notamment au PNIPAAm-*b*-poly(L-glutamate de  $\gamma$ -benzyle) (PNIPAAm-*b*-PBLG).<sup>189,190,191,192</sup> La méthode de la dialyse a été utilisée pour former les nanoparticules qui, par ailleurs, sont de tailles importantes ( $R_H \sim 250$ nm). Bien qu'ici également les tailles obtenues correspondent davantage à des vésicules, le nombre d'agrégation demeure cependant trop faible (<100) par rapport à celui attendu pour ce type de morphologie (>1000). On peut noter que la couronne composée de PNIPAAm est thermosensible, donc va collapser sous l'augmentation de la température faisant diminuer la taille des nanoparticules de 100nm.<sup>189</sup>

Un autre moyen d'obtenir des agrégats dont la partie hydrophobe est composée de polypeptides est d'utiliser la complexation électrostatique. En effet, comme mentionné précédemment, Kataoka et al.<sup>148-153</sup> ont développé des systèmes à base de copolymères « hybrides » capables de s'auto-organiser dans l'eau par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques entre blocs peptidiques chargés, pour former des complexes polyioniques.

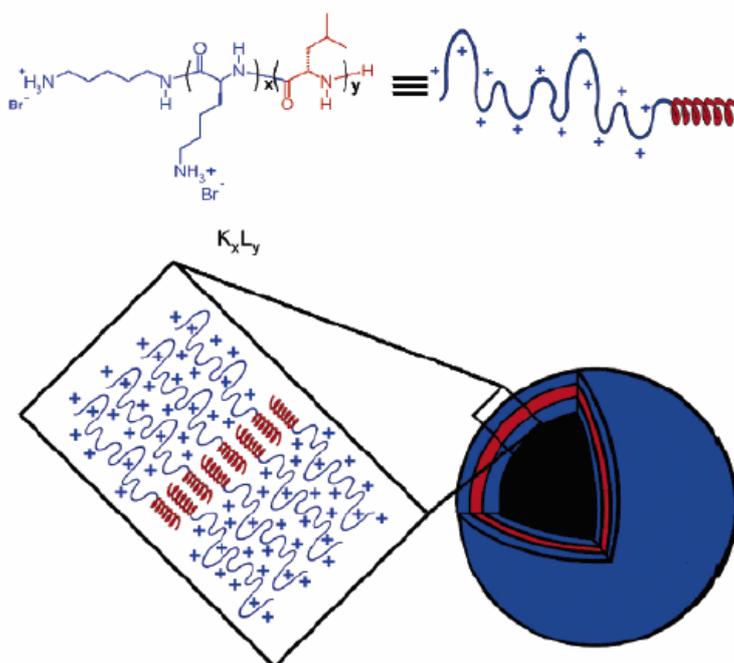
## ***B-3 Copolymères à double blocs peptidiques : copolypeptides à blocs.***

En plus des copolymères à blocs « hybrides » peptidique/non peptidique décrits précédemment, il existe quelques exemples de copolymères à blocs amphiphiles entièrement composés de polypeptides synthétiques.

Des copolypeptides à blocs non-ioniques composés d'un bloc de PLeu et d'un autre à base de PLys modifié avec de l'éthylène glycol, PLeu<sub>10-75</sub>-*b*-PELys<sub>60-200</sub>, ont été décrits par Deming *et al.*<sup>173</sup> Les deux blocs adoptent une conformation en hélice- $\alpha$  et différentes morphologies en solution ont été obtenues : des vésicules de tailles variables, agrégats mal définis ou encore objets membranaires de type feuillet. Il est possible de moduler la taille des vésicules de 1 à 25  $\mu$ m en changeant la composition du copolymère. En résumé :

- (i) tous les échantillons ayant un « petit » bloc PLeu (~20 unités) ne permettent pas la formation de vésicules micrométriques,
- (ii) ceux dont la fraction en PLeu excède 35% s'agrègent en complexes insolubles,
- (iii) tous les autres systèmes forment des objets membranaires qui peuvent être soit de type vésiculaire pour des « petites » fractions en PLeu ou bien des feuillets incurvés pour des « plus grandes » fractions en PLeu et tailles de blocs.

La même équipe s'est intéressée à un système similaire mais sans modifier la PLys.<sup>172</sup> Les blocs PLeu hydrophobes adoptent une conformation en hélice- $\alpha$  et vont alors former la membrane des vésicules. Une schématisation de l'association en vésicule est reproduite ci-dessous (figure I-26).

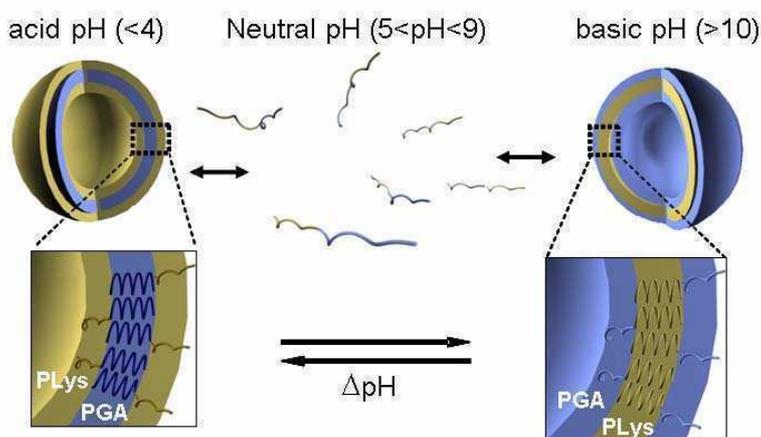


**Figure I-26 : Représentation schématique de vésicules en solution aqueuse pour des copolymères  $PLys_{60}$ - $b$ - $PLeu_{20}$ .**<sup>172</sup>

Meyrueix *et al.* de Flamel Technologie, ont réalisé la précipitation sélective du copolymère PLeu-*b*-PGA pour obtenir des nanoparticules purifiées puis redispersées en solution aqueuse à pH=7.4.<sup>193</sup> Les interactions électrostatiques ainsi que le caractère hydrophile du PGA permettent une bonne stabilisation des agrégats sous forme de micelles cylindriques et sphériques ou bien encore adoptant une conformation en plaquettes hexagonales avec un diamètre d'environ 200 nm. Les différentes morphologies obtenues sont fonction de la composition du copolymère : ceux riches en PGA forment des micelles et ceux à majorité en PLeu forment des plaquettes. Des mesures de CD et de diffraction des rayons X montrent que le cœur cristallin des plaquettes est composé par les segments de PLeu dans une conformation en hélice- $\alpha$ .

Des copolypeptides à blocs ont également fait l'objet d'études par Lecommandoux *et al.* qui ont décrit le caractère « schizophrène » du copolymère  $PGA_{15}$ -*b*- $PLys_{15}$  (figure I-27).<sup>171</sup> Pour des pH intermédiaires, entre le pKa du PGA (~4.1) et celui de la PLys (~10), les chaînes de copolymères sont

solubles et ne présentent pas de structuration particulière. Lorsque le pH est abaissé au-dessous de 4 ou bien augmenté au-dessus de 11, l'un des blocs est neutralisé et se structure sous forme d'hélice- $\alpha$ . Les copolypeptides à blocs s'assemblent alors sous forme de vésicules dont la couronne est tantôt chargée positivement, tantôt négativement.



**Figure I-27 : Schématisation de l'auto-assemblage du copolymère PGA<sub>15</sub>-b-PLys<sub>15</sub> en fonction du pH.<sup>171</sup>**

Quel que soit le système étudié, il est clair que l'influence de blocs en hélice- $\alpha$  rigides sur la conformation finale des nanoparticules est importante. En effet, la formation de superstructure de type membranaire est rapportée pour ces copolypeptides diblocs avec moins de 20% de monomère hydrophobe, ce qui est totalement impossible pour des copolymères de type « flexible-flexible » (non peptidique).

## **C- Exemples d'applications des copolymères à blocs en milieu aqueux**

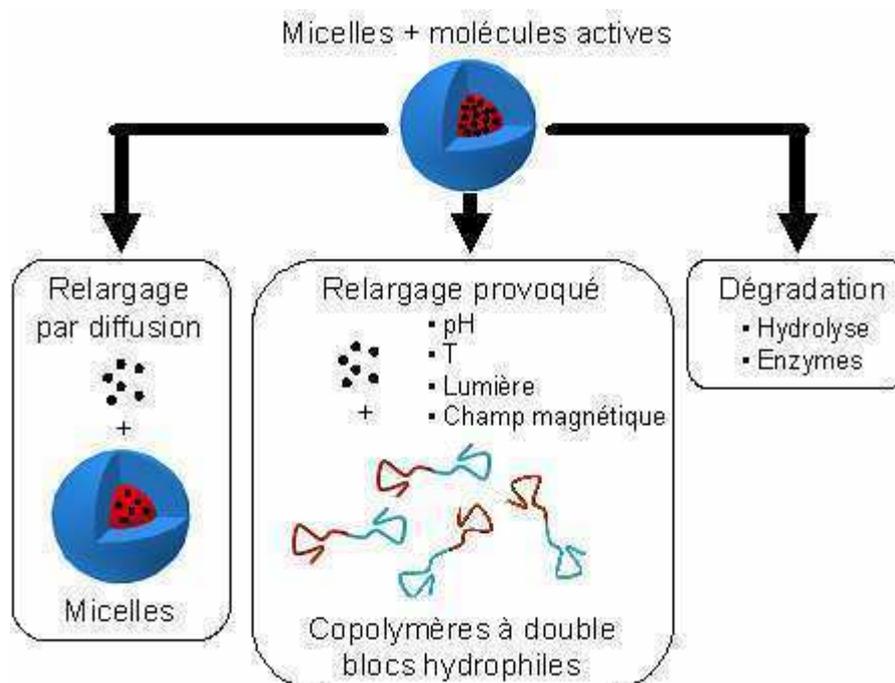
Les systèmes micellaires à base copolymères à blocs sont principalement utilisés comme nano-vecteurs pour l'encapsulation d'actifs dans de nombreux domaines : parfumerie, cosmétiques, pesticides, dépollution....<sup>174</sup> Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur les applications biomédicales, notamment sur la vectorisation et le relargage contrôlé de molécules actives. Depuis quelques années, de plus en plus de groupes s'intéressent à ce domaine comme le prouve le nombre important d'articles de revues publiés à ce jour.<sup>194</sup>

De par leurs propriétés d'auto-assemblage, les systèmes micellaires à base de copolymères à blocs offrent de nombreux avantages pour ce genre d'applications :

- possibilité d'incorporer des molécules hydrophobes dans le cœur de micelles
- protection de l'espèce active contre une dégradation prématurée et augmentation du temps de vie dans l'organisme

- diminution de la toxicité de l'espèce active, et ainsi des effets secondaires
- amélioration de la pénétration intra-cellulaire
- relargage contrôlé
- fonctionnalisation en surface en vue d'applications de ciblage

Le relargage du principe actif à travers la nanoparticule peut se faire par simple diffusion, par dégradation de la nanoparticule dans le cas de polymères dégradables (nous ne traiterons pas ce cas dans cette partie) ou sous l'effet d'un stimulus externe (provoqué) (schéma I-12). Etant donné le nombre et la diversité des différents systèmes existants, nous nous limiterons à la description de quelques exemples marquants de la littérature.

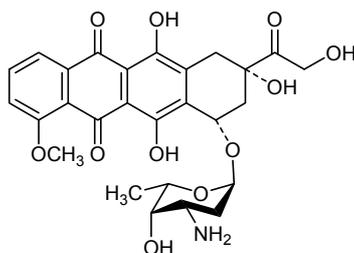


**Schéma I-12 : Mécanismes de relargage de molécules actives par diffusion, provoqué ou par dégradation.**

## **C-1 Relargage de principes actifs par diffusion**

Les molécules actives peuvent être incorporées dans la partie hydrophobe des nanoparticules par deux mécanismes différents : (i) par liaison covalente, (ii) par interactions physiques (liaisons hydrogène, ioniques,...) ou (iii) par effet hydrophobe. En admettant que la nanoparticule soit stable et sa biodégradabilité lente, la vitesse du relargage est influencée par différents facteurs comme : i) la force des interactions entre la molécule active et le cœur de la micelle, ii) la quantité encapsulée, iii) le volume occupé par la molécule active, iv) la longueur des blocs formant le cœur des micelles et v) la localisation de la molécule active dans la micelle.<sup>24</sup>

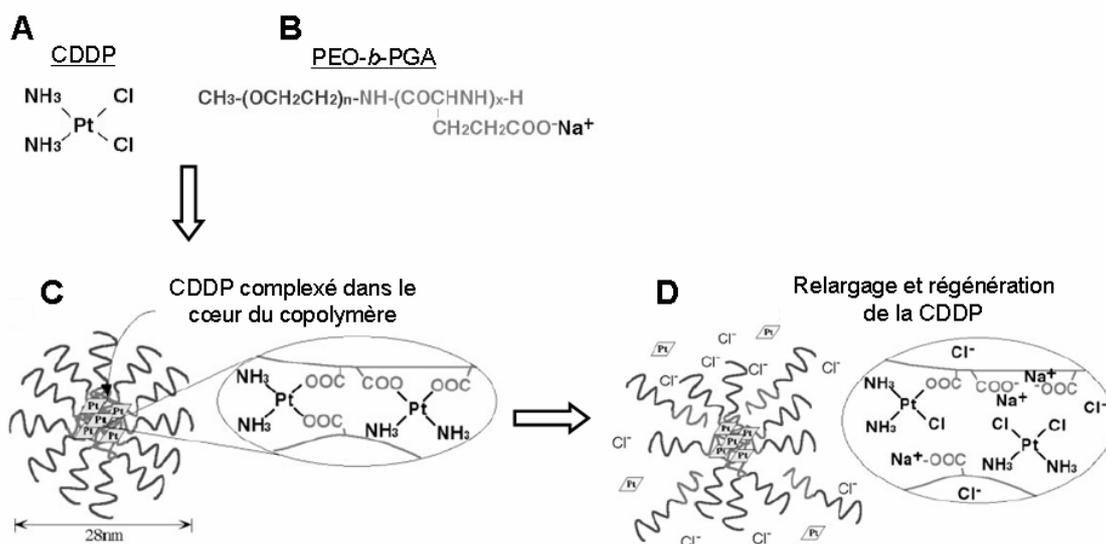
Kataoka *et al.* ont lié de façon covalente la doxorubicine (DOX, figure I-28) (molécule anticancéreuse hydrophobe) au copolymère PEO-*b*-P(Asp) provoquant la formation spontanée de micelles sphériques de 15 à 60 nm de diamètre.



**Figure I-28** : Structure chimique de la doxorubicine (DOX).

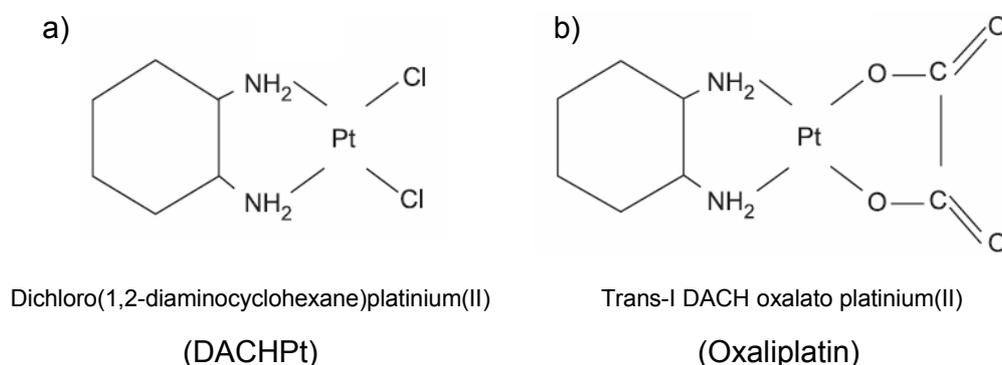
Quand elle est liée de manière covalente aux blocs de P(Asp), la DOX est inactive au niveau pharmacologique, mais cela contribue à améliorer l'encapsulation de DOX libre dans le cœur hydrophobe des micelles grâce à des interactions  $\pi$ - $\pi$  des groupements anthracycline de la DOX entre les molécules conjuguées et celles qui ne le sont pas. La compatibilité entre le cœur des micelles et les molécules à encapsuler est un paramètre important à prendre en compte pour optimiser la quantité de molécules à encapsuler et contrôler sa vitesse de relargage.<sup>195,196,197,198</sup>

La même équipe a également proposé de favoriser l'encapsulation par création de liaisons métalliques entre le cœur des micelles et la molécule active. La cisplatine [cis-dichlorodiamineplatini-um (II)] (CDDP) (figure I-29 A), un complexe métallique possédant une activité anti-cancéreuse,<sup>199</sup> mais présente quelques inconvénients pour une utilisation dans le domaine biomédical car il est peu soluble dans l'eau, provoque des effets secondaires<sup>200</sup> et est vite dégradé dans l'organisme.<sup>201</sup> Ces problèmes ont été résolus en incorporant la molécule dans des copolymères PEO-*b*-P(Asp)<sup>202,203</sup> ou PEO-*b*-PGA (figure I-29 B).<sup>204</sup> Les interactions entre les atomes de Pt(II) et les fonctions carboxyliques du bloc P(Asp) ou PGA sont générées au dépend de celles existant avec les atomes de Cl, stabilisant ainsi la CDDP dans le cœur des micelles en améliorant sa stabilité dans l'eau (figure I-29 C). Le relargage de la CDDP a été réalisé en milieu physiologique ce qui induit une réaction inverse de substitution des liaisons Pt(II)-COO<sup>-</sup> avec Pt(II)-Cl (figure I-29 D).



**Figure I-29** : Structures chimiques du CDDP (A) et du copolymère PEO-*b*-PGA (B) et illustration de l'incorporation (C) et du relargage (D) du CDDP dans les micelles de copolymères.<sup>204</sup>

Plus récemment, une nouvelle classe de médicaments toujours à base de Pt (figure I-30) a été développée et solubilisée de la même manière dans le cœur des micelles de PEO-*b*-PGA.<sup>205,206</sup>



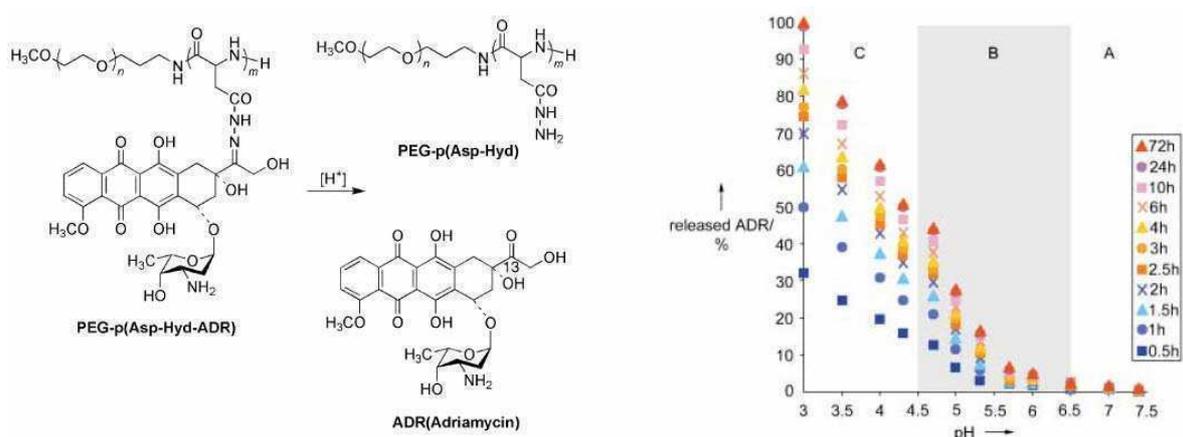
**Figure I-30 : Structures chimiques d'une nouvelle classe de médicaments à base de Pt développée par l'équipe de Kataoka : a) DACHPt ; b) Oxaliplatin.**<sup>205,206</sup>

## **C-2 Relargage de principes actifs par application d'un stimulus externe (provoqué)**

Le contrôle du temps de relargage des molécules actives par les systèmes micellaires est crucial pour le développement d'un système efficace. Un relargage trop rapide entraîne une perte prématurée du principe actif, des effets secondaires ainsi qu'une concentration insuffisante au niveau de la zone à traiter, alors qu'un relargage trop lent est peu efficace. De nouveaux systèmes micellaires fondés sur un principe de relargage contrôlé stimulé par des paramètres externes (température, pH, force ionique,...) ont été proposés durant ces dix dernières années. Dans la plupart des cas, cela se traduit par une solubilisation du copolymère à blocs, c'est-à-dire de la démicellisation du système pour relarguer le principe actif.

### **C-2-1 Systèmes sensibles au pH**

Kataoka et al. ont largement contribué à faire évoluer ce domaine en développant notamment des micelles dont le cœur est constitué d'un bloc peptidique pour le transport d'agents anti-cancéreux.<sup>207</sup> Le système PEO-*b*-poly(aspartate-hydrazone-adriamycin) (PEO-p(Asp-Hyd-ADR)), synthétisé à partir du copolymère PEO-*b*-poly(L-aspartate de  $\beta$ -benzyle), possède une liaison hydrazine sensible au pH permettant de fixer la molécule anti-cancéreuse (adryamicine, ADR) à la chaîne principale du polymère.<sup>207a)</sup> Le cœur des micelles est donc formé par l'association de ce médicament et du bloc peptidique. Cette liaison se rompt à pH acide permettant la libération de l'ADR et la solubilisation des chaînes polymères. Les auteurs ont ainsi étudié le relargage du principe actif en fonction du pH comme le montre la figure I-31.

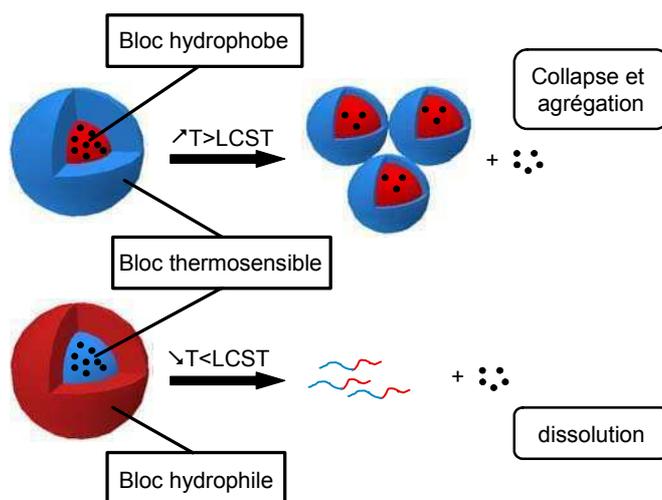


**Figure I-31 : Mécanisme de relargage de l'ADR par diminution du pH (à gauche) et relargage de l'ADR en fonction du temps et du pH (à droite).<sup>207a)</sup>**

Il semble que le relargage soit à la fois une fonction du temps et du pH. A pH=7.4 (pH physiologique), les micelles sont stables sur une durée de 72h. Lorsque le pH diminue, le relargage croît progressivement jusqu'à atteindre un équilibre (régions B et C). La région B correspond aux valeurs de pH caractéristiques d'endosomes ou de lysosomes, auxquelles la liaison hydrazine se rompt et laisse libre l'ADR, c'est-à-dire une fois l'étape d'endocytose réalisée. L'endocytose correspond au transport des molécules ou des particules vers l'intérieur de la cellule où le pH est plus acide (pH~5) qu'à l'extérieur (pH=7.4).

### **C-2-2 Systèmes sensibles à la température**

On distingue deux types de copolymères à blocs : i) ceux dont le bloc thermosensible est utilisé comme bloc hydrophobe pour former le cœur des nanoparticules à  $T > LCST$  et, ii) ceux dont le bloc thermosensible est utilisé comme bloc hydrophile, à  $T < LCST$ . On peut ainsi imaginer deux voies de relargage possible (figure I-32).

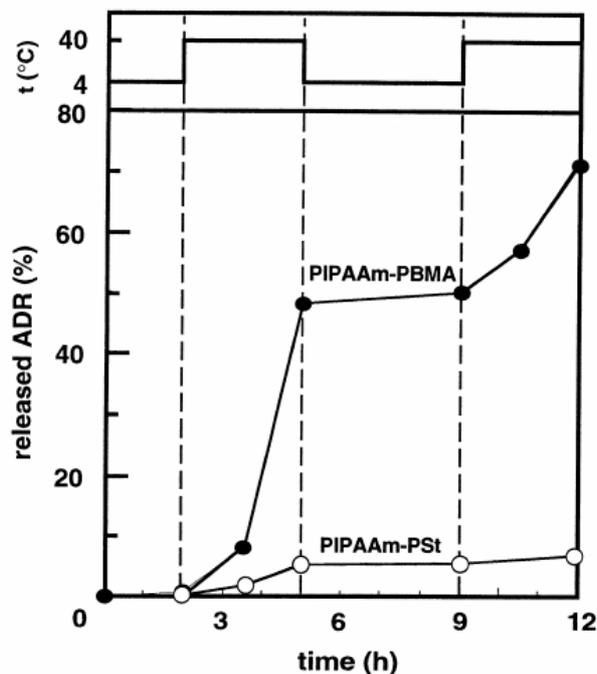


**Figure I-32 : Différentes voies pour le relargage de molécules actives à partir de micelles constituées d'un bloc thermosensible.**

Les copolymères composés d'un bloc hydrophile et d'un bloc thermosensible s'auto-assemblent à  $T > LCST$ , comme par exemple le système PEO-*b*-PNIPAAm au-delà de 32°C.<sup>208</sup> Ces systèmes peuvent donc incorporer des actifs hydrophobes seulement au-delà de la LCST. Par conséquent, le relargage contrôlé nécessite un refroidissement de la zone infectée, phénomène dit de « cold shock »<sup>209</sup>, ce qui représente un problème pratique important. Une alternative est d'introduire de manière statistique des unités hydrolysables hydrophobes dans le bloc thermosensible formant le cœur. Une hydrolyse de ces groupements augmente l'hydrophilie du cœur des micelles et par conséquent la LCST du système. Hennink et al. ont préparé des micelles à base de PEO-*b*-(PNIPAAm-*r*-2-hydroxypropyl methacrylamide lactate (HPMAm-Lac<sub>3</sub>)).<sup>210</sup> Lorsque la proportion d'unités HPMA-Lac<sub>3</sub> est de 35% par rapport à celles de NIPAAm, la LCST du segment est de 15°C. L'hydrolyse des liaisons esters des monomères HPMA-Lac<sub>3</sub> entraîne l'apparition d'unités HPMAm plus hydrophiles, et une LCST vers 45°C. Les micelles se dissolvent alors progressivement à la température physiologique au fur et à mesure de l'hydrolyse des unités pendantes.

Les morphologies vésiculaires semblent également être de bonnes candidates pour l'encapsulation. Discher et al. ont par exemple préparé des vésicules thermosensibles à base de PEO-*b*-PNIPAAm.<sup>211</sup> Les copolymères sont solubles dans l'eau en dessous de la température physiologique (37°C) et s'auto-assemblent sous forme de vésicules à haute température où les chaînes de PNIPAAm s'agrègent et forment la membrane hydrophobe. La doxorubicine a été encapsulée dans cette membrane hydrophobe et aucun relargage n'est observé après 7h de dialyse. En diminuant la température, les blocs de PNIPAAm se solubilisent entraînant la formation de pores dans la membrane des vésicules voire même leur dissolution pour relarguer le principe actif.

Les copolymères composés d'un bloc hydrophobe et d'un bloc thermosensible forment des micelles en dessous de la LCST. Okano et al. ont préparé des micelles à base de PBMA-*b*-PNIPAAm et PS-*b*-PNIPAAm dont la couronne hydrophile est composée par les chaînes de PNIPAAm en dessous de sa LCST. Des molécules d'adryamicine (ADR) ont été encapsulées dans le cœur hydrophobe des micelles (PBMA ou PS).<sup>212</sup> En élevant la température au-delà de la température critique du PNIPAAm, on observe un relargage accéléré de la DOX dû à un changement de la structure du PBMA ( $T_g \sim 20^\circ\text{C}$ ) provoqué par l'agrégation des chaînes de PNIPAAm. En revanche, aucune influence de la température sur le relargage de l'ADR pour les micelles de PS-*b*-PNIPAAm n'a été observé, en raison de la rigidité du bloc PS ( $T_g \sim 100^\circ\text{C}$ ) qui de ce fait est insensible à la précipitation des chaînes de PNIPAAm (figure I-33).



**Figure I-33** : Relargage de l'ADR à partir des micelles de PS-*b*-PNIPAAm et PBMA-*b*-PNIPAAm à différentes températures : 4°C et 40°C.<sup>212</sup>

Cependant, ce système ne semble pas adapté à des applications *in vivo* dans la mesure où la température critique est inférieure à la température physiologique. Une copolymérisation statistique avec des monomères hydrophiles peut, par exemple, permettre d'augmenter cette température au-delà de la température critique. Les mêmes auteurs ont donc copolymérisé le NIPAAm de manière statistique avec des monomères de DMAAm afin d'obtenir un bloc ayant une LCST à 40°C.<sup>213</sup> De ce fait, le relargage de l'ADR pour le système micellaire PLA-*b*-(PNIPAAm-*r*-PDMAAm) est lent à 37°C et augmente à 42.5°C.

### **C-2-3 Systèmes sensibles à d'autres stimuli**

En plus des réponses à la température et au pH, d'autres stimuli peuvent être utilisés en vue d'induire des variations de structure des systèmes micellaires : un champ magnétique, les ultra-sons ou encore la lumière (UV/visible).

Le champ magnétique est un stimulus très développé depuis dix ans pour la formation de nanoparticules à base d'oxyde de fer (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) et leur utilisation dans les applications biomédicales. En effet, ces particules ont l'avantage de pouvoir être utilisées comme agents de contraste en IRM (imagerie par résonance magnétique), de ciblage ou pour des applications d'hyperthermie.<sup>214,215</sup>

Lecommandoux et al. ont notamment encapsulé des particules ferromagnétiques dans la partie hydrophobe de micelles et de vésicules formées par le copolymère PB-*b*-PGA.<sup>216</sup> Ces auteurs ont montré la déformabilité de la membrane des vésicules contenant les particules magnétiques sous champ de faible intensité (0.1 Tesla) par des expériences de diffusion anisotrope de neutrons aux

petits angles.<sup>216</sup> La libération d'une espèce incorporée initialement dans le cœur aqueux pourrait alors être déclenchée par l'action d'un champ magnétique. En effet, il est prévu théoriquement que cette déformation sous champ peut être accompagnée de la formation de trous dans la membrane,<sup>217</sup> provoquant ainsi une perméabilité et donc une libération du contenu de la vésicule.

Une autre idée serait d'utiliser la capacité des particules magnétiques à provoquer localement une élévation de température sous l'action d'ondes radio-fréquences. En effet, il a été montré qu'une telle irradiation d'un ferrofluide aux alentours de 1MHz pendant quelques minutes provoque un fort échauffement (qui peut aller jusqu'à 80°C, en fonction de la concentration), tandis qu'elle permet de tuer des cellules marquées par ces mêmes nanoparticules, sans augmenter la température moyenne.<sup>218</sup> Cet échauffement très localisé, connu sous le nom d'hyperthermie,<sup>219</sup> est dû à la dissipation thermique produit par la mise en rotation des nanoparticules magnétiques, dont le temps caractéristique de rotation est de l'ordre de  $10^{-6}$  s (pic de résonance proche de 1MHz). Le polymère thermosensible, incorporant ces particules magnétiques, peut donc précipiter par augmentation « indirecte » de la température, ce qui peut représenter un intérêt notamment pour le relargage contrôlé de médicaments.<sup>220</sup> Pour cela différentes équipes se sont focalisées sur le développement de systèmes basés sur des nanoparticules magnétiques comportant un bloc thermosensible, et dans la plupart des cas les homopolymères et copolymères utilisés sont à base de PNIPAAm.<sup>221,222,223,224,225,226,227,228</sup>

Gao et al. ont utilisé des particules superparamagnétiques à base d'oxyde de fer comme agents de contraste de systèmes micellaires issus de PCL-*b*-PEO en vue d'applications de relargage de principes actifs.

La lumière peut également permettre une dissociation du système micellaire et donc un relargage des molécules encapsulées.

Zhao et al. ont synthétisé des copolymères diblocs constitués d'un segment hydrophile, le PEO et d'un segment hydrophobe à base de poly(méthacrylate).<sup>229</sup> Des molécules de pyrène sont attachées de manière covalente *via* une liaison ester aux blocs hydrophobes. Ce copolymère amphiphile s'auto-assemble dans l'eau permettant ainsi la stabilisation du pyrène dans le cœur des micelles. L'irradiation UV provoque la rupture des liaisons esters, par conséquent les blocs hydrophobes de polyméthacrylate deviennent hydrophiles (poly(acide méthacrylique)) conduisant à la solubilisation des micelles. Une molécule hydrophobe fluorescente, le Nile Red (figure I-34), a pu être encapsulée dans le cœur des micelles et son relargage a pu être mis en évidence par des mesures de fluorescence après irradiation.

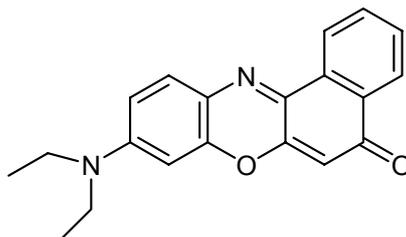


Figure I-34 : Structure chimique du Nile Red

## ***C-3 PIC pour la thérapie génique***

Les complexes de polyions (PIC) peuvent également être utilisés comme nano-vecteurs notamment pour la thérapie génique. Une voie prometteuse est d'utiliser des copolymères à blocs composés d'un polycation et d'un bloc PEO afin de complexer l'ADN chargé négativement pour former des PIC. Par exemple, un simple mélange d'ADN avec le copolymère PEO-*b*-PLys résulte en la formation spontanée de micelles de 100nm de diamètre possédant une excellente stabilité colloïdale.<sup>230,231</sup> Quand les micelles de PEO-*b*-PLys/ADN sont injectées en intraveineuse, l'ADN se trouve intact après 3h de circulation dans le sang alors que l'ADN seul est éliminé de la circulation dans les 5min.<sup>232</sup>

## **CONCLUSION**

Nous avons pu prendre conscience, grâce à cette étude bibliographique, de la richesse des copolymères à blocs existants, capable de former des nanoparticules adaptées au relargage contrôlé de médicaments.

C'est dans cet esprit de concevoir de nouveaux nano-objets adaptatifs et multifonctionnels en vue de futures applications biomédicales que s'est inscrite cette thèse. Pour cela, nous nous sommes orientés vers les copolymères à blocs « hybrides » peptidique/non peptidique multistimulables qui, comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, portent le plus d'intérêt. En effet, en plus de leur capacité à répondre aux changements des différents paramètres expérimentaux, ils peuvent également changer de conformation secondaire, leur conférant des propriétés d'auto-association d'autant plus intéressantes, grâce à la présence du bloc peptique qui permet également d'augmenter la biocompatibilité de ces systèmes.

Il apparaît clairement que les nanoparticules capables de répondre à des changements de température et de pH sont les plus aptes à être utilisées dans le domaine biomédical. A cet effet, nous avons développé une nouvelle génération de copolymères à blocs « hybrides » peptidique/non peptidique doublement stimulables, le poly(méthacrylate de 2-(méthyle amino) éthyle)-*b*-poly(acide glutamique) (PMADAME-*b*-PGA) et le Jeffamine-*b*-poly(acide glutamique) (Jeffamine-*b*-PGA), dont l'étude des comportements en milieu aqueux a permis de mettre en évidence l'obtention d'une multitude de morphologies en fonction de ces deux stimuli (chapitre III).

Même si la température correspond au stimulus le plus répandu pour perturber la solubilité des copolymères à blocs, les systèmes utilisés dans le domaine de l'encapsulation et du relargage contrôlé de principe actifs restent cependant à base de polymères à LCST. Ce type de relargage en abaissant la température ne semble cependant pas très approprié pour des applications biomédicales car les zones infectées présentent des températures supérieures à la température physiologique. Les systèmes les plus adaptés seraient ceux constitués d'un bloc hydrophile et d'un autre à UCST. Ainsi, l'augmentation de température entraînerait la solubilisation des micelles et le relargage des molécules actives. De tels systèmes n'ont toutefois pas encore été développés du fait de leur complexité.

C'est encore une fois dans un esprit d'innovation tourné vers la conception de ce type de nouvelles nanoparticules que s'est orientée ma thèse avec la synthèse d'un nouveau copolymère « hybride » comportant un bloc hydrophile et un bloc à UCST : le poly(méthacrylate de 2-(méthyle amino) éthyle)propane sultone-*b*-poly(acide glutamique) (PSPE-*b*-PGA).

Nous avons vu également que les particules magnétiques occupent un rôle de plus en plus important dans le domaine des nanotechnologies. Pour cela, nous avons également synthétisé un copolymère à blocs, poly(méthacrylate de 2-(méthyle amino) éthyle)-*b*-poly(L-glutamate de  $\gamma$ -benzyle) (PMADAME-*b*-PBLG), renfermant des particules magnétiques afin de pouvoir cibler et diriger ces nanoparticules vers les zones infectées de l'organisme. Nous tenterons également, par la présence de la couronne thermosensible à LCST, d'étudier le relargage de principe actif en fonction du champ magnétique appliqué, en utilisant le principe d'hyperthermie.

Ce travail très ambitieux et très innovant n'est possible qu'à condition d'obtenir de tels systèmes. Le développement des techniques de polymérisation a permis de synthétiser des copolymères à blocs de plus en plus complexes et adaptatifs. Ainsi, nous avons mis au point une nouvelle méthodologie de synthèse « universelle » de copolymères à blocs basée sur le couplage quantitatif *via* la « chimie click » de deux homopolymères préalablement fonctionnalisés. Ainsi, nous avons pu synthétiser le copolymère à blocs PMADAME-*b*-PBLG hydrolysable en poly(méthacrylate de 2-(méthyle amino) éthyle)-*b*-poly(acide glutamique) (PMADAME-*b*-PGA), ce dernier pouvant être quaternisé pour donner naissance au poly(méthacrylate de 2-(méthyle amino) éthyle)propane sultone-*b*-poly(acide glutamique) (PSPE-*b*-PGA).

Afin de montrer le caractère « universel » de cette nouvelle méthodologie, nous avons également synthétisé un copolypeptide poly(L-glutamate de  $\gamma$ -benzyle)-*b*-poly(trifluoroacetyl-L-lysine) (PBLG-*b*-PTFALys).

A ceci s'ajoute également une autre méthodologie plus classique basée sur la polymérisation séquentielle pour l'obtention des copolymères à blocs Jeffamine-*b*-PGA.

C'est par cette partie de synthèse des copolymères à blocs que nous allons commencer cette étude (chapitre II) qui sera suivie par l'analyse de leur comportement en milieu aqueux (chapitre III).

## Références bibliographiques

- <sup>1</sup> Antonietti, M.; Förster, S. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1323.
- <sup>2</sup> Gohy, J.-F. *Adv. Polym. Sci.* **2005**, *190*, 65.
- <sup>3</sup> Thünemann, A. F.; Müller, M.; Dautzenberg, H.; Joanny, J.-F.; Löwen, H. *Adv. Polym. Sci.* **2004**, *166*, 113
- <sup>4</sup> Riess, G. *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 1107.
- <sup>5</sup> Rodríguez-Hernández, J.; Chécot, F.; Gnanou, Y.; Lecommandoux, S. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 691.
- <sup>6</sup> Ilhan, F.; Galow, T. H.; Gray, M.; Clavier, G.; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5895.
- <sup>7</sup> Deans, R.; Ilhan, F.; Rotello, V. M. *Macromolecules* **1999**, *32*, 4956.
- <sup>8</sup> Thibault, R. J.; Hotchkiss, P. J.; Gray, M.; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11249.
- <sup>9</sup> Uzun, O.; Sanyal, A.; Nakade, H.; Thibault, R. J.; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14773.
- <sup>10</sup> Cölfen, H. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22*, 219.
- <sup>11</sup> Hamley, I. W., *The Physics of Block Copolymers*. Oxford University Press: Oxford, 1998.
- <sup>12</sup> de Gennes, P. G., *Solid state physics*. Academic ed.; New York, **1978**.
- <sup>13</sup> Daoud, M.; Cotton, J. P. *Journal de Physique* **1982**, *43*, 531.
- <sup>14</sup> Zhulina, E. B.; Birshtein, T. M. *Polymer science* **1986**, *27*, 570.
- <sup>15</sup> Halperin, A. *Macromolecules* **1987**, *20*, 2943.
- <sup>16</sup> Wu, C.; Gao, J. *Macromolecules* **2000**, *33*, 645.
- <sup>17</sup> Shusharina, N. P.; Nyrkova, I. A.; Khokhlov, A. R. *Macromolecules* **1996**, *29*, 3167.
- <sup>18</sup> Noolandi, J.; Hong, K. M. *Macromolecules* **1983**, *16*, 1443.
- <sup>19</sup> Leibler, L.; Orland, H.; Wheeler, J. C. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 3550.
- <sup>20</sup> Nagarajan, R.; Ganesh, K. *Macromolecules* **1989**, *22*, 4312.
- <sup>21</sup> Israelachvili, J. N., *Intermolecular and surfaces forces*. Hartcourt Brace & Company: London, 1992.
- <sup>22</sup> Discher, D. E.; Eisenberg, A. *Science* **2002**, *297*, 967.
- <sup>23</sup> Discher, D. E.; Ahmed, F. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8*, 323.
- <sup>24</sup> Allen, C.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. *Colloids and Surf. B: Biointerfaces* **1999**, *16*, 3.
- <sup>25</sup> Zhang, L.; Shen, H.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1997**, *30*, 1001.
- <sup>26</sup> Shen, H.; Eisenberg, A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 9473.
- <sup>27</sup> Lasic, D. D.; Templeton, N. S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *20*, 221.
- <sup>28</sup> Zupancich, J. A.; Bates, F. S.; Hillmyer, M. A. *Macromolecules* **2006**, *39*, 4286.
- <sup>29</sup> Geng, Y.; Discher, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12780.
- <sup>30</sup> Zhang, L. F.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1996**, *29*, 8805.
- <sup>31</sup> Persigehl, P.; Jordan, R.; Nuyken, O. *Macromolecules* **2000**, *33*, 6977.
- <sup>32</sup> a) Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *112*, 630. b) Nishiyama, N.; Bae, Y.; Miyata, K.; Fukushima, S.; Kataoka, K. *Drug Discov. Today: Technologies* **2005**, *2*, 21. c) Kakizawa, Y.;

- Kataoka, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 203. d) Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47*, 113. e) Kwon, G. S.; Kataoka, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16*, 295.
- <sup>33</sup> Torchilin, V. P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1532.
- <sup>34</sup> Francis F. F.; Cristea M.; M., W. F. *Pure Appl. Chem* **2004**, *76*, 1321.
- <sup>35</sup> Allen, C.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. *Colloids and Surf. B: Biointerfaces* **1999**, *16*, 3.
- <sup>36</sup> Wong, S. Y.; Pelet, J. M.; Putnam, D. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 799.
- <sup>37</sup> Klok, H.-A.; Lecommandoux, S. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1217.
- <sup>38</sup> Gil, E. S.; Hudson, S. M. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 1173.
- <sup>39</sup> Schmaljohann, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1655.
- <sup>40</sup> Rapoport, N. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 962.
- <sup>41</sup> Chilkoti, A.; Dreher, M. R.; Meyer, D. E.; Raucher, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 613.
- <sup>42</sup> Dimitrov, I.; Trzebicka, B.; Muller, A. H. E.; Dworak, A.; Tsvetanov, C. B. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 1275.
- <sup>43</sup> Engin, E.; Leeper, D. B.; Cater, J. R.; Thistlethwaite, A. J.; Tupchong, L.; McFarlane, J. D. *Int. J. Hyperthermia* **1995**, *11*, 211.
- <sup>44</sup> Taylor, L. D.; Cerankowski, L. D. J. *Pol. Sci.: Polym. Chem. Ed.* **1975**, *13*, 2551.
- <sup>45</sup> Zhang, G.; Wu, C. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *195*, 101.
- <sup>46</sup> Aseyev, V.; Tenhu, H.; Winnik, F. M. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *196*, 1.
- <sup>47</sup> C. Wu, S. Zhou *Macromolecules* **1995**, *28*, 8381.
- <sup>48</sup> C. Wu, X. Qiu *Physica Rev. Letters* **1998**, *80*, 620.
- <sup>49</sup> K. Chan, R. Pelton, J. Zhang *Langmuir* **1999**, *15*, 4018.
- <sup>50</sup> Schild, H. G. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17*, 163.
- <sup>51</sup> Qiu, Y.; Park, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *53*, 321.
- <sup>52</sup> Alexandridis, P.; Hatton, T. A. *Colloids and Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* **1995**, *96*, 1.
- <sup>53</sup> Kirsh, Y. E., *Water -soluble poly-N-ninylamides*. Wiley: Chichester, **1998**.
- <sup>54</sup> Nishi, T.; Kwei, T. K. *Polymer* **1975**, *16*, 285.
- <sup>55</sup> Butun, V.; Armes, S. P.; Billingham, N. C. *Polymer* **2001**, *42*, 5993.
- <sup>56</sup> Butun, V.; Billingham, N. C.; Armes, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11818.
- <sup>57</sup> Lin, P.; Clash, C.; Pearce, E. M.; Kwei, T. K.; Aponte, M. A. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **1988**, *26*, 603.
- <sup>58</sup> Christova, D.; Velichkova, R.; Loos, W.; Goethals, E. J.; Prez, F. D. *Polymer* **2003**, *44*, 2255.
- <sup>59</sup> Hoogenboom, R.; Thijs, H. M. L.; Wouters, D.; Hoepfener, S.; Schubert, U. S. *Soft Matter* **2008**, *4*, 103.
- <sup>60</sup> D.H. Napper, A.E. Alexander, *J. Polym. Sci.* **1962**, *61*, 127.
- <sup>61</sup> Verbrugghe, S.; Laukkanen, A.; Aseyev, V.; Tenhu, H.; Winnik, F. M.; Du Prez, F. E. *Polymer* **2003**, *44*, 6807.
- <sup>62</sup> Mori, H.; Iwaya, H.; Nagai, A.; Endo, T. *Chem. Commun.* **2005**, 4872.

- <sup>63</sup> Plamper, F. A.; Ruppel, M.; Schmalz, A.; Borisov, O.; Ballauff, M.; Muller, A. H. E. *Macromolecules* **2007**, *40*, 8361.
- <sup>64</sup> Grosberg, A. Y.; Khokhlov, A. R., *Statistical Physics of Macromolecules*. AIP Press: New York, **1994**.
- <sup>65</sup> Feil, H.; Bae, Y. H.; Feijen, J.; Kim, S. W. *Macromolecules* **1993**, *26*, 2496.
- <sup>66</sup> Deng, Y.; Pelton, R. *Macromolecules* **1995**, *28*, 4617.
- <sup>67</sup> Qiu, X.; Kwan, C. M. S.; Wu, C. *Macromolecules* **1997**, *30*, 6090.
- <sup>68</sup> Mi Kyong, Y.; Yong Kiel, S.; Chong, S. C.; Young, M. L. *Polymer* **1997**, *38*, 2759.
- <sup>69</sup> Hoffman, A. S. et al. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 577.
- <sup>70</sup> Neradovic, D.; Hinrichs, W. L. J.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; Hennink, W. E. *Macromol. Rapid Commun.* **1999**, *20*, 577.
- <sup>71</sup> Park, J. S.; Kataoka, K. *Macromolecules* **2006**, *39*, 6622.
- <sup>72</sup> Lutz, J. F.; Hoth, A. *Macromolecules* **2006**, *39*, 893.
- <sup>73</sup> Fournier, D.; Hoogenboom, R.; Thijs, H. M. L.; Paulus, R. M.; Schubert, U. S. *Macromolecules* **2007**, *40*, 915.
- <sup>74</sup> Jones, M. S. *Eur. Polym. J.* **1999**, *35*, 795.
- <sup>75</sup> Yoo, M. K.; Sung, Y. K.; Lee, Y. M.; Cho, C. S. *Polymer* **1998**, *39*, 3703.
- <sup>76</sup> Cho, S. H.; Jhon, M. S.; Yuk, S. H.; Lee, H. B. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **1997**, *35*, 595.
- <sup>77</sup> Irie, M.; Kunwatchakun, D. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2476.
- <sup>78</sup> Yoshida, T.; Kanaoka, S.; Aoshima, S. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 5337.
- <sup>79</sup> Sumaru, K.; Kameda, M.; Kanamori, T.; Shinbo, T. *Macromolecules* **2004**, *37*, 4949.
- <sup>80</sup> Desponds, A.; Freitag, R. *Langmuir* **2003**, *19*, 6261.
- <sup>81</sup> Kröger, R.; Menzel, H.; Hallensleben, M. L. *Macromol Chem. Phys.* **1994**, *195*, 2291.
- <sup>82</sup> Yusa, S.; Yamago, S.; Sugahara, M.; Morikawa, S.; Yamamoto, T.; Morishima, Y. *Macromolecules* **2007**, *40*, 5907.
- <sup>83</sup> Deng, L.; Shi, K.; Zhang, Y.; Wang, H.; Zeng, J.; Guo, X.; Du, Z.; Zhang, B. *J. Colloid Interf. Sci.* **2008**, *323*, 169.
- <sup>84</sup> Zhang, X.; Li, J.; Li, W.; Zhang, A. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3557.
- <sup>85</sup> Xia, Y.; Burke, N. A. D.; Stover, H. D. H. *Macromolecules* **2006**, *39*, 2275.
- <sup>86</sup> Chung, J. E.; Yokoyama, M.; Suzuki, K.; Aoyagi, T.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Colloids and Surf. B: Biointerfaces* **1997**, *9*, 37.
- <sup>87</sup> Chung, J. E.; Yokoyama, M.; Aoyagi, T.; Sakurai, Y.; Okano, T. *J. Control. Release* **1998**, *53*, 119.
- <sup>88</sup> Topp, M. D. C.; Dijkstra, P. J.; Talsma, H.; Feijen, J. *Macromolecules* **1997**, *30*, 8518.
- <sup>89</sup> Zhang, W.; Shi, L.; Wu, K.; An, Y. *Macromolecules* **2005**, *38*, 5743.
- <sup>90</sup> Virtanen, J.; Holappa, S.; Lemmetyinen, H.; Tenhu, H. *Macromolecules* **2002**, *35*, 4763.
- <sup>91</sup> Convertine, A. J.; Lokitz, B. S.; Vasileva, Y.; Myrick, L. J.; Scales, C. W.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Macromolecules* **2006**, *39*, 1724.
- <sup>92</sup> Liu, B.; Perrier, S. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 3643.

- <sup>93</sup> Konak, C.; Oupicky, D.; Chytrý, V.; Ulbrich, K.; Helmstedt, M. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5318.
- <sup>94</sup> Li, Y.; Lokitz, B. S.; McCormick, C. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5792.
- <sup>95</sup> Li, Y.; Smith, A. E.; Lokitz, B. S.; McCormick, C. L. *Macromolecules* **2007**, *40*, 8524.
- <sup>96</sup> Qin, S.; Geng, Y.; Discher, D. E.; Yang, S. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2905.
- <sup>97</sup> Singh, P. K.; Singh, V. K.; Singh, M. *e-polymers* **2007**, *30*, 1.
- <sup>98</sup> Kudaibergenov, S.; Jaeger, W.; Laschewsky, A. *Adv. Polym. sci.* **2006**, *201*, 157.
- <sup>99</sup> Weaver, J. V. M.; Armes, S. P.; Butun, V. *Chem. Commun.* **2002**, 2122.
- <sup>100</sup> Arotcarena, M.; Heise, B.; Ishaya, S.; Laschewsky, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3787.
- <sup>101</sup> Schulz, D. N.; Peiffer, D. G.; Agarwal, P. K.; Larabee, J.; Kaladas, J. J.; Soni, L.; Handwerker, B.; Garner, R. T. *Polymer* **1986**, *27*, 1734.
- <sup>102</sup> Chen, L.; Honma, Y.; Mizutani, T.; Liaw, D. J.; Gong, J. P.; Osada, Y. *Polymer* **2000**, *41*, 141.
- <sup>103</sup> Mary, P.; Bendejacq, D. D.; Labeau, M. P.; Dupuis, P. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7767.
- <sup>104</sup> Lee, W.-F.; Chen, Y.-M. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *91*, 726.
- <sup>105</sup> Liaw, D.-J.; Lee, W.-F.; Whung, Y.-C.; Lin, M.-C. *J. Appl. Polym. Sci.* **1987**, *34*, 999.
- <sup>106</sup> Ravi, P.; Dai, S.; Tam, K. C. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 22791.
- <sup>107</sup> Nesterenko, P. N.; Haddad, P. R. *Anal. Sci.* **2000**, *16*, 565.
- <sup>108</sup> Jia, X.; Chen, D.; Jiang, M. *Chem. Commun.* **2006**, 1736.
- <sup>109</sup> Plamper, F. A.; Schmalz, A.; Ballauf, M.; Müller, A. H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14538.
- <sup>110</sup> Philippova OE, Hourdet D, Audebert R, Khokhlov AR. *Macromolecules* **1997**, *30*, 8278–85.
- <sup>111</sup> Patrickios, C. S.; Hertler, W. R.; Abbott, N. L.; Hatton, T. A. *Macromolecules* **1994**, *27*, 930.
- <sup>112</sup> Liu, S.; Armes, S. P. *Langmuir* **2003**, *19*, 4432.
- <sup>113</sup> Butun, V.; Armes, S. P.; Billingham, N. C.; Tuzar, Z.; Rankin, A.; Eastoe, J.; Heenan, R. K. *Macromolecules* **2001**, *34*, 1503.
- <sup>114</sup> Martin, T. J.; Prochazka, K.; Munk, P.; Webber, S. E. *Macromolecules* **1996**, *29*, 6071.
- <sup>115</sup> Gohy, J. F.; Varshney, S. K.; Antoun, S.; Jerome, R. *Macromolecules* **2000**, *33*, 9298.
- <sup>116</sup> Vamvakaki, M.; Billingham, N. C.; Armes, S. P. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2088.
- <sup>117</sup> Borchert, U.; Lipprandt, U.; Bilanz, M.; Kimpfler, A.; Rank, A.; Peschka-Suss, R.; Schubert, R.; Lindner, P.; Forster, S. *Langmuir* **2006**, *22*, 5843.
- <sup>118</sup> Yusa, S.; Shimada, Y.; Mitsukami, Y.; Yamamoto, T.; Morishima, Y. *Macromolecules* **2003**, *36*, 4208.
- <sup>119</sup> Lee, A. S.; Butun, V.; Vamvakaki, M.; Armes, S. P.; Pople, J. A.; Gast, A. P. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8540.
- <sup>120</sup> Gohy, J. F.; Antoun, S.; Jerome, R. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7435.
- <sup>121</sup> Gabaston, L. I.; Furlong, S. A.; Jackson, R. A.; Armes, S. P. *Polymer* **1999**, *40*, 4505.
- <sup>122</sup> Butun, V.; Billingham, N. C.; Armes, S. P. *Chem. Commun.* **1997**, 671.
- <sup>123</sup> Giacomelli, C.; LeMen, L.; Borsali, R.; Lai-Kee-Him, J.; Brisson, A.; Armes, S. P.; Lewis, A. L. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 817.
- <sup>124</sup> Du, J.; Tang, Y.; Lewis, A. L.; Armes, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17982.

- <sup>125</sup> Butun, V. *Polymer* **2003**, *44*, 7321.
- <sup>126</sup> Bütün, V.; Liu, S.; Weaver, J. V. M.; Bories-Azeau, X.; Cai, Y.; Armes, S. P. *React. Funct. Polym.* **2006**, *66*, 157.
- <sup>127</sup> Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4177.
- <sup>128</sup> Liu, S.; Armes, S. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1413.
- <sup>129</sup> Bories-Azeau, X.; Armes, S. P.; vandenHaak, H. J. W. *Macromolecules* **2004**, *37*, 2348.
- <sup>130</sup> a) Mao, B. W.; Gan, L. H.; Gan, Y. Y.; Tam, K. C.; Tan, O. K. *Polymer* **2005**, *46*, 10045. b) Dai, S.; Ravi, P.; Tam, K. C.; Mao, B. W.; Gan, L. H. *Langmuir* **2003**, *19*, 5175.
- <sup>131</sup> Gohy, J. F.; Creutz, S.; Garcia, M.; Mahltig, B.; Stamm, M.; Jerome, R. *Macromolecules* **2000**, *33*, 6378.
- <sup>132</sup> Lowe, A. B.; Billingham, N. C.; Armes, S. P. *Chem. Commun.* **1997**, 1035.
- <sup>133</sup> Liu, S.; Billingham, N. C.; Armes, S. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2328.
- <sup>134</sup> Schilli, C. M.; Zhang, M.; Rizzardo, E.; Thang, S. H.; Chong, Y. K.; Edwards, K.; Karlsson, G.; Muller, A. H. E. *Macromolecules* **2004**, *37*, 7861.
- <sup>135</sup> André, X.; Zhang, M.; Müller, A. H. E. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 558.
- <sup>136</sup> Zhang, Y.; Wu, T.; Liu, S. *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 2492.
- <sup>137</sup> Hua, F.; Jiang, X.; Zhao, B. *Macromolecules* **2006**, *39*, 3476.
- <sup>138</sup> Sugihara, S.; Kanaoka, S.; Aoshima, S. *Macromolecules* **2005**, *38*, 1919.
- <sup>139</sup> Mertoglu, M.; Garnier, S.; Laschewsky, A.; Skrabania, K.; Storsberg, J. *Polymer* **2005**, *46*, 7726.
- <sup>140</sup> Hasan, E.; Zhang, M.; Müller, A. H. E.; Tsvetanov, C. B. *J. Macromol. Sci., Part A* **2004**, *41*, 467
- <sup>141</sup> Aoshima, S.; Sugihara, S. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2000**, *38*, 3962.
- <sup>142</sup> Arotcarena, M.; Heise, B.; Ishaya, S.; Laschewsky, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3787.
- <sup>143</sup> Virtanen, J.; Arotcarena, M.; Heise, B.; Ishaya, S.; Laschewsky, A.; Tenhu, H. *Langmuir* **2002**, *18*, 5360.
- <sup>144</sup> Weaver, J. V. M.; Armes, S. P.; Butun, V. *Chem. Commun.* **2002**, 2122.
- <sup>145</sup> Maeda, Y.; Mochiduki, H.; Ikeda, I. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1330.
- <sup>146</sup> Wang, D.; Yin, J.; Zhu, Z.; Ge, Z.; Liu, H.; Armes, S. P.; Liu, S. *Macromolecules* **2006**, *39*, 7378.
- <sup>147</sup> Thünemann, A. F.; Müller, M.; Dautzenberg, H.; Joanny, J.-F.; Löwen, H. *Adv. Polym. Sci.* **2004**, *166*, 113.
- <sup>148</sup> Park, J. S.; Akiyama, Y.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *Langmuir* **2007**, *23*, 138.
- <sup>149</sup> Kishimura, A.; Koide, A.; Osada, K.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6085.
- <sup>150</sup> Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1995**, *28*, 5294.
- <sup>151</sup> Koide, A.; Kishimura, A.; Osada, K.; Jang, W. D.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5988.
- <sup>152</sup> Kakizawa, Y.; Harada, A.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11247.
- <sup>153</sup> Harada, A.; Kataoka, K. *Science* **1999**, *283*, 65.
- <sup>154</sup> Gohy, J. F.; Varshney, S. K.; Jerome, R. *Macromolecules* **2001**, *34*, 3361.

- <sup>155</sup> Adams, D. J.; Rogers, S. H.; Schuetz, P. J. *Colloid Interf. Sci.* **2008**, *322*, 448.
- <sup>156</sup> Cohen Stuart, M. A.; Besseling, N. A. M.; Fokkink, R. G. *Langmuir* **1998**, *14*, 6846.
- <sup>157</sup> Gohy, J. F.; Varshney, S. K.; Jerome, R. *Macromolecules* **2001**, *34*, 2745.
- <sup>158</sup> Kabanov, A. V.; Bronich, T. K.; Kabanov, V. A.; Yu, K.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1996**, *29*, 6797.
- <sup>159</sup> Voets, I. K.; vanderBurgh, S.; Farago, B.; Fokkink, R.; Kovacevic, D.; Hellweg, T.; deKeizer, A.; CohenStuart, M. A. *Macromolecules* **2007**, *40*, 8476.
- <sup>160</sup> Weaver, J. V. M.; Armes, S. P.; Liu, S. *Macromolecules* **2003**, *36*, 9994.
- <sup>161</sup> Kricheldorf, H. R., Models od Biopolymers dy Ring Opening Polymerization. In Raton, B., Ed. **1990**.
- <sup>162</sup> Bamford, C. H., *Poly(Amini Acid)s Polypeptides and Proteins*. University of Wisconsin Press, **1962**.
- <sup>163</sup> Myer, Y. P. *Macromolecules* **1969**, *2*, 624.
- <sup>164</sup> Cesàro, A.; Paoletti, S.; Guidugli, S.; Benegas, J. C. *Biophys. Chem.* **1991**, *39*, 9.
- <sup>165</sup> Vorobjev, Y. N.; Scheraga, H. A.; Honig, B. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 7180.
- <sup>166</sup> Davidson, B.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1967**, *6*, 1616.
- <sup>167</sup> Snell, C. R.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1973**, *12*, 1017.
- <sup>168</sup> Dzwolak, W.; Muraki, T.; Kato, M.; Taniguchi, Y. *Biopolymers* **2004**, *73*, 463.
- <sup>169</sup> Hule, R. A.; Pochan, D. J. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* **2007**, *45*, 239.
- <sup>170</sup> Schlaad, H. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *202*, 53.
- <sup>171</sup> Rodriguez-Hernandez, J.; Lecommandoux, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2026.
- <sup>172</sup> Holowka, E. P.; Pochan, D. J.; Deming, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12423.
- <sup>173</sup> Bellomo, E. G.; Wyrsta, M. D.; Pakstis, L.; Pochan, D. J.; Deming, T. J. *Nat Mater* **2004**, *3*, 244.
- <sup>174</sup> Lazzari, M.; Liu, G.; Lecommandoux, S., *Block copolymers in Nanoscience*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: Darmstadt, **2006**.
- <sup>175</sup> Kopecek, J.; Yang, J. *Polym. Int.* **2007**, *56*, 1078.
- <sup>176</sup> Wang, C.; Stewart, R. J.; Kopecek, J. *Nature* **1999**, *397*, 417.
- <sup>177</sup> Deming, T. J. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 858.
- <sup>178</sup> Osada, K.; Kataoka, K. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *202*, 113.
- <sup>179</sup> Kukula, H.; Schlaad, H.; Antonietti, M.; Forster, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1658.
- <sup>180</sup> Checot, F.; Brulet, A.; Oberdisse, J.; Gnanou, Y.; Mondain-Monval, O.; Lecommandoux, S. *Langmuir* **2005**, *21*, 4308.
- <sup>181</sup> Chécot, F.; Lecommandoux, S.; Klok, H. A.; Gnanou, Y. *Eur Phys J E* **2003**, *10*, 25.
- <sup>182</sup> Chécot, F.; Lecommandoux, S.; Gnanou, Y.; Klok, H. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1339.
- <sup>183</sup> Babin, J.; Rodriguez-Hernandez, J.; Lecommandoux, S.; Klok, H.-A.; Achard, M.-F. *Faraday Discuss.* **2005**, *128*, 179.
- <sup>184</sup> Gebhardt, K. E.; Ahn, S.; Venkatachalam, G.; Savin, D. A. *J. Colloid Interf. Sci.* **2008**, *317*, 70.
- <sup>185</sup> Arimura, H.; Ohya, Y.; Ouchi, T. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 720.
- <sup>186</sup> Lubbert, A.; Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Nuhn, H.; Scholl, M.; Bourdillon, L.; Wandrey, C.; Klok, H. A. *Langmuir* **2005**, *21*, 6582.

- <sup>187</sup> Rao, J.; Luo, Z.; Ge, Z.; Liu, H.; Liu, S. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3871.
- <sup>188</sup> Toyotama, A.; Kugimiya, S.-i.; Yamanaka, J.; Yonese, M. *Chem. Pharma. Bul.* **2001**, *49*, 169.
- <sup>189</sup> Yoo, M. K.; Jang, M. K.; Nah, J. W.; Park, M. R.; Cho, C. S. *Macromol. Chem. Phys.* **2006**, *207*, 528.
- <sup>190</sup> Chung, T. W.; Kim, B. J.; Park, S. Y.; Akaike, T.; Nah, J. W.; Cho, C. S. *Macromolecules* **2000**, *33*, 8921.
- <sup>191</sup> Cheon, J.-B.; Jeong, Y.-I.; Cho, C.-S. *Polymer* **1999**, *40*, 2041.
- <sup>192</sup> Cho, C.-S.; Cheon, J.-B.; Jeong, Y.-I.; Kim, I.-S.; Kim, S.-H.; Akaike, T. *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18*, 361.
- <sup>193</sup> Constancis, A.; Meyrueix, R.; Bryson, N.; Hulle, S.; Grosselin, J.-M.; Gulik-Krzywicki, T.; Soula, G. *J. Colloid Interf. Sci.* **1999**, *217*, 357.
- <sup>194</sup> a) Francis, F. F.; Cristea, M.; Winnik, F. M. *Pure Appl. Chem* **2004**, *76*, 1321; b) Kakizawa, Y.; Kataoka, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 203; c) Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47*, 113; d) Kwon, G. S.; Kataoka, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16*, 295; e) Nishiyama, N.; Bae, Y.; Miyata, K.; Fukushima, S.; Kataoka, K. *Drug Discov. Today: Technologies* **2005**, *2*, 21; f) Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *112*, 630; g) Rapoport, N. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 962.33; h) Torchilin, V. P. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2004**, *61*, 2549; i) Torchilin, V. P. *Expert. Opin. Ther. Pat* **2005**, *15*, 63; k) Torchilin, V. P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1532; l) Yu, B. G.; Okano, T.; Kataoka, K.; Kwon, G. *J. Control. Release* **1998**, *53*, 131; m) Schmaljohann, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1655;
- <sup>195</sup> Kwon, G.; Suwa, S.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **1994**, *29*, 17.
- <sup>196</sup> Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **1994**, *32*, 269.
- <sup>197</sup> Yokoyama, M.; Sugiyama, T.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Naito, M.; Kataoka, K. *Pharmac. Res.* **1993**, *10*, 895.
- <sup>198</sup> Matsumura, Y.; Hamaguchi, T.; Ura, T.; Muro, K.; Yamada, Y.; Shimada, Y. e. al. *Br J Cancer* **2004**, *91*, 1775.
- <sup>199</sup> Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J. *Nature* **1995**, *377*, 649.
- <sup>200</sup> Pinzani, V.; Bressolle, F.; Haug, I. J.; Galtier, M.; Blayac, J. P.; Balmès, P. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1994**, *35*, 1.
- <sup>201</sup> Siddik, Z. H.; Newell, D. R.; Boxall, F. E.; Harrap, K. R. *Biochem. Pharm.* **1987**, *36*, 1925.
- <sup>202</sup> Nishiyama, N.; Yokoyama, M.; Aoyagi, T.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. *Langmuir* **1999**, *15*, 377.
- <sup>203</sup> Nishiyama, N.; Kato, Y.; Sugiyama, Y.; Kataoka, K. *Pharma. Res.* **2001**, *18*, 1035.
- <sup>204</sup> Nishiyama, N.; Okazaki, S.; Cabral, H.; Miyamoto, M.; Kato, Y.; Sugiyama, Y.; Nishio, K.; Matsumura, Y.; Kataoka, K. *Cancer Res* **2003**, *63*, 8977.
- <sup>205</sup> Cabral, H.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **2007**, *121*, 146.

- <sup>206</sup> Cabral, H.; Nishiyama, N.; Okazaki, S.; Koyama, H.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **2005**, *101*, 223.
- <sup>207</sup> a) Bae, Y.; Fukushima, S.; Harada, A.; Kataoka, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4640 ;b) Nakanishi, T.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Suzuki, M.; Matsumura, Y.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **2001**, *74*, 295.;c) Kataoka, K.; Matsumoto, T.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Kwon, G. S. *J. Control. Release* **2000**, *64*, 143.;d) Yu, B. G.; Okano, T.; Kataoka, K.; Kwon, G. *J. Control. Release* **1998**, *53*, 131.;e) Kwon, G.; Naito, M.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **1997**, *48*, 195.;f) Yokoyama, M.; Kwon, G. S.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Naito, M.; Kataoka, K. *J. Control. Release* **1994**, *28*, 59.;g) Kataoka, K.; Kwon, G. S.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y. *J. Control. Release* **1993**, *24*, 119.
- <sup>208</sup> Neradovic, D.; Soga, O.; Van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2409.
- <sup>209</sup> Choi, S. H.; Lee, S. H.; Park, T. G. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1864.
- <sup>210</sup> Neradovic, D.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7589.
- <sup>211</sup> Qin, S.; Geng, Y.; Discher, D. E.; Yang, S. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2905.
- <sup>212</sup> Chung, J. E.; Yokoyama, M.; Okano, T. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 93.
- <sup>213</sup> Kohori, F.; Sakai, K.; Aoyagi, T.; Yokoyama, M.; Yamato, M.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **1999**, *16*, 195.
- <sup>214</sup> Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E. *J. Mat. Chem.* **2004**, *14*, 2161.
- <sup>215</sup> Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064.
- <sup>216</sup> a) Lecommandoux, S.; Sandre, O.; Checot, F.; Perzynski, R. *Prog. Solid State Chem.* **2006**, *34*, 171; b) Lecommandoux, S.; Sandre, O.; Checot, F.; Rodriguez-Hernandez, J.; Perzynski, R. *J. Magnet. Magnet. Mater.* **2006**, *300*, 71; c) Lecommandoux, S.; Sandre, O.; Chécot, F.; Rodriguez-Hernandez, J.; Perzynski, R. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 712
- <sup>217</sup> Stolbov, O. V.; Raikher, Y. L. *J. Magn.Magn. Mater.* **2006**, *300*, e199.
- <sup>218</sup> Roger, J.; Pons, J. N.; Massart, R.; Halbreich, A.; Bacri, J.-C. *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **1999**, *5*, 321.
- <sup>219</sup> Jordan, A.; Wust, P.; Fäßhlin, H.; John, W.; Hinz, A.; Felix, R. *Int. J. Hypert* **1993**, *9*, 51
- <sup>220</sup> Müller-Schulte, D.; Schmitz-Rode, T. *J. Magnet. Magnet. Mater.* **2006**, *302*, 267.
- <sup>221</sup> Xulu, P. M.; Filipcsei, G.; Zrinyi, M. *Macromolecules* **2000**, *33*, 1716.
- <sup>222</sup> Deng, Y. H.; Yang, W. L.; Wang, C. C.; Fu, S. K. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1729.
- <sup>223</sup> Furukawa, H.; Shimojyo, R.; Ohnishi, N.; Fukuda, H.; Kondo, A. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2003**, *62*, 478.
- <sup>224</sup> Lin, C. L.; Chiu, W. Y. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 5923.
- <sup>225</sup> Wakamatsu, H.; Yamamoto, K.; Nakao, A.; Aoyagi, T. *J. Magnet. Magnet. Mater.* **2006**, *302*, 327.
- <sup>226</sup> Zhang, J. L.; Srivastava, R. S.; Misra, R. D. K. *Langmuir* **2007**, *23*, 6342.
- <sup>227</sup> Narain, R.; Gonzales, M.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S.; Krishnan, K. M. *Langmuir* **2007**, *23*, 6299.

<sup>228</sup> Lai, J. J.; Hoffman, J. M.; Ebara, M.; Hoffman, A. S.; Estournes, C. E.; Wattiaux, A.; Stayton, P. S. *Langmuir* **2007**, *23*, 7385.

<sup>229</sup> Jiang, J.; Tong, X.; Zhao, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8290.

<sup>230</sup> Katayose, S.; Kataoka, K. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 702.

<sup>231</sup> Itaka, K.; Yamauchi, K.; Harada, A.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Kataoka, K. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4495.

<sup>232</sup> Harada-shiba, M.; Yamauchi, K.; Harada, A.; Takamisawa, I.; Shimokado, K.; Kataoka, K. *Gene Ther* **2002**, *9*, 407.



# Chapitre II

Stratégies de synthèse des  
copolymères à blocs adaptatifs



<b>A- Méthodes générales de synthèse des copolymères à blocs.....</b>	<b>82</b>
<b>A-1 Techniques de polymérisation .....</b>	<b>85</b>
A-1-1 ATRP .....	85
A-1-2 Polymérisation par ouverture de cycle des NCA.....	86
<b>B- Synthèse et caractérisation de nouveaux copolymères à blocs à base de polypeptides.....</b>	<b>89</b>
<b>B-1 Synthèse des copolymères à blocs « hybrides » via l'utilisation d'un macroamorceur : Jeffamine-<i>b</i>-PGA .....</b>	<b>89</b>
B-1-1 Voie « amine » .....	91
B-1-2 Voie « ammonium » .....	92
B-1-3 Déprotection des blocs PBLG.....	93
<b>B-2 Copolymères à blocs peptidiques obtenus par « chimie click » : PMADAME-<i>b</i>-PBLG et PBLG-<i>b</i>-PTFALys .....</b>	<b>94</b>
B-2-1 Synthèse des amorceurs $\alpha$ - $\omega$ -difonctionnels .....	95
B-2-2 Synthèse des copolymères à blocs « hybrides » PMADAME- <i>b</i> -PBLG par « chimie click » .....	99
a) voie séquentielle .....	99
b) voie « bi-têtes ».....	100
B-2-2-1 Synthèse des homopolymères $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnalisés PMADAME et PBLG.....	102
B-2-2-2 Réaction de couplage par « chimie click » .....	106
B-2-2-3 Synthèse des copolymères à double blocs hydrophiles stimulables : PMADAME- <i>b</i> -PGA .....	108
B-2-2-4 Synthèse des copolymères à double blocs hydrophiles stimulables : PSPE- <i>b</i> -PGA..	109
B-2-3 Synthèse des copolypeptides à blocs par « chimie click » PBLG- <i>b</i> -PTFALys.....	111
B-2-3-1 Synthèse des homopolymères $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnalisés PBLG et PTFALys .....	112
B-2-3-2 Réaction de couplage par « chimie click » .....	115
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>118</b>



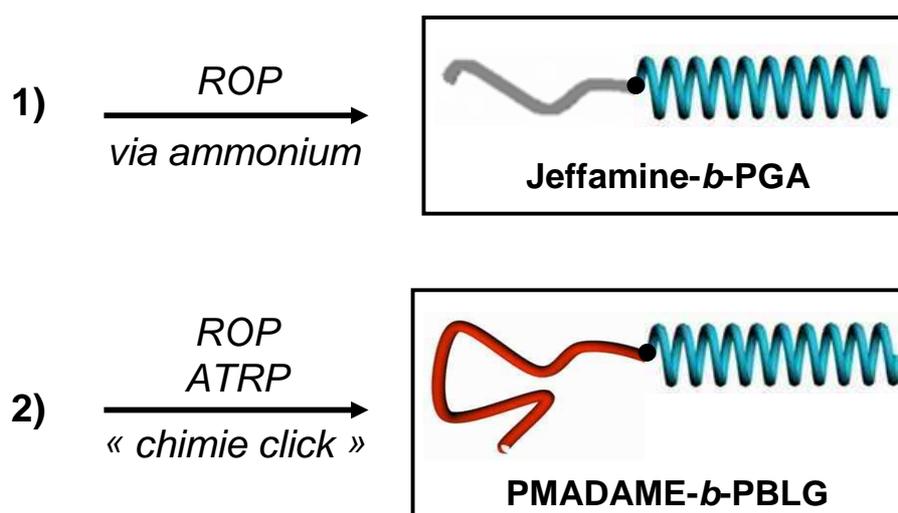
Ce chapitre décrit les différentes stratégies de synthèse que nous avons mises en œuvre pour accéder à de nouveaux copolymères à blocs « hybrides » peptidique/non peptidique capables de s'auto-assembler en milieu aqueux. Ces copolymères à blocs originaux présentent une double caractéristique : ils sont composés d'un bloc peptidique et sont multistimulables.

Comme nous l'avons souligné dans la partie bibliographique, les polypeptides apportent la biocompatibilité à nos systèmes en vue d'applications biomédicales. Leur structuration et changement de conformation à l'échelle nanométrique ainsi que la possibilité de les stimuler par des variations de pH, de température ou de force ionique pourraient permettre de développer des nano-vecteurs fonctionnels stimulables, applicables dans des conditions biologiques.

Le fait d'intégrer à ces polypeptides un autre bloc stimuable permet d'augmenter le caractère adaptatif de ces nano-objets et espérer ainsi la création d'une nouvelle génération de nano-vecteurs pour l'encapsulation et la délivrance contrôlée de médicaments.

Comme vu précédemment, les paramètres moléculaires des copolymères à blocs que nous avons synthétisés vont gouverner la morphologie et les dimensions caractéristiques des nanoparticules formées en milieu aqueux. Le but ici est donc de synthétiser des copolymères à blocs dont les paramètres moléculaires permettent d'obtenir les agrégats ciblés, c'est-à-dire des vésicules ou des micelles sphériques. Pour cela, nous avons utilisé des techniques de polymérisation « vivante/contrôlée » permettant l'association des différents blocs en contrôlant à la fois leur taille ainsi que leur distribution.

Deux familles de nouveaux copolymères à blocs à base de polypeptides ont été élaborées en suivant les stratégies de synthèse décrites ci-après :



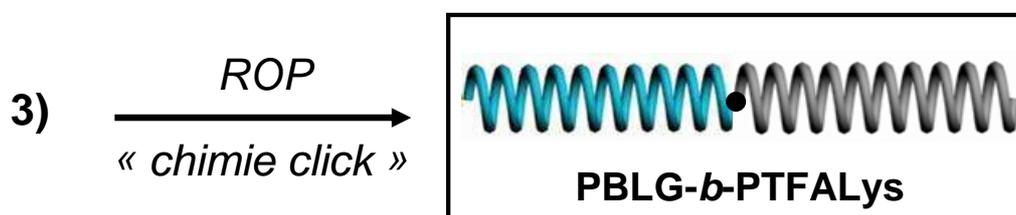
**Figure II-1 : Stratégies de synthèse des copolymères à blocs présents dans cette étude (ROP : polymérisation par ouverture de cycle ; ATRP : polymérisation radicalaire par transfert d'atome).**

1) Jeffamine-*b*-poly(acide glutamique) (Jeffamine-*b*-PGA), copolymère « hybride » non peptidique/peptidique à double blocs hydrophiles stimulables, synthétisé par polymérisation

séquentielle. Le macroamorceur Jeffamine, copolymère statistique comportant 6 unités d'oxyde d'éthylène et 29 unités d'oxyde de propylène, possède une amine primaire terminale permettant, sous sa forme neutre (voie amine) ou protonée (voie ammonium) l'amorçage de la polymérisation par ouverture de cycle (ROP pour ring opening polymerization) des NCA-BLG.

2) Le copolymère à blocs « hybrides » poly (méthacrylate de 2-(diméthyle amino) éthyle)-*b*-poly(L-glutamate de  $\gamma$ -benzyle) (PMADAME-*b*-PBLG) a été obtenu grâce à une méthodologie originale visant à coupler *via* la « chimie click » deux homopolymères fonctionnalisés : la PMADAME et le PBLG obtenus par polymérisation radicalaire contrôlée (ATRP pour Atom Transfer Radical Polymerization) et par ROP, respectivement

Afin de montrer la flexibilité de cette nouvelle méthodologie utilisant le couplage de deux homopolymères fonctionnalisés, nous avons également synthétisé un copolypeptide à blocs, le poly(L-glutamate de  $\gamma$ -benzyle)-*b*-poly(trifluoroacetyl-L-lysine) (PBLG-*b*-PTFALys) (figure II-2).



**Figure II-2 : Stratégie de synthèse des copolypeptides PBLG-*b*-PTFALys.**

Avant de décrire en détails les différentes étapes de ces synthèses, nous présentons de manière succincte les méthodes générales de synthèse menant à des copolymères à blocs ainsi que les principes et les mécanismes des différentes méthodes de polymérisation utilisées, à savoir i) la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) pour la synthèse de la MADAME et ii), la polymérisation par ouverture de cycle de NCA pour la synthèse des blocs peptidiques, PBLG et PTFALys.

## **A- Méthodes générales de synthèse des copolymères à blocs**

En règle générale, la synthèse de copolymères à blocs fait appel aux techniques de polymérisation « vivante/contrôlée ». <sup>1,2,3</sup> Taton et Gnanou ont récemment répertorié les différentes voies menant à l'obtention de copolymères à blocs de type A-*b*-B. <sup>4</sup> Quatre stratégies différentes peuvent être distinguées (Figure II-3).

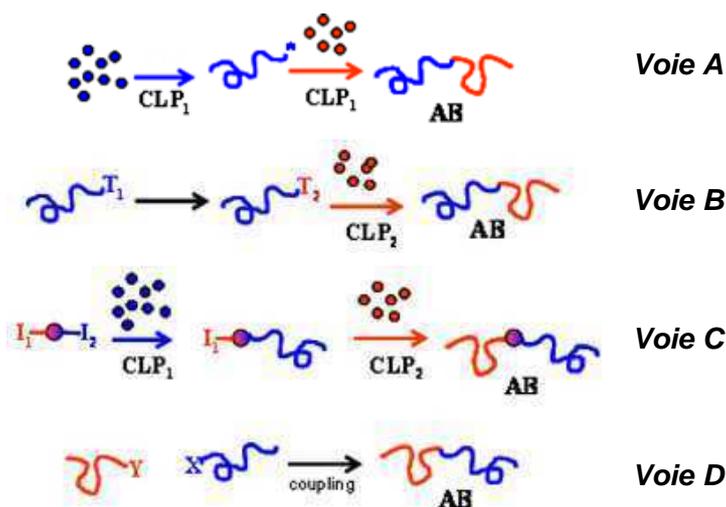


Figure II-3 : Stratégies de synthèse des copolymères à blocs.<sup>4</sup>

La polymérisation séquentielle de monomères (voie A) est la méthode la plus communément utilisée, notamment à l'échelle industrielle. D'autres stratégies sont néanmoins possibles parmi lesquelles, la combinaison de techniques différentes de polymérisation<sup>2</sup> (voie B), l'utilisation d'amorceurs bifonctionnels ou « bi-têtes » (voie C) ou bien le couplage d'homopolymères dotés à leur extrémité d'une fonction X et Y, respectivement, X et Y étant des groupements fonctionnels antagonistes (voie D).

Concernant la voie A, l'ordre d'addition des monomères est essentiel pour l'obtention des copolymères à blocs ciblés de structure bien définie. La chaîne en croissance correspondant à la polymérisation du premier monomère A doit être capable de réamorcer la polymérisation du second monomère B de façon quantitative et instantanée. Dans ce cas, quelle que soit la technique de polymérisation « vivante/contrôlée » mise en jeu, la « règle d'or » est de respecter l'échelle de réactivité des espèces actives en commençant par la polymérisation du monomère formant le centre propageant le plus réactif avant de polymériser le deuxième monomère.

La polymérisation anionique séquentielle du styrène et des diènes est l'exemple typique de la synthèse de copolymères à blocs *via* cette stratégie.<sup>5</sup>

L'utilisation d'un polymère préformé comme macroamorceur pour la croissance du deuxième bloc suivant un mécanisme différent de polymérisation (voie B) est une alternative pour accéder à des copolymères à blocs.<sup>6</sup> Cette voie B fait donc appel à des techniques de polymérisation différentes (anioniques/cationiques, radicalaire/anioniques, etc....). Le centre actif T1 est d'abord chimiquement modifié en groupement terminal T2 amorçant la polymérisation du deuxième monomère. L'étape de modification chimique des extrémités de chaînes du premier bloc peut être réalisée *in situ* ou bien après avoir isolé le précurseur.

La voie C se réfère à l'utilisation d'amorceurs contenant deux fonctions réactives capables d'amorcer la polymérisation de monomères suivant deux techniques différentes, si possible sans interférence entre les deux mécanismes de polymérisation.<sup>7</sup>

Enfin, une dernière stratégie consiste à coupler deux homopolymères portant chacun à leur extrémité une fonction réactive (voie D). Une telle méthode nécessite des réactions de couplage

sélectives, rapides et quantitatives, critères souvent difficiles à satisfaire, du fait de l'encombrement stérique et de l'incompatibilité chimique entre les deux homopolymères tendant à diminuer la réactivité entre les fonctions antagonistes.

Très récemment, une stratégie de couplage donnant lieu à des copolymères à blocs basée sur la « chimie click » a été développée avec succès par quelques équipes.<sup>8,9,10,11,12,13,14,15,16</sup> La « chimie click », terme introduit par Sharpless en 2001 combine différents avantages.<sup>17</sup> Tout d'abord, elle met en oeuvre des conditions expérimentales douces ; elle présente également une grande tolérance vis-à-vis des groupements fonctionnels. Enfin, elle conduit à des rendements quasi-quantitatifs (>95%) mettant en jeu l'assemblage entre elles de petites unités via des liaisons hétéroatomiques. Ce mode de synthèse est en fait directement inspiré de la nature puisque les protéines, les acides nucléiques et les polysaccharides sont des polymères naturels constitués de petites unités reliées par des liaisons hétéroatomiques.<sup>17</sup> Depuis environ 5 ans, les polyméristes ont largement exploité la « chimie click » en ingénierie macromoléculaire pour la synthèse de copolymères, de dendrimères, de polymères cycliques, de gels ... parfois impossible à élaborer par d'autres méthodes (figure II-4).

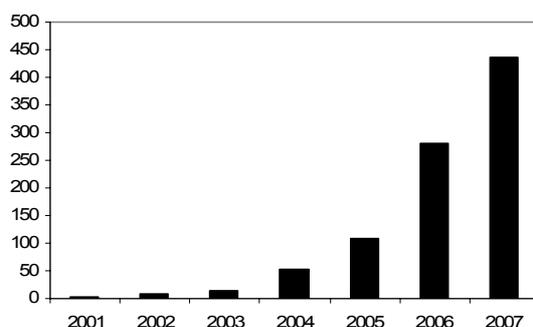


Figure II-4 : Articles portant sur la « chimie click » référencés dans SciFinder depuis 2001.

En 2007, pas moins de 5 articles de revues ont été publiés sur l'application de la « chimie click » appliquée au domaine de l'ingénierie macromoléculaire.<sup>18,19,20,21,22</sup> En juillet 2008, un numéro spécial de *Macromolecular Rapid Communication* a été consacré à ce sujet.

Parmi toutes les réactions qu'englobe la « chimie click », la cycloaddition 1,3, dipolaire dite de Huisgen<sup>23</sup> est certainement la plus utilisée en chimie des polymères. Cette réaction met en jeu une fonction alcyne et une fonction azoture pour donner lieu à la formation d'un groupement 1,2,3-triazole de façon hautement régiosélective lorsque la réaction est catalysée par des sels de cuivre(I)<sup>24,25</sup> (forme 1,4-triazole) comme le montre le schéma II-1. Nous montrerons plus loin comment nous avons appliqué la « chimie click » pour la synthèse de copolymères à blocs peptidiques.

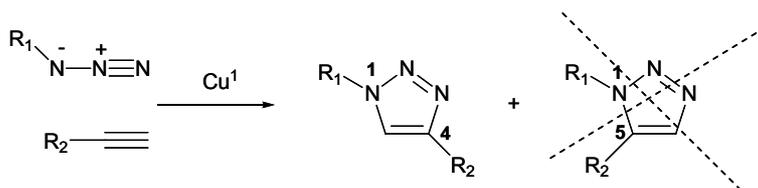


Schéma II-1 : Principe de la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par du cuivre(I).

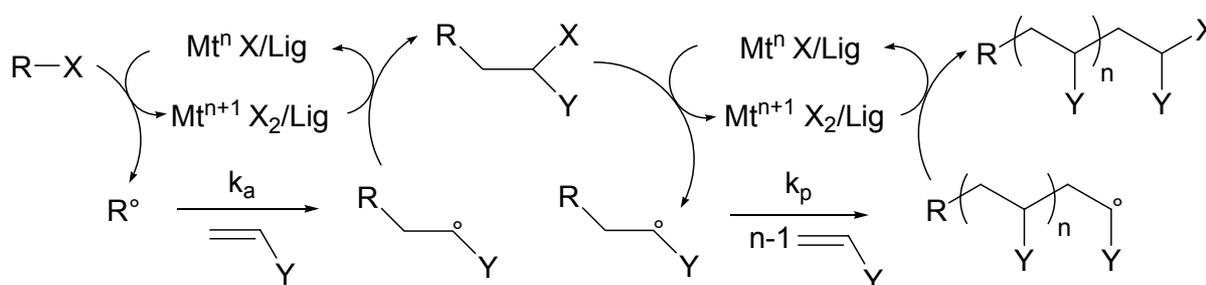
Parmi les quatre voies décrites plus haut pour accéder aux copolymères à blocs, nous avons exploré celle, notée B, fondée sur un changement de mécanisme de polymérisation et celle utilisant le couplage d'homopolymères fonctionnalisés à l'une des extrémités (voie D).

Avant de décrire en détails ces synthèses, nous présentons ci-dessous brièvement les principes et les mécanismes des deux principales techniques de polymérisations utilisées, à savoir i) la polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) pour la synthèse des blocs synthétiques et non peptidiques et ii) la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) des N-Carboxyanhydrides (NCA) concernant la croissance des blocs peptidiques.

## **A-1 Techniques de polymérisation**

### **A-1-1 ATRP**

La méthode ATRP utilise un complexe organométallique pour créer et désactiver des radicaux suivant un mécanisme d'oxydo-réduction (Schéma II-2).



**Schéma II-2 : Principe général de la méthode ATRP**

La réduction par clivage homolytique d'un composé  $\omega$ -halogéné servant d'amorceur par un complexe d'un métal de transition conduit à la formation d'un radical et du complexe métallique oxydé porteur de l'halogène. Ce dernier peut à son tour céder l'halogène et reprendre son degré d'oxydation initial. La répétition du même processus permet ainsi le contrôle de la polymérisation.<sup>26,27</sup> L'avantage principal de cette méthode vient de la possibilité de moduler l'activité de la polymérisation en ajustant la concentration et la nature chimique du système catalytique par le choix du complexe métal/ligand. Les températures de polymérisation peuvent varier de l'ambiante jusqu'à 130°C.

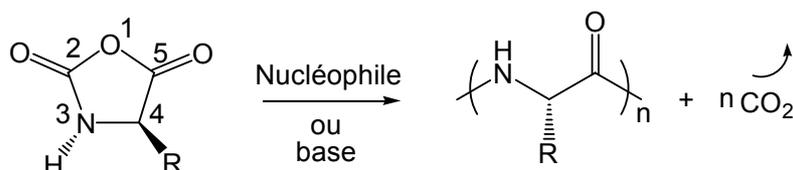
Sous leur forme dormante, les chaînes sont dotées d'une extrémité halogénée que l'on peut facilement modifier pour introduire un certain nombre de groupes fonctionnels (hydroxyle, amine,...), par exemple par addition radicalaire à l'aide de monomères fonctionnels non homo-polymérisables, ou bien par substitution/addition nucléophile ou électrophile.<sup>26,27</sup>

La plupart des monomères vinyliques peuvent être polymérisés de manière contrôlée par ATRP, à l'exception des monomères susceptibles de perturber l'activité du catalyseur comme l'acide acrylique ou l'acrylamide, et des monomères réputés difficiles comme l'acétate de vinyle ou le chlorure de vinyle.

Le fait que le processus soit contrôlé dans le cas de nombreux monomères fonctionnels a été mis à profit pour la synthèse de polymères et copolymères stimulables.

### **A-1-2 Polymérisation par ouverture de cycle des NCA**

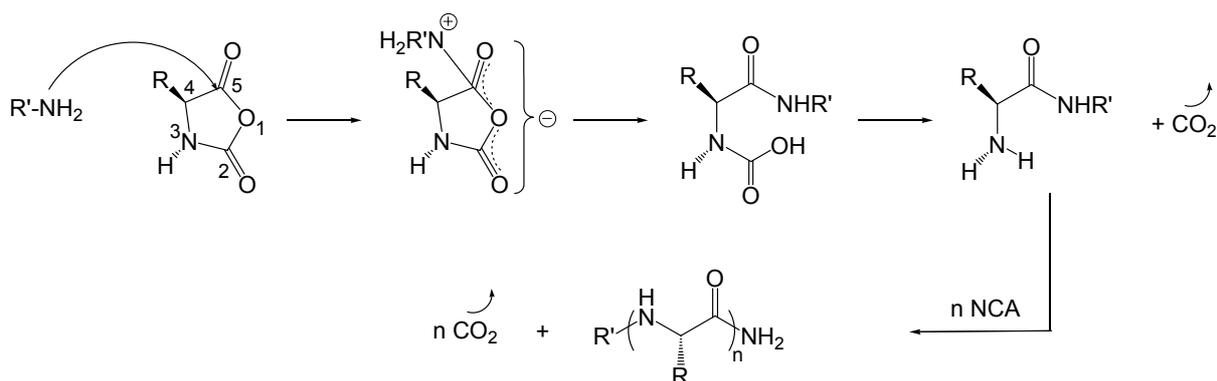
Une méthode de choix pour obtenir des polypeptides synthétiques consiste à polymériser par ouverture de cycle les N-CarboxyAnhydrides d' $\alpha$ -aminoacides<sup>28</sup> (NCA) ou anhydrides de Leuchs<sup>28</sup> (Schéma II-3). Le panel des monomères NCA disponibles est très large autorisant la préparation d'une grande diversité de polypeptides synthétiques.<sup>29,30,31</sup>



**Schéma II-3 : Principe de synthèse d'un polypeptide à partir d'un NCA.**

Les NCAs peuvent être polymérisés aussi bien en masse qu'en solution. En masse, la polymérisation est généralement réalisée à haute température et conduit à des polypeptides de faible degré de polymérisation. A contrario, la polymérisation en solution (dans le dioxane, le DMF, le THF ou le dichlorométhane) peut être réalisée à faible température et peut être contrôlée : des polypeptides synthétiques de masses molaires relativement élevées sont ainsi obtenus. Dans ce cas, il est nécessaire d'utiliser des solvants inertes et purs pour assurer la pérennité des centres actifs tout au long de la polymérisation.

Différents mécanismes de polymérisation par ouverture de cycle des NCAs ont été proposés suivant la nature de l'amorceur,<sup>32</sup> parmi lesquels, le mécanisme « amine ». Ce dernier correspond à une croissance « vivante/contrôlée » de chaînes telle que montrée dans le schéma II-4 avec une évolution linéaire des masses molaires avec la conversion du monomère.

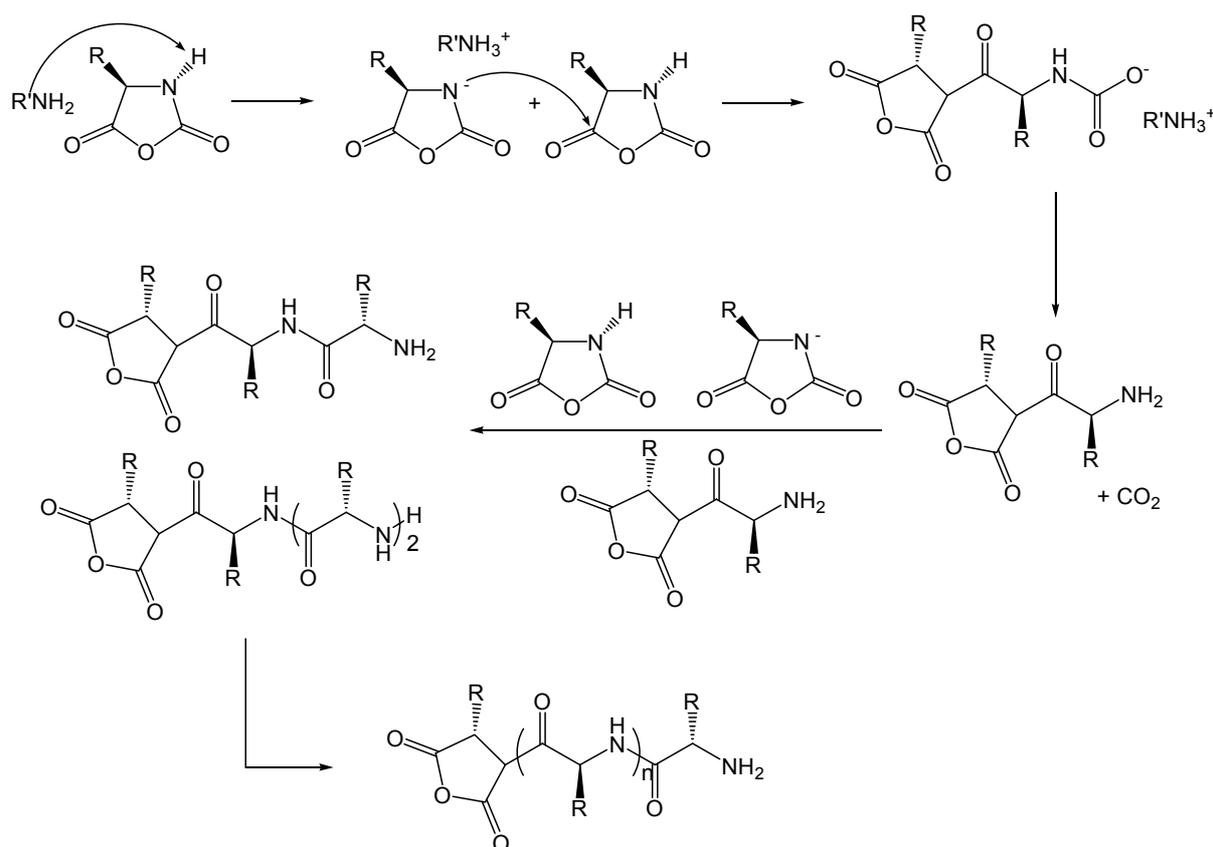


**Schéma II-4 : ROP des NCA par le mécanisme « amine » dans le cas d'un amorçage par une amine primaire.**

Dans ce cas, les amines utilisées possèdent un rapport nucléophilie/basicité élevé et l'amorçage s'effectue par attaque nucléophile directe sur le site C5 de l'hétérocycle. Après l'ouverture du cycle, une molécule de dioxyde de carbone est éliminée et l'adduit formé possède à son tour une

fonction amine primaire susceptible de propager la polymérisation selon le même mécanisme d'attaque nucléophile. Les amorceurs « aminés » sont ainsi incorporés dans la chaîne en croissance. Les amines primaires aliphatiques et les amines secondaires peu encombrées sont plus nucléophiles que la chaîne en croissance. En conséquence, la durée de l'amorçage est courte par rapport à celle de la propagation, ce qui confère à ce mécanisme de polymérisation un caractère « vivant » : le degré de polymérisation est directement corrélé au rapport  $[M]_0/[A]_0$  et la distribution des masses molaires est étroite.

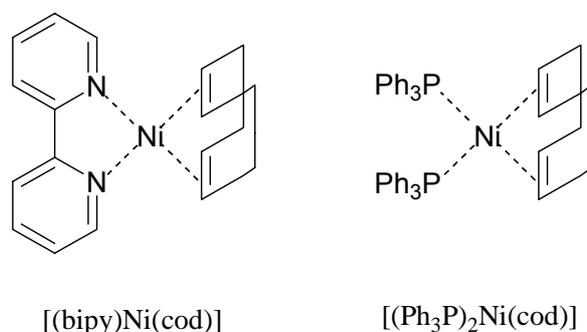
Les polypeptides obtenus par ROP sont parfois mal définis et caractérisés par une distribution large des masses molaires en raison de l'existence de réactions secondaires pendant la polymérisation. La plus courante est celle dite du « monomère activé » liée à la déprotonation d'une molécule de NCA. L'anion NCA<sup>-</sup> ainsi formé, est un nucléophile assez fort pour réagir avec une autre molécule NCA pour former un adduit dimère (étape d'amorçage). La fonction amine primaire du dimère peut donc attaquer un NCA en C5 selon le mécanisme direct « amine ». Un autre monomère activé peut néanmoins attaquer l'adduit (en C5) et ensuite propager. Enfin, le dimère formé peut réagir avec un autre dimère pour directement former une molécule tétramère, et ainsi de suite (Schéma II-5 toujours dans le cas d'un amorceur de type amine primaire).



**Schéma II-5 : Mécanisme du « monomère activé » au cours de la ROP des NCA.**

Trois solutions ont été proposées pour résoudre le problème de ces réactions secondaires nuisant au bon contrôle de la polymérisation.

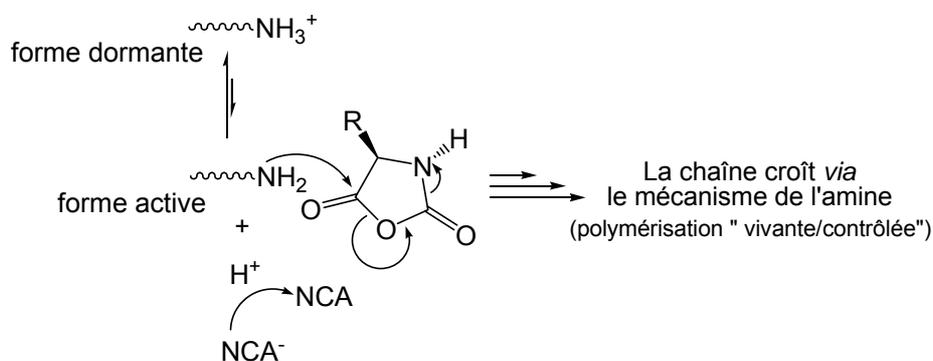
Deming et coll. ont développé une voie organométallique à base de complexes de métaux de transition comme amorceurs permettant la synthèse contrôlée de polypeptides synthétiques par ROP des NCA.<sup>32,33</sup> En particulier, les amorceurs organo-nickel (figure II-5) ont été décrits comme « universels » pour le contrôle de la polymérisation de nombreux NCAs et l'obtention de copolypeptides à blocs très bien définis.<sup>34</sup>



**Figure II-5 : Complexes de métaux de transition à base de Nickel servant d'amorceurs à la polymérisation par ouverture de cycle des NCA.**

Une alternative a été proposée récemment par l'équipe d'Hadjichristidis.<sup>35</sup> Il s'agit là d'utiliser des amorceurs nucléophiles dans des conditions de vide très poussé en purifiant à l'extrême tous les réactifs de la polymérisation (solvant, monomères, amorceurs). Dans ces conditions, Hadjichristidis a montré que les réactions secondaires causées par les impuretés sont considérablement minimisées. Ces conditions drastiques de polymérisation permettent la synthèse d'homo et de copolypeptides à blocs avec des distributions de masses molaires très étroites ( $\text{PDI} < 1.1$ ).

La dernière solution consiste à utiliser la voie « ammonium » qu'a proposée Schlaad *et al.*<sup>36</sup> ainsi que d'autres groupes.<sup>37,38</sup> Il s'agit de mettre une majorité de fonctions amines terminales propageant les chaînes sous forme ammonium « dormante ». Les auteurs ont ainsi synthétisé des copolymères à blocs polystyrène-*b*-poly(Z-L-lysine) de faibles indices de dispersité ( $< 1,03$ ). Pour cela, il suffit de placer le macroamorceur en milieu acide (traitement par HCl) afin de protoner les fonctions amines terminales, les formes acide et basique de l'amine ( $\text{NH}_3^+$  et  $\text{NH}_2$ ) s'échangeant rapidement par transfert de proton (Schéma II-6).



**Schéma II-6 : Mécanisme proposé pour la polymérisation par ouverture de cycle des NCA utilisant une amine primaire protonée par HCl.**

## **B- Synthèse et caractérisation de nouveaux copolymères à blocs à base de polypeptides**

Trois nouveaux copolymères à blocs ont été obtenus en suivant deux des quatre voies de synthèse déjà discutées :

- la technique faisant appel à l'utilisation d'un macroamorceur a été utilisée pour la synthèse du premier système : Jeffamine-*b*-PGA.
- Les deux autres, PMADAME-*b*-PBLG et PBLG-*b*-PTFALys, ont été synthétisés grâce à la voie de couplage de deux homopolymères par « chimie click ».

### ***B-1 Synthèse des copolymères à blocs « hybrides » via l'utilisation d'un macroamorceur : Jeffamine-*b*-PGA***

Dans cette partie, nous décrivons la synthèse de copolymères « hybrides » à double blocs hydrophiles, Jeffamine-*b*-poly(acide glutamique) (Jeffamine-*b*-PGA) selon la voie B. La croissance du bloc peptidique PBLG est ici réalisée à partir d'un macroamorceur commercial fonctionnalisé en bout de chaînes Jeffamine par une fonction amine primaire. La modification chimique des blocs PBLG par hydrolyse basique donne ensuite accès aux copolymères à double blocs hydrophiles Jeffamine-*b*-PGA (Schéma II-7).

La Jeffamine, P(EO<sub>6</sub>-*r*-PO<sub>29</sub>)-NH<sub>2</sub>, est un polymère thermosensible possédant une LCST vers 30°C, c'est à dire que ce copolymère est soluble en milieu aqueux pour des températures inférieures à cette valeur critique et précipite au-delà.

Le bloc PGA, quant à lui, est un polypeptide biocompatible et biodégradable possédant des groupements carboxyliques latéraux lui permettant de changer de conformation secondaire pour passer d'une pelote statistique à pH neutre et basique à une hélice- $\alpha$  pour des pH<5.

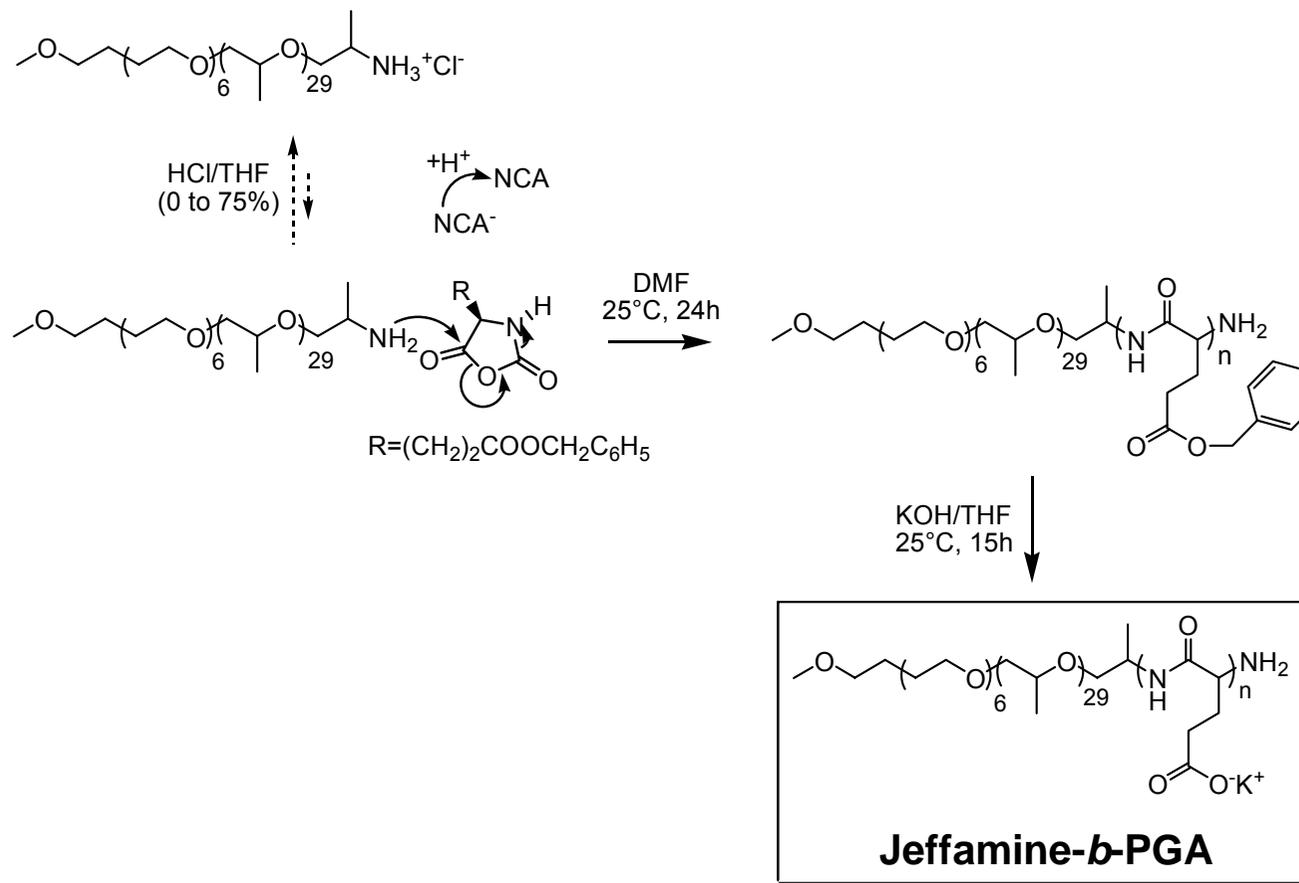


Schéma II-7 : Stratégie de synthèse des copolymères à blocs Jeffamine-*b*-PGA

### B-1-1 Voie « amine »

La Jeffamine a été utilisée comme macroamorceur de la polymérisation du N-Carboxyanhydride de glutamate de benzyle (Glu Bz NCA). La polymérisation a été effectuée à température ambiante en utilisant le diméthylformamide (DMF) plutôt que le tétrahydrofurane (THF) (schéma II-8). En effet, Masuda et al. ont montré que dans ces conditions, contrairement aux réactions réalisés dans le THF, on peut éviter les phénomènes d'agrégation/précipitation.<sup>39</sup>

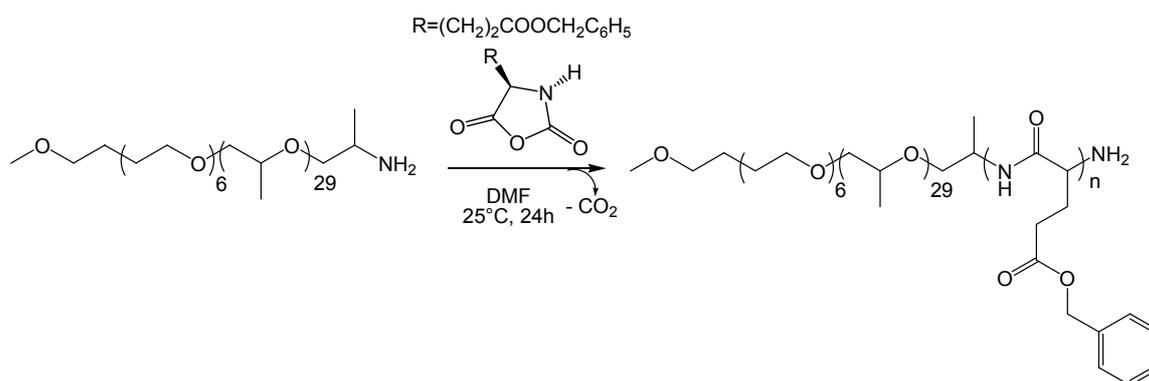


Schéma II-8 : Synthèse de Jeffamine-b-PBLG

La rapidité de la réaction se traduit visuellement par l'apparition d'un dégagement gazeux de CO<sub>2</sub> immédiatement après addition du macroamorceur à la solution du monomère NCA. La longueur du bloc PBLG a pu être variée par le rapport molaire entre les monomères NCA et le macroamorceur Jeffamine-NH<sub>2</sub>.

Deux copolymères à blocs ont ainsi été synthétisés dans le DMF ; les caractéristiques sont regroupées dans le tableau II-1 (N°1 et 2).

Les valeurs expérimentales des masses molaires des copolymères à blocs jeffamine-b-PBLG ont été évaluées par RMN <sup>1</sup>H dans le DMSO-d<sub>6</sub> comme illustré par la figure II-6.

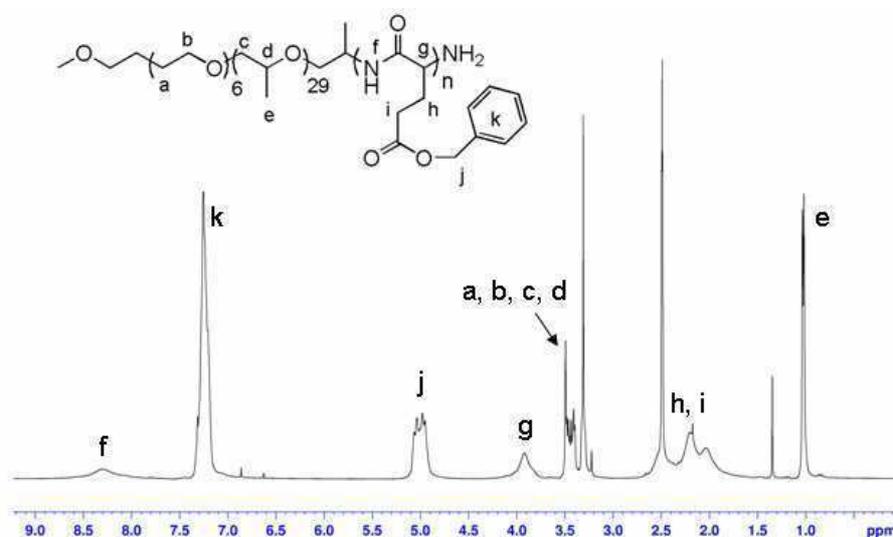


Figure II-6 : Spectre de RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) du copolymère Jeffamine-b-PBLG.

En effet, l'intensité du signal relatif au bloc Jeffamine entre 1 et 1,5 ppm (e, 87H, -CH<sub>3</sub>) peut être comparée à l'intensité des pics dû à la résonance des protons aromatiques du poly(L-glutamate de γ-benzyle) entre 7 et 7,5 ppm (k, 5H, -CH=). Le degré de polymérisation des blocs PBLG peut alors être calculé grâce à l'équation :

$$DP_{n,PBLG} = \frac{3(I_k \times DP_{PPO})}{5I_e}$$

Avec I<sub>e</sub>, I<sub>k</sub> et DP<sub>PPO</sub>, respectivement, l'intensité des protons e (-CH<sub>3</sub>) du macroamorceur Jeffamine, l'intensité des protons benzyliques k du bloc PBLG et le nombre d'unités d'oxyde de propylène dans la Jeffamine.

La très bonne corrélation entre les degrés de polymérisation théoriques et expérimentaux, ainsi que les faibles indices de dispersité indiquent un amorçage quantitatif des fonctions amines primaires du bloc Jeffamine précurseur et, globalement, un bon contrôle de la polymérisation (sans réaction secondaire).

### **B-1-2 Voie « ammonium »**

Comme signalé précédemment, il s'agit de protoner l'amine primaire terminale du macroamorceur par ajout d'acide chlorhydrique. Les groupements terminaux sont ainsi transformés en groupements ammonium jouant le rôle d'espèces dormantes en équilibre avec les amines primaires propageant la polymérisation (schéma II-7).

Le proton libéré au cours de l'échange entre la forme ammonium et amine peut alors réagir rapidement avec l'anion NCA<sup>-</sup> éventuellement formé et susceptible d'induire la polymérisation du monomère activé (réaction secondaire).

N°	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (%)	T (°C)	t (h)	[NCA] /[NH <sub>2</sub> ] <sup>a</sup>	Conversion (%)	DP <sub>PBLG</sub> exp <sup>b</sup>	M <sub>n</sub> <sup>d</sup> (g/mol)	Mw/Mn <sup>c</sup>
1	0	25	24	30	98	32	9000	1.15
2	0	25	24	50	98	48	12500	1.17
3	10	40	72	30	97	33	9200	1.20
4	75	40	72	30	50	13	4850	1.05
5	100	40	72	30	45	12	4630	1.05

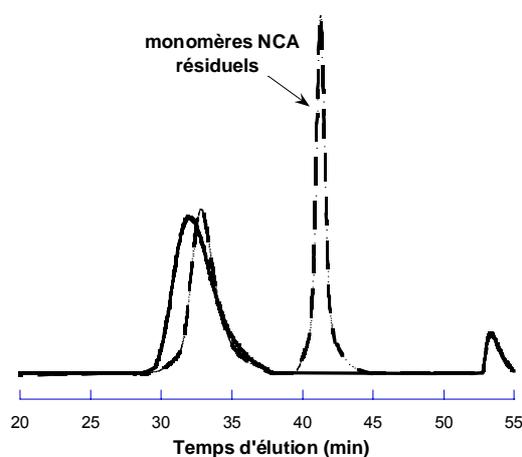
a) Degré de polymérisation théoriques :  $DP_{n,theo} = conv. * [monomère] / [macroamorceur]$ . b) Composition globale déterminée par RMN <sup>1</sup>H dans le DMSO-d<sub>6</sub>. c) Déterminé par CES dans le DMF en présence de LiBr à 60 °C.

**Tableau II-1 : Synthèse de copolymères à blocs Jeffamine-b-PBLG en fonction du taux de quaternisation des groupements amines.**

Dans cette étude, nous n'avons cependant pas mené d'investigations détaillées de la cinétique « mécanisme ammonium ». Nous nous sommes simplement focalisés sur l'influence du taux de quaternisation sur la vitesse de polymérisation par ouverture de cycle des NCA. L'amine primaire terminale de la Jeffamine a été transformée par un traitement acide (HCl) dans le tétrahydrofurane

(THF). En jouant sur le taux de quaternisation du macroamorceur, trois copolymères à blocs Jeffamine-*b*-PBLG ont alors été synthétisés (Tableau II-1 N°3, 4 et 5).

Les études menées par RMN  $^1\text{H}$  nous ont permis de déterminer la composition globale de ces copolymères. La distribution des masses molaires en fonction du taux de quaternisation a été évaluée par CES en utilisant le DMF à 60°C en présence de LiBr (1g/L) comme système d'élution (Tableau II-1). Deming *et al.*<sup>34</sup> ainsi que d'autres équipes<sup>35,15,40</sup> ont en effet montré que cette phase mobile est appropriée à l'analyse CES des polypeptides car elle permet de minimiser leur adsorption sur la phase stationnaire. On peut noter que la protonation du précurseur  $\text{P}(\text{EO}_6\text{-}r\text{-PO}_{29})\text{-NH}_2$  conduit à des copolymères de distribution de masses molaires plus étroite que ceux obtenus par « voie amine » comme on peut le voir sur les chromatogrammes dans la figure II-7.

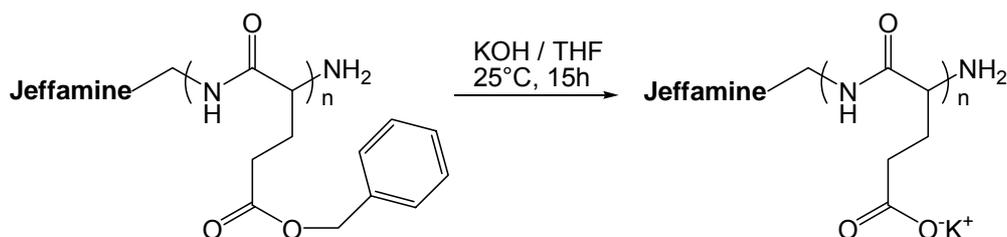


**Figure II-7 : Chromatogrammes CES de copolymères Jeffamine-*b*-PBLG synthétisés par la voie amine (en ligne pleine) et par la voie ammonium (en pointillés) dans le DMF, LiBr à 60°C.**

Cependant, on remarque que la polymérisation est d'autant plus lente que le taux de quaternisation est important quand on utilise la voie ammonium. En effet, après trois jours de polymérisation, seulement 50% du monomère est consommé lorsque le taux de quaternisation du macroamorceur est de 75% (N°4, tableau II-2). Ceci est lié à la vitesse de polymérisation,  $v_p = k_p[\text{NH}_2][\text{NCA}]$  (N°3-5, tableau II-2), où  $[\text{NH}_2]$  est diminuée du fait de sa mise sous forme dormante en  $\text{NH}_3^+$ .

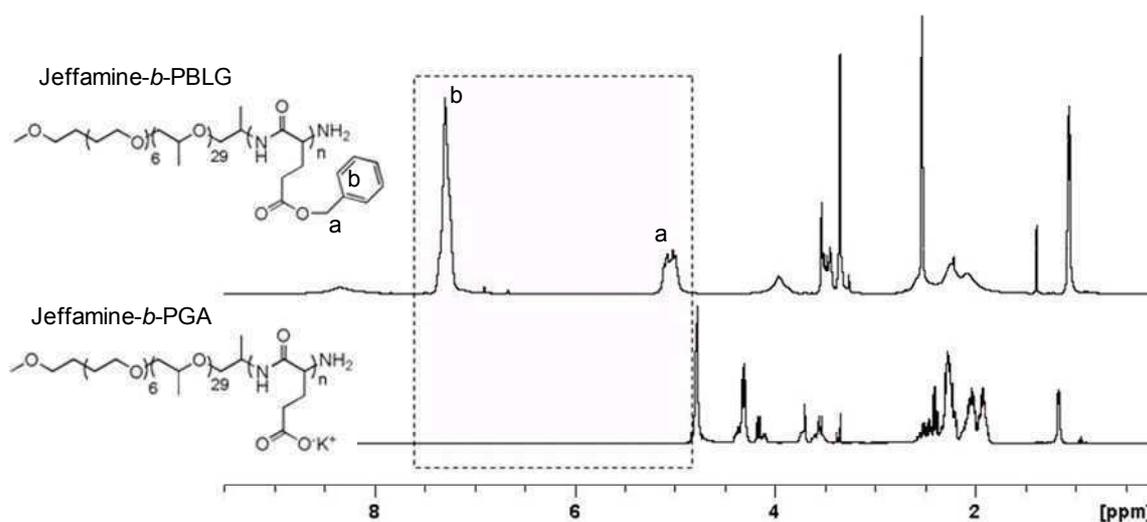
### **B-1-3 Déprotection des blocs PBLG**

Les copolymères à double blocs hydrophiles Jeffamine-*b*-PGA ont finalement été obtenus par hydrolyse basique des blocs PBLG, en milieu KOH, ce qui permet facilement de libérer les fonctions carboxylates du PGA (Schéma II-9).<sup>41</sup>



**Schéma II-9 : Modification chimique du bloc PBLG pour la synthèse de Jeffamine-b-PGA.**

Par exemple, les spectres de RMN  $^1\text{H}$  du composé Jeffamine-*b*-PBLG<sub>30</sub> avant et après hydrolyse sont montrés sur la figure II-8. On peut vérifier qu'après modification, le spectre de RMN  $^1\text{H}$  dans le D<sub>2</sub>O montre la disparition des signaux vers 5 et 7.5 ppm correspondant respectivement aux protons j (CH<sub>2</sub>-Φ) et k (Φ) du bloc PBLG.



**Figure II-8 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des copolymères Jeffamine-*b*-PBLG (DMSO-*d*<sub>6</sub>) et Jeffamine-*b*-PGA (D<sub>2</sub>O) (Bruker 400 MHz)**

Nous avons réalisé la synthèse d'un nouveau copolymère à blocs « hybride » peptidique/non peptidique à double blocs hydrophiles présentant deux blocs stimulables : (i) la Jeffamine thermosensible (LCST~30°) et le PGA sensible au pH (pKa~ 4.1). L'intérêt de synthétiser de tels composés est d'obtenir de par leur auto-organisation en milieu aqueux, des nanoparticules adaptatives dont la morphologie peut être modifiée en fonction des paramètres extérieurs (pH, T, ...). Pour cela, les propriétés d'auto-assemblage en solution aqueuse du copolymère à blocs, Jeffamine-*b*-PGA<sub>30</sub>, ont ensuite été étudiées en détails. Cette partie sera discutée dans le chapitre III de cette thèse.

## **B-2 Copolymères à blocs peptidiques obtenus par « chimie click » : PMADAME-*b*-PBLG et PBLG-*b*-PTFALys**

Deux familles de copolymères à blocs polypeptidiques ont été développés par « chimie click » : des composés à blocs hybrides peptidiques (hydrophile ou hydrophobe)/non peptidique

hydrophile, d'une part et, d'autre part, des copolymères à double blocs polypeptidiques. Dans le premier cas, il s'agit du copolymère poly(méthacrylate de 2-(diméthyle amino) éthyle)-*b*-poly(L-glutamate de  $\gamma$ -benzyle) (PMADAME-*b*-PBLG), l'autre étant le poly(L-glutamate de  $\gamma$ -benzyle)-*b*-poly(trifluoroacetyl-L-lysine) (PBLG-*b*-PTFALys).

L'approche consiste donc à coupler deux homopolymères dotés en bouts de chaînes pour l'un, d'une fonction azoture et pour l'autre, d'une fonction alcyne. A cet effet, nous avons utilisé des amorceurs  $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnels : une fonction  $\omega$ -amino(NH<sub>2</sub>) servant à amorcer la polymérisation des monomères NCA-BLG ou TFA-Lys ou  $\omega$ -Br pour l'amorçage de la polymérisation des monomères MADAME et une fonction  $\alpha$ -azoture ou  $\alpha$ -alcyne permettant le couplage ultérieur des homopolymères par « chimie click ». L'utilisation de ces amorceurs  $\alpha,\omega$  difonctionnels garantit l'introduction de groupements fonctionnels en  $\alpha$  sur toutes les chaînes des homopolymères, en vue d'un couplage optimal.

La stratégie de synthèse se résume donc en trois étapes :

- Synthèse des amorceurs  $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnels
- Synthèse des homopolymères précurseurs fonctionnalisés par des techniques de polymérisation « vivante/contrôlée » : polymérisation par ATRP de la MADAME et par ROP des NCA de BLG et TFALys
- Réaction de couplage par « chimie click »

### B-2-1 Synthèse des amorceurs $\alpha$ - $\omega$ -difonctionnels

Quatre amorceurs  $\alpha$ - $\omega$ -difonctionnels ont été synthétisés, leur structure chimique est montrée ci-dessous (figure II-9).

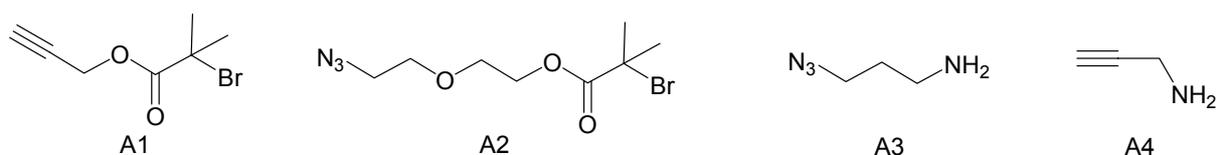
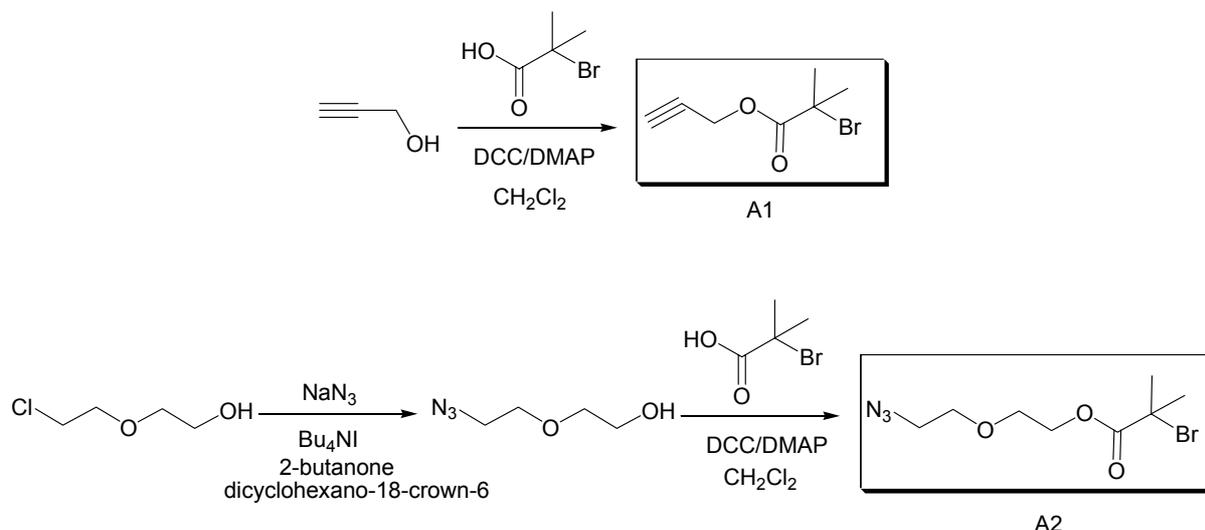


Figure II-9 : Structures chimiques des amorceurs  $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnels utilisés.

Les amorceurs dérivés de bromoesters, A1 et A2, servant à la polymérisation de la MADAME par ATRP ont été synthétisés à partir de produits commerciaux, respectivement l'alcool propargylique et le 2-(2-chloroethoxy) éthanol (schéma II-11). L'amorceur A1, quant à lui, a été préparé suivant un protocole développé par Matyjaszewski *et al.*<sup>42</sup>

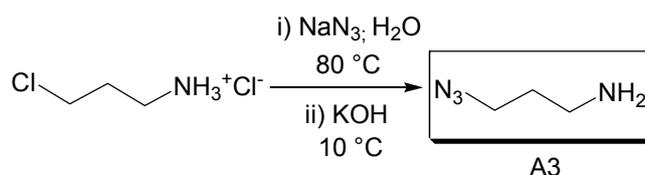
La synthèse de ces amorceurs A1 et A2 requiert deux étapes : l'introduction (i) des fonctions azoture et alcyne pour le couplage par « chimie click » et (ii) du groupement Br capable d'amorcer la polymérisation de la MADAME. Pour cela, on réalise la substitution nucléophile de l'atome de Cl pour introduire le groupement azoture N<sub>3</sub> au sein de l'amorceur A2, alors que la fonction alcyne est déjà présente sur le précurseur de l'amorceur A1. La fonction Br terminale est ensuite introduite par

estérification de la fonction alcool de la molécule précurseur à l'aide de l'acide bromo isobutyrique (schéma II-10).



**Schéma II-10 : Synthèse des amorceurs  $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnalisés A1 et A2 pour la polymérisation par ATRP (DCC : dicyclohexylcarbodiimide ; DMAP : 4-diméthylaminopyridine).**

Les amorceurs A3 et A4 vont permettre la synthèse des polypeptides par ROP de NCA-BLG et NCA-TFALys. Le premier a été obtenu via une procédure décrite dans la littérature (schéma II-11).<sup>43</sup> Pratiquement, on substitue l'atome de Cl pour introduire le groupement  $N_3$ , puis un traitement basique en milieu aqueux permet de déprotoner l'amine terminale en amine primaire. L'amorceur A4, appelé propargylamine est un produit commercial.



**Schéma II-11 : Synthèse de l'amorceur  $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnalisé A3 pour la polymérisation par ROP.**

Les amorceurs A1, A2 et A3 ont été obtenus avec de bons rendements et leur pureté a été vérifiée par RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  (figure I-10).

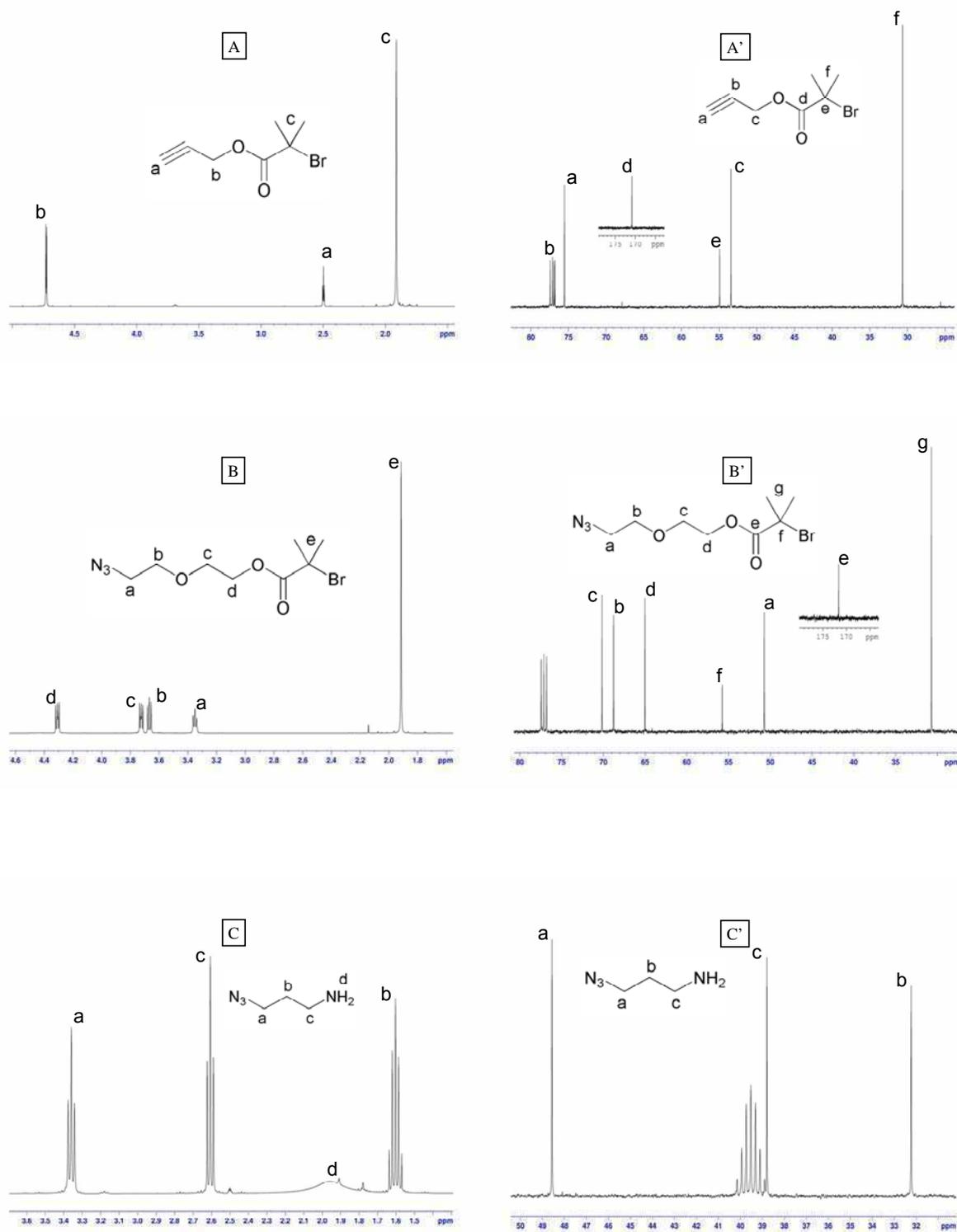


Figure II-10 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (à gauche) et  $^{13}\text{C}$  (à droite) des amorceurs A1 (A, A'), A2 (B, B') et A3 (C, C') dans le  $\text{CDCl}_3$ .

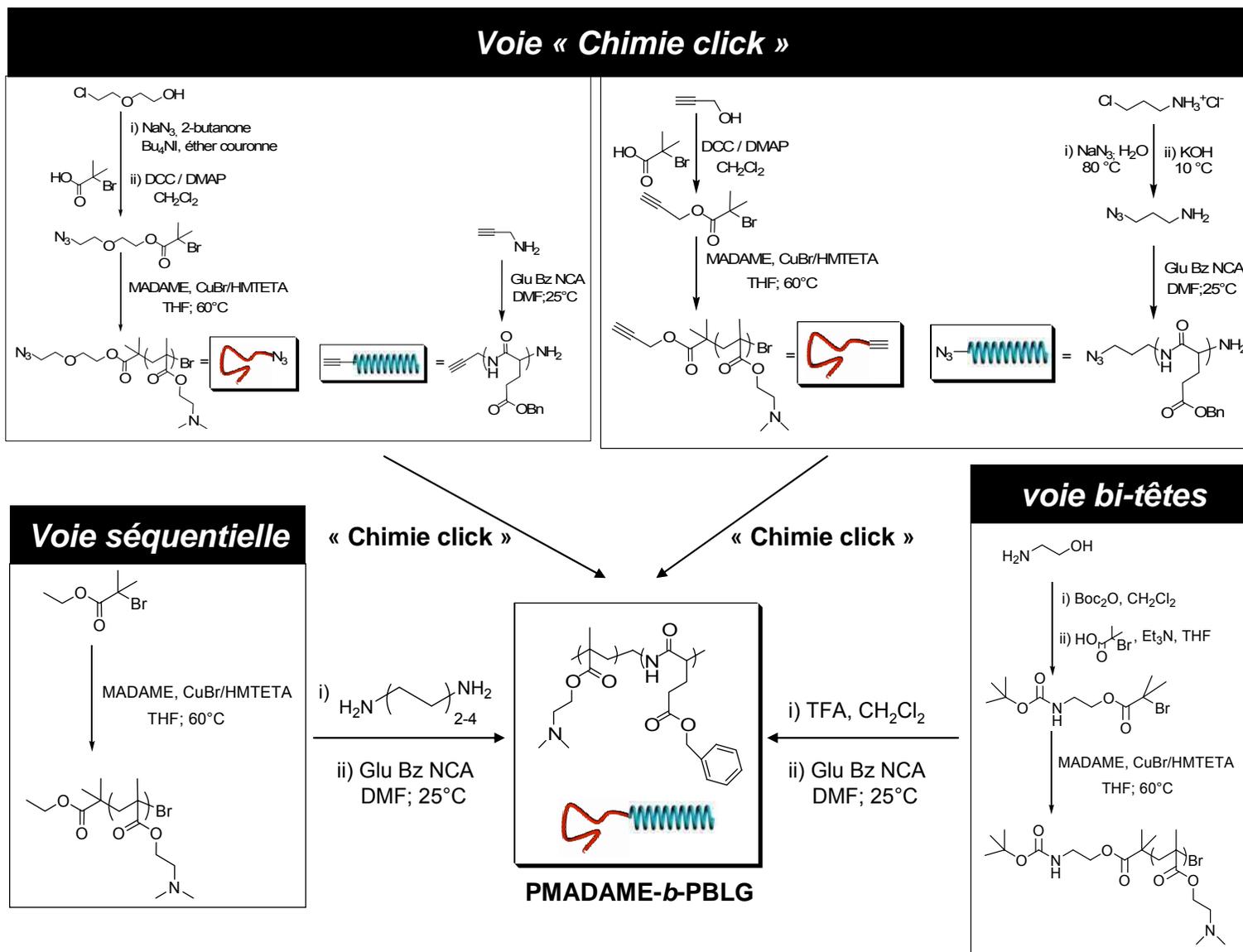


Schéma II-12 : Stratégies de synthèse des copolymères diblocs PMADAME-*b*-PBLG

## B-2-2 Synthèse des copolymères à blocs « hybrides » PMADAME-*b*-PBLG par « chimie click »

La première famille de copolymères à blocs peptidiques générés par « chimie click » est celle des copolymères « hybrides » peptidique/non peptidique : poly(méthacrylate de 2-(diméthyle amino)éthyle)-*b*-poly(L-glutamate de  $\gamma$ -benzyle) (PMADAME-*b*-PBLG). D'autres stratégies de synthèse de tels diblocs étaient a priori envisageables telles que montrées sur le schéma II-12.

Par exemple, nous avons tenté de synthétiser ces polymères à blocs hybrides PMADAME-*b*-PBLG par la voie séquentielle et la voie « bi-têtes » (schéma II-12).

### a) voie séquentielle

Nous avons d'emblée écarté la voie séquentielle impliquant un changement de mécanisme (de ATRP pour la MADAME à ROP du NCA-BLG). En effet, la perte partielle des bromes terminaux pendant et après la polymérisation de la MADAME par ATRP conduit à des chaînes PMADAME non fonctionnalisées et difficile à éliminer. De ce fait, le réamorçage du deuxième bloc PBLG ne serait pas quantitatif. Une autre raison est le fait que l'amine primaire introduit à l'extrémité des blocs PMADAME après l'étape de fonctionnalisation peut réagir avec les fonctions esters latérales de manière intra- ou intermoléculaires (schéma II-13).

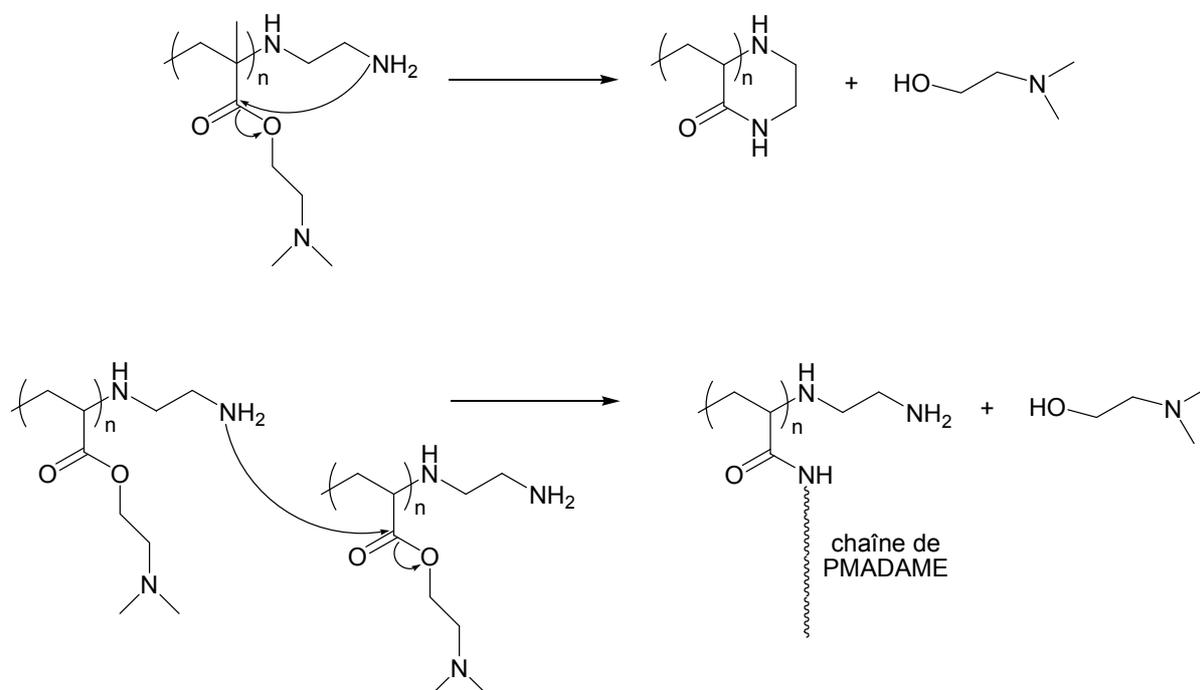
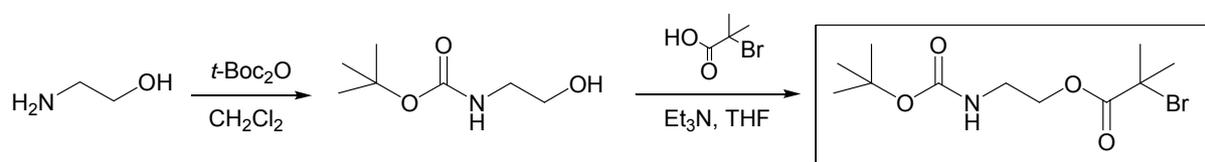


Schéma II-13 : Réactions secondaires intra- (en haut) et intermoléculaires (en bas) induisant la perte de la fonction NH<sub>2</sub> en bouts de chaînes.

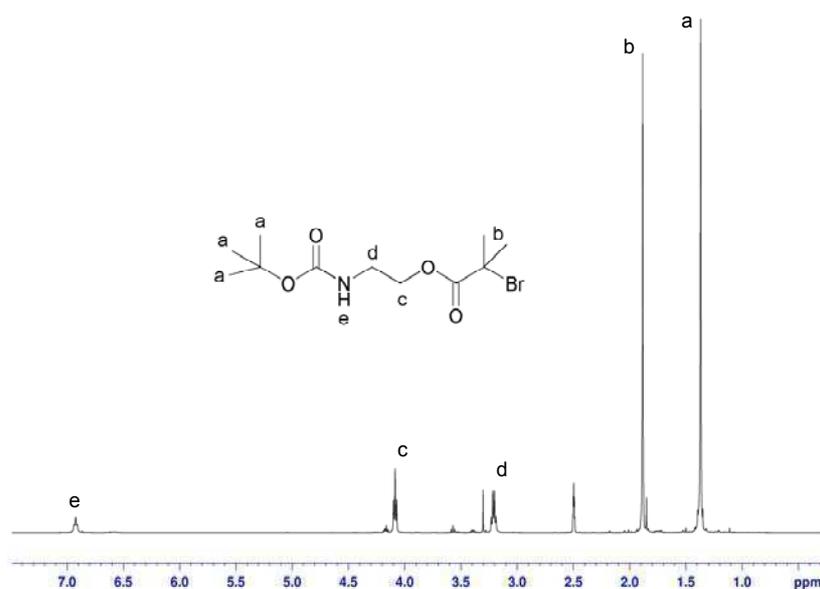
**b) voie « bi-têtes »**

Un amorceur « bi-têtes » comprenant une fonction à chaque extrémité, Br et NH<sub>2</sub>, pour l'amorçage de la polymérisation de la MADAME par ATRP et du NCA-BLG par ROP, respectivement, a été synthétisé. La stratégie de synthèse se résume à deux étapes (schéma II-14). Tout d'abord, l'amine primaire du précurseur est protégée avec du di-*tert*-butyl dicarbonate (*t*-Boc<sub>2</sub>O) puis l'alcool est estérifié de façon à introduire la fonction bromo tertiaire.



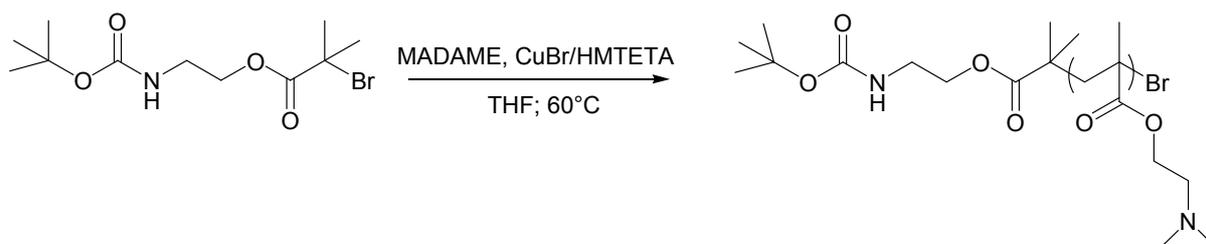
**Schéma II-14 : Synthèse de l'amorceur « bi-têtes » pour l'obtention des copolymères à blocs hybrides PMADAME-*b*-PBLG.**

La pureté de cet amorceur a ensuite été vérifiée par RMN <sup>1</sup>H (figure II-11).



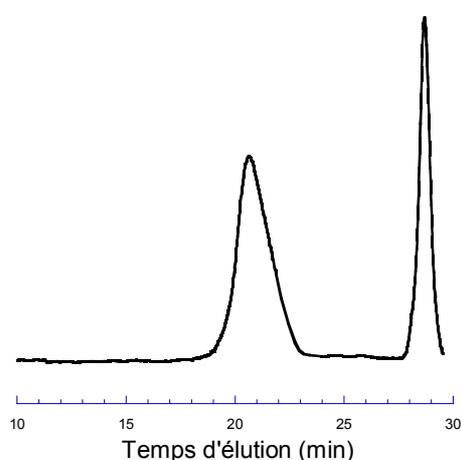
**Figure II-11 : Spectre RMN <sup>1</sup>H de l'amorceur bi-têtes dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>.**

Nous avons ensuite polymérisé par ATRP la MADAME en utilisant le bromure de cuivre complexé par le 1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetétramine (HMTETA) dans le THF à 60°C à partir de l'amorceur « bi-têtes » (schéma II-15). La réaction est stoppée par addition de THF, puis la solution est passée à travers une colonne d'alumine basique pour débarrasser le polymère du catalyseur de cuivre.



**Schéma II-15 : Synthèse du bloc PMADAME par ATRP à partir de l'amorceur « bi-têtes »**

Le polymère ainsi obtenu a ensuite été analysé par CES dans le DMF en présence de LiBr (1g/L) et le chromatogramme obtenu montre une population monomodale ainsi qu'un faible indice de dispersité (PDI=1.19) (figure II-12).



**Figure II-12 : Spectre CES (DMF, 60°C, 1g/L LiBr) des homopolymères PMADAME obtenus à partir de l'amorceur bi-têtes.**

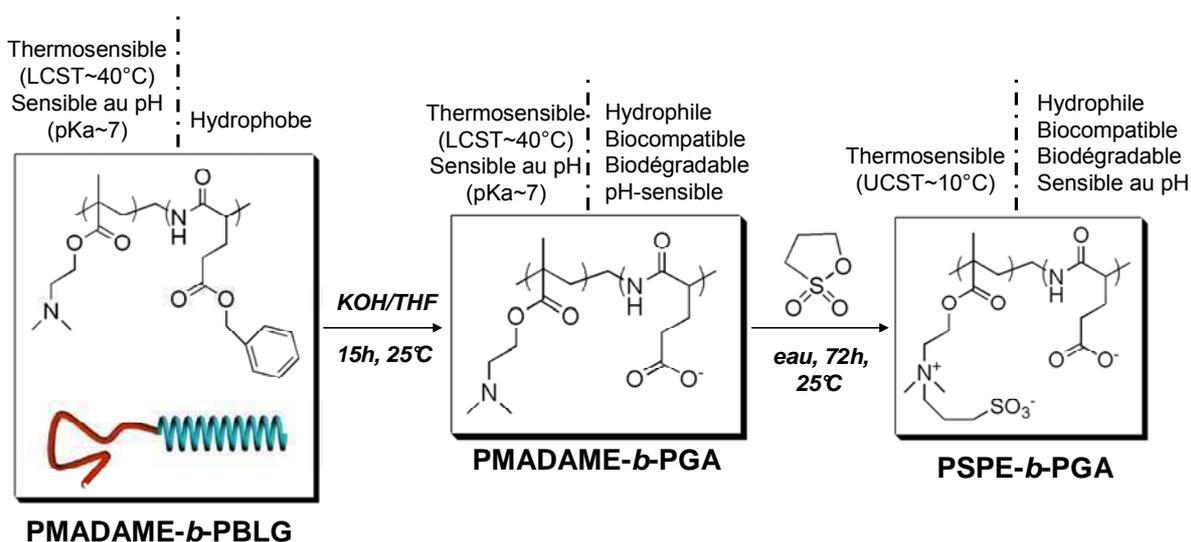
L'étape suivante consiste à déprotéger la fonction  $t\text{-Boc}_2\text{O}$  pour permettre la libération de l'amine primaire pour polymériser par ROP les NCA-BLG. Pour cela, nous avons employé de l'acide trifluoroacétique et nous avons alors obtenu un gel (insoluble) après quelques minutes de réaction que nous n'avons pas pu analyser.

Bien que des analyses complémentaires méritent d'être menées sur cette voie de synthèse afin d'expliquer le comportement de gélification, nous avons fait le choix de mettre de côté cette méthode, et nous nous sommes focalisés sur la technique utilisant la « chimie click » qui, de ce fait, semble la mieux adaptée pour accéder aux diblocs ciblés.

Pour cela, quatre homopolymères  $\alpha\text{-}\omega$ -fonctionnalisés ont été synthétisés à l'aide des amorceurs A1, A2, A3 et A4, puis couplés par « chimie click ». Nous allons montrer que le couplage est quantitatif quelque soit le sens de couplage utilisé : PMADAME-alcyne avec PBLG-azoture ou PMADAME-azoture avec PBLG-alcyne (schéma II-19).

Le copolymère à blocs « hybrides » amphiphiles PMADAME-*b*-PBLG présente un bloc peptidique hydrophobe biocompatible, PBLG, et un bloc hydrophile stimuable par effet de pH et de température, PMADAME. Le chapitre III décrit en détails les propriétés d'auto-assemblage en milieu aqueux de ce composé.

Notre choix s'est porté sur ces copolymère à blocs car il peuvent être modifiés chimiquement pour obtenir des familles dérivées, copolymères à double blocs hydrophiles et multistimulables : poly(méthacrylate de 2-(diméthyle amino) éthyle)-*b*-poly(acide glutamique) (PMADAME-*b*-PGA) et poly(méthacrylate de 2-(diméthyle amino) éthyle)propane sultone-*b*-poly(acide glutamique) (PSPE-*b*-PGA) dont les propriétés de chacun des blocs est décrite dans la figure II-13. En effet, les blocs PBLG et PMADAME sont les précurseurs des blocs PGA, après hydrolyse basique, et PSPE, après quaternisation par la 1,3-propane sultone, respectivement. Les comportements en milieu aqueux seront également étudiés dans le chapitre suivant.



**Figure II-13 : Modification chimique du copolymère diblocs PMADAME-*b*-PBLG menant à l'obtention de deux nouveaux systèmes : i) PMADAME-*b*-PGA, ii) PSPE-*b*-PGA**

### **B-2-2-1 Synthèse des homopolymères $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnalisés PMADAME et PBLG**

La polymérisation par ouverture de cycle du N-carboxyanhydride de glutamate de benzyle a été réalisée dans le DMF à 25°C à partir des amorceurs A3 ou A4 (schéma II-16).

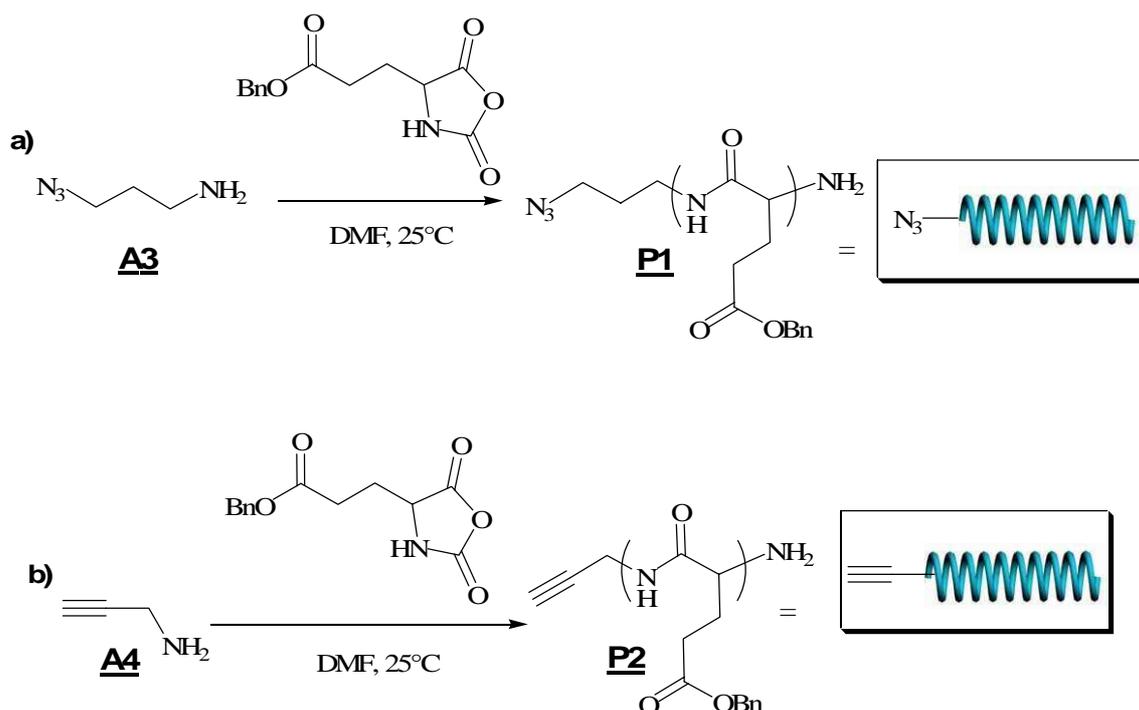


Schéma II-16 : Synthèse des précurseurs  $\alpha$ -fonctionnalisés PBLG : a) azoture, b) alcyne

Les deux polymères (**P1** et **P2**) ont été récupérés par précipitation dans le diéthyléther après 40 h de polymérisation avec des rendements élevés (>90%). Les composés ont alors été caractérisés par RMN  $^1\text{H}$  dans du  $\text{CDCl}_3$  contenant 15% d'acide trifluoroacétique (TFA). Le rôle de cet acide est de rompre la conformation en hélice des chaînes polypeptidiques afin qu'elles adoptent une conformation de pelote statistique.<sup>44</sup>

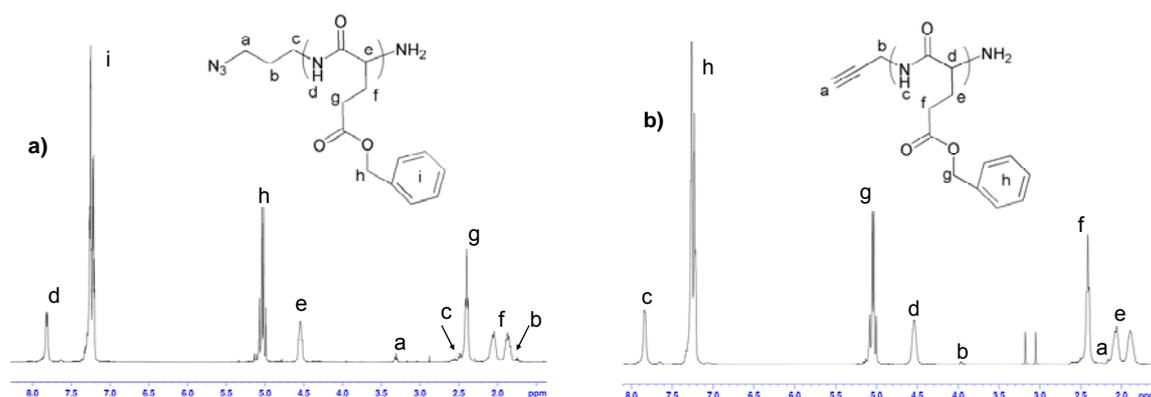


Figure II-14 : Spectres de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3 + 15\% \text{TFA}$ , 400 MHz) des homopolymères : (a)  $\alpha$ -azoture-PBLG **P1** ; (b)  $\alpha$ -alcyne-PBLG **P2**.

Comme illustré dans la figure II-14, tous les pics caractéristiques sont observés et peuvent être attribués. En particulier, le signal dû à la résonance des protons caractéristiques des amorceurs A3 et A4 (respectivement à 3.3 ppm et 4 ppm) permet de déterminer avec précision les masses molaires des deux polymères. Par exemple, les protons méthylènes en  $\alpha$  de la fonction azoture (-

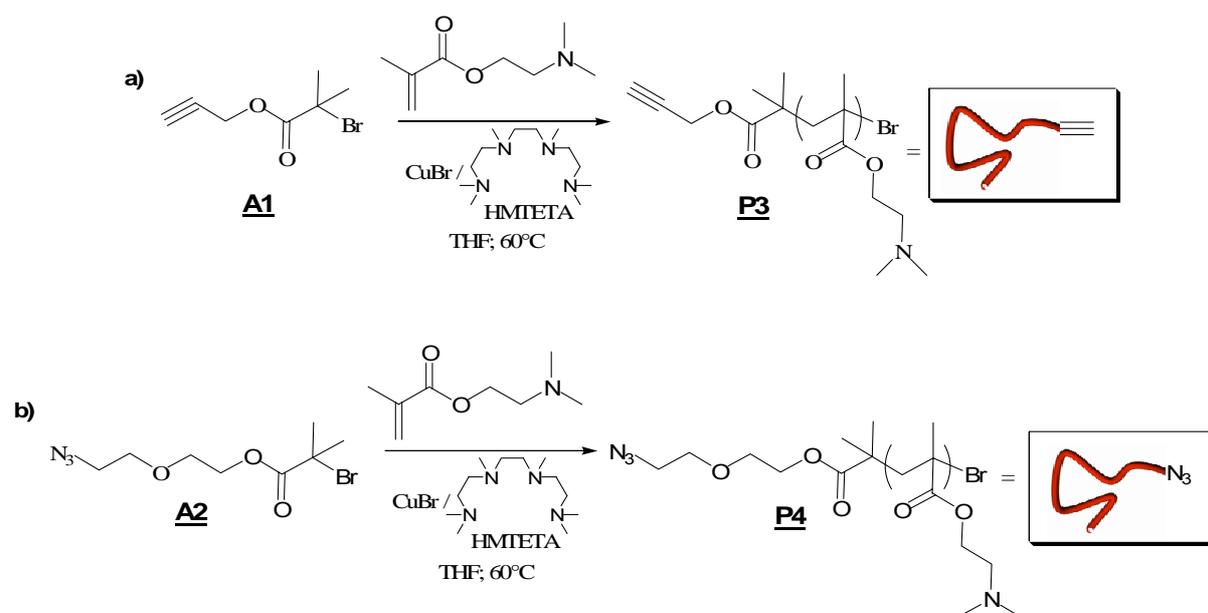
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ) sont observés à 3.3 ppm. L'intégration relative de ce pic comparée aux protons caractéristiques de la chaîne principale du PBLG, c'est à dire les protons méthylènes à 5 ppm, fournit la masse molaire de ce polymère **P1**, par le calcul suivant :

$$M_{n,PBLG} = \frac{I_h \times M_{BLG}}{I_a} + M_{\text{amorceur}}$$

Avec  $I_a$ ,  $I_h$ ,  $M_{BLG}$  et  $M_{\text{amorceur}}$ , respectivement, l'intensité des protons méthylènes a (amorceur **A3**) des bouts de chaînes, l'intensité des protons méthylènes h ( $\alpha$ -alcyne-PBLG) de la chaîne principale de PBLG, la masse molaire de l'unité monomère BLG et la masse molaire de l'amorceur **A3**.

La masse molaire du polymère **P2** est estimée en tenant compte de l'intensité relative du pic à 3.95 ppm correspondant aux protons méthylène en  $\alpha$  de la fonction acétylène ( $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$ ) avec le pic caractéristique à 5 ppm des protons méthylènes du groupement benzyliques du PBLG.

Concernant la polymérisation de la MADAME par ATRP, quelques études ont déjà décrit les conditions à utiliser avec d'autres amorceurs que A1 ou A2.<sup>45,46,47,48,49,50</sup> La réaction peut être réalisée dans des conditions permettant un bon contrôle dans des solvants organiques tels que le THF, le dichlorobenzène ou bien en solution aqueuse à température ambiante. La polymérisation de la MADAME par ARTP a donc été réalisée dans des conditions douces, en utilisant le bromure de cuivre complexé par le 1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetétramine (HMTETA) dans le THF à 60°C à partir des amorceurs A1 et A2 (schéma II-17). La réaction est stoppée par addition de THF, puis la solution est passée à travers une colonne d'alumine basique pour débarrasser le polymère du catalyseur de cuivre.



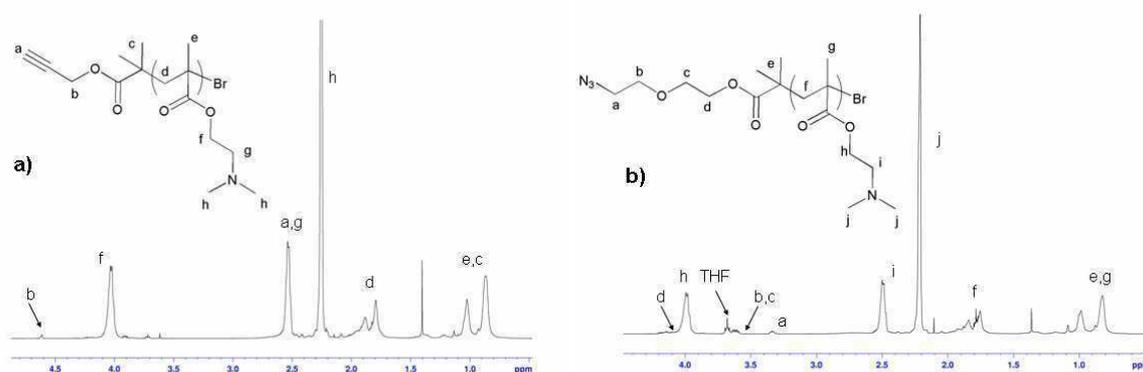
**Schéma II-17 : Synthèse des précurseurs  $\alpha$ -fonctionnalisés PMADAME : a) alcyne, b) azoture**

De telles conditions ont permis d'obtenir des homopolymères PMADAME de masses molaires prédéfinies par le rapport MADAME/amorceur A3 ou A4, avec des dispersités <1.2. De manière intéressante, l'hydrogène porté par la fonction alcyne n'a pas besoin d'être protégé par un groupement triméthylsilyl, comme parfois rapporté dans la littérature.<sup>14</sup>

Les analyses par RMN <sup>1</sup>H (Figure II-15) ont permis de déterminer les masses molaires grâce au rapport des intensités des protons correspondant aux bouts de chaînes par rapport à ceux correspondant à la chaîne principale. Par exemple, la masse molaire de l' $\alpha$ -alcyne-PMADAME a été déterminée à partir de l'équation suivante :

$$M_{n,PMADAME} = \frac{I_f \times M_{MADAME}}{I_b} + M_{amorceur}$$

Avec  $I_b$ ,  $I_f$ ,  $M_{MADAME}$  et  $M_{amorceur}$ , respectivement, l'intensité des protons méthylènes a (amorceur **A1**) des bouts de chaînes, l'intensité des protons méthylènes f ( $\alpha$ -alcyne-PMADAME) de la chaîne principale de PMADAME, la masse molaire de l'unité monomère MADAME et la masse molaire de l'amorceur A1.



**Figure II-15 : Spectres de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) des homopolymères : (a)  $\alpha$ -alcyne-PMADAME **P3** ;(b)  $\alpha$ -azoture-PMADAME **P4**.**

Les quatre homopolymères précurseurs **P1**, **P2**, **P3** et **P4** ont ensuite été analysés par CES dans le DMF à 60°C en présence de LiBr (1g/L). Les chromatogrammes obtenus montrent dans chaque cas, une seule population monomodale ainsi qu'un faible indice de dispersité (Figure II-16 et tableau II-2).

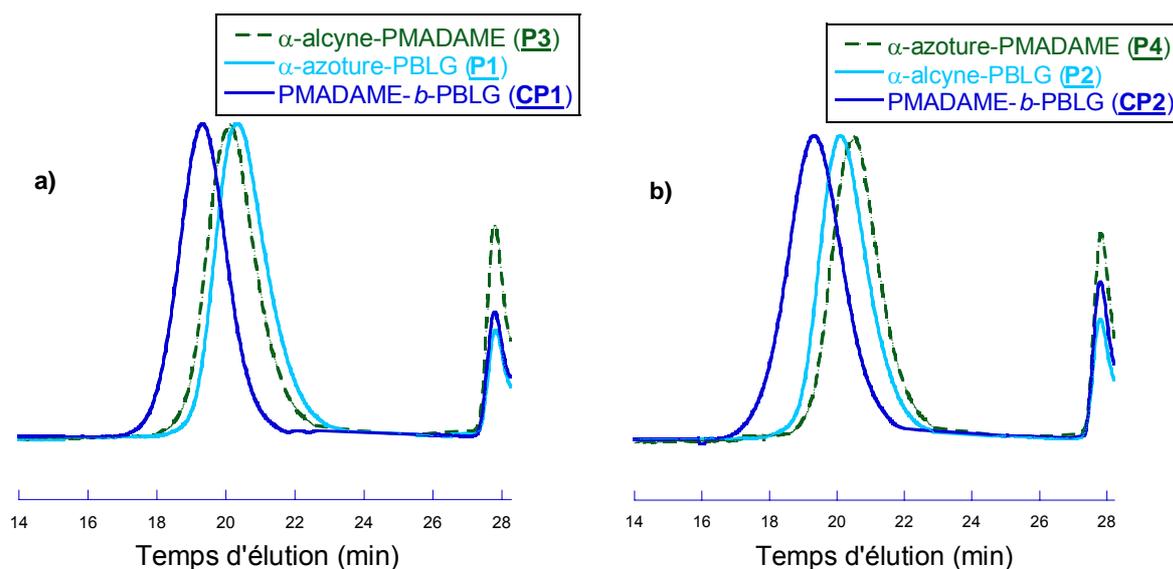


Figure II-16 : Spectres CES (DMF, 60°C, 1g/L LiBr) des copolymères diblocs PMADAME-*b*-PBLG **CP1** (a) et **CP2** (b) ainsi que des homopolymères précurseurs : a)  $\alpha$ -alkyne-PMADAME **P3** et  $\alpha$ -azoture-PBLG **P1**; b)  $\alpha$ -alkyne-PBLG **P2** et  $\alpha$ -azoture-PMADAME **P4**

### B-2-2-2 Réaction de couplage par « chimie click »

Les réactions de couplage ont été réalisées par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre, d'une part, l' $\alpha$ -alkyne-PMADAME **P3** et l' $\alpha$ -azoture-PBLG **P1**, et d'autre part, entre l' $\alpha$ -azoture-PMADAME **P4** et l' $\alpha$ -alkyne-PBLG **P2** dans le DMF à 25°C, en utilisant le bromure de cuivre (CuBr) complexé par la pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA) (Schéma II-18).

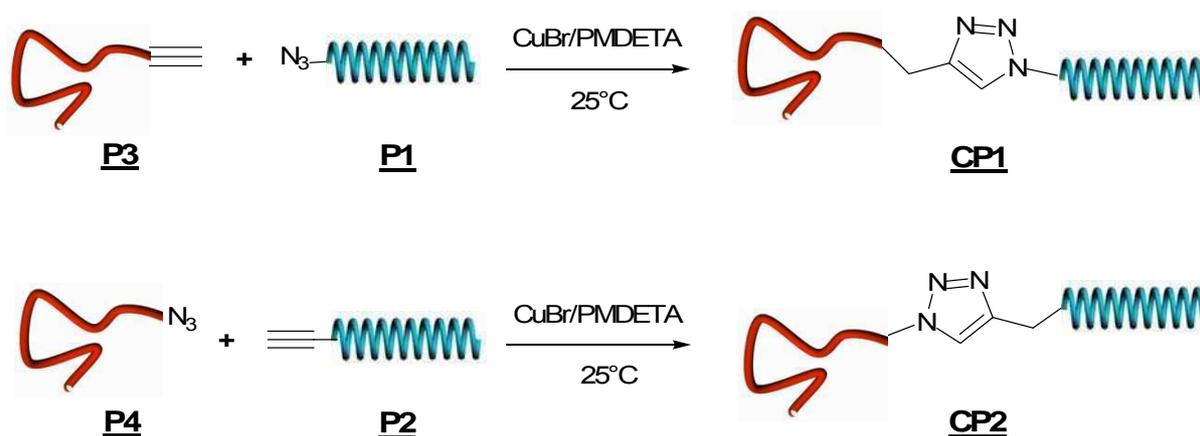


Schéma II-18 : Couplage par « chimie click » pour la synthèse des copolymères PMADAME-*b*-PBLG

Après 24 h de réaction, on obtient les copolymères diblocs PMADAME-*b*-PBLG **CP1** et **CP2** dont les caractéristiques sont résumés dans le tableau II-2. Contrairement à ce qui est parfois décrit dans la littérature,<sup>11</sup> il est difficile de travailler dans des conditions stœchiométriques du fait de la fluctuation en taille (même minime) des chaînes de polymères. Ainsi, un léger excès de PMADAME a été utilisé (1.2 équivalents) dans le but de rendre la réaction quantitative. Le composé a pu être purifié

de cet excès de PMADAME par simple précipitation sélective dans le diéthyléther. En effet, la PMADAME étant soluble dans ce solvant, il est possible de l'extraire après filtration du copolymère qui lui précipite en raison de l'insolubilité du bloc PBLG dans ce solvant.

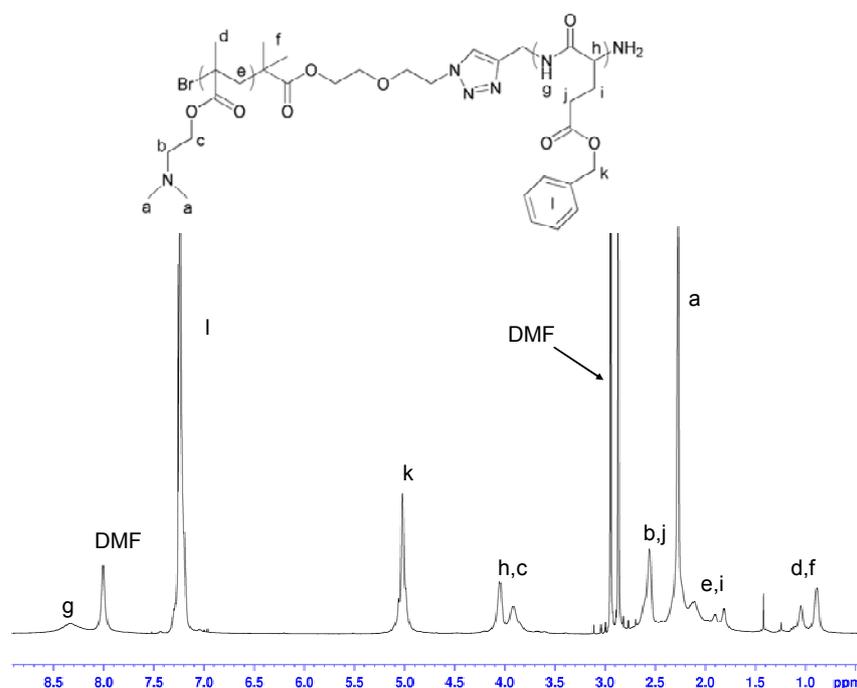
Homopolymères $\alpha$ -alcyne				Homopolymères $\alpha$ -azoture				PMADAME- <i>b</i> -PBLG		
N°	DP <sub>n</sub> RMN <sup>a)</sup>	M <sub>n</sub> SEC <sup>b)</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )	PDI <sup>b)</sup>	N°	DP <sub>n</sub> RMN <sup>a)</sup>	M <sub>n</sub> SEC <sup>b)</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )	PDI <sup>b)</sup>	N°	M <sub>n</sub> SEC <sup>b)</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )	PDI <sup>b)</sup>
P3	35	11 100	1.17	P1	40	10 400	1.17	CP1	21 100	1.15
P2	47	12 600	1.17	P4	27	8 800	1.12	CP2	20 800	1.18

a) Degrés de polymérisation expérimentaux obtenus à partir de l'intégration relative des protons caractéristiques des bouts de chaînes par rapport à ceux de la chaîne principale. b) Déterminés par CES dans le DMF à 60 °C en présence de LiBr.

**Tableau II-2 : Caractéristiques moléculaires des homopolymères fonctionnalisés PMADAME et PBLG et des copolymères diblocs PMADAME-*b*-PBLG correspondants obtenus par « chimie click ».**

Les deux chromatogrammes obtenus par CES montrent un déplacement vers les fortes masses molaires après couplage, comparés avec ceux des homopolymères précurseurs (Figure II-16). On observe la présence d'une seule population avec une répartition symétrique et monomodale, ce qui témoigne de l'efficacité de cette technique de couplage.

La structure des deux copolymères a été confirmée par RMN <sup>1</sup>H : la figure II-17 montre un spectre de RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub> du copolymère PMADAME-*b*-PBLG (**CP1**) purifié dont on peut observer tous les pics caractéristiques.



**Figure II-17 : Spectre de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) du copolymère à blocs PMADAME-*b*-PBLG **CP1****

L'efficacité de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen a enfin été vérifiée par FTIR avant et après couplage. On remarque la totale disparition de la bande azoture à  $2100\text{ cm}^{-1}$  après la réaction de couplage.

En vue des études en solution aqueuse (chapitre III), quatre copolymères diblocs PMADAME-*b*-PBLG ont été synthétisés en suivant ce protocole c'est-à-dire obtenus par couplage entre deux homopolymères précurseurs  $\alpha$ -fonctionnalisés : l' $\alpha$ -alcyne-PMADAME et l' $\alpha$ -azoture-PBLG ; leurs caractéristiques sont regroupées dans le tableau II-3.

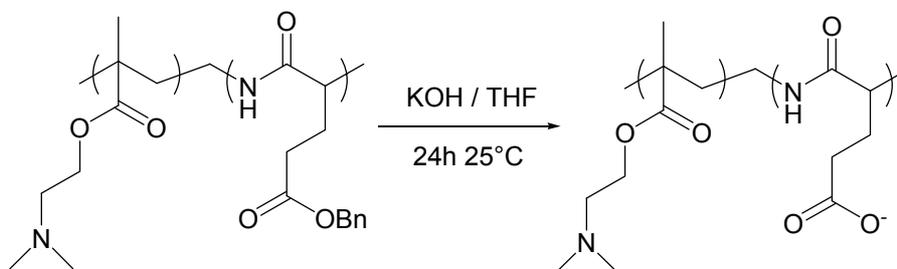
composition <sup>a</sup> PMADAME <sub>x</sub> - <i>b</i> - PBLG <sub>y</sub>	Mn PMADAME <sub>b</sub>	Mn PBLG <sub>c</sub>	Mn Diblocs <sub>b</sub>	PDI <sup>d</sup>	$\Phi_{\text{PBLG}}$ (% mas.)
85-37	13300	8100	21400	1.23	38
85-41	13300	9000	22300	1.17	40
85-77	13300	16900	30200	1.20	56
85-186	13300	40700	54000	1.25	75

a) *x* et *y* représentent les degrés de polymérisation des blocs PMADAME et PBLG, respectivement. b) Déterminés par RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub>. c) Déterminés par RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub>+15%TFA. d) Déterminés par CES dans le DMF en présence de LiBr (1g/L) à 60°C.

**Tableau II-3 : Caractéristiques des copolymères PMADAME-*b*-PBLG.**

### B-2-2-3 Synthèse des copolymères à double blocs hydrophiles stimulables : PMADAME-*b*-PGA

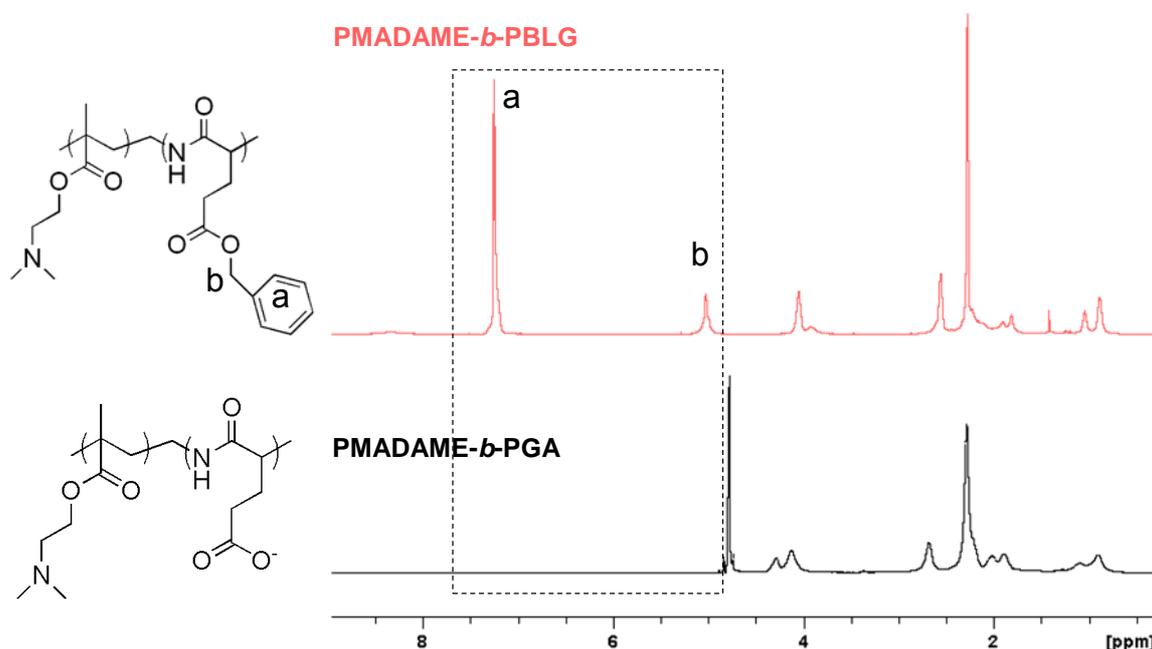
Ces polyampholytes, c'est-à-dire possédant un bloc chargé positivement et l'autre négativement, poly (méthacrylate de 2-(diméthyle amino) éthyle)-*b*-poly(acide glutamique) (PMADAME-*b*-PGA), ont été synthétisés par simple déprotection des groupements benzyliques des blocs PBLG. Le protocole a déjà été décrit dans une partie précédente (B-1-3). Cette étape a été réalisée dans des conditions basiques comme le montre le schéma II-19 :



**Schéma II-19 : Synthèse des copolymères à blocs PMADAME-*b*-PGA par déprotection des blocs PBLG.**

L'analyse par RMN <sup>1</sup>H dans le D<sub>2</sub>O nous a permis de mettre en évidence la totale disparition des pics correspondant aux protons des groupements benzyliques à 5 et 7.5 ppm (figure II-18). Cette

réaction est donc sélective, car elle n'affecte pas les fonctions esters du bloc PMADAME, et quantitative.



**Figure II-18 : Spectres de RMN <sup>1</sup>H des copolymères PMADAME-*b*-PBLG (DMSO-*d*<sub>6</sub>) et PMADAME-*b*-PGA (D<sub>2</sub>O) (Bruker 400 MHz).**

Nous avons ainsi déprotégé les trois copolymères à blocs PMADAME-*b*-PBLG précédemment synthétisés (tableau II-4).

composition <sup>a</sup>	Mn	Mn	Mn	PDI <sup>c</sup>	Φ PGA
PMADAME <sub>x</sub> - <i>b</i> -PGA <sub>y</sub>	PMADAME	PGA <sup>b</sup>	Diblocs		(% mas.)
85-37	13300	4800	18100	1.23	26
85-77	13300	9900	23200	1.20	43
85-186	13300	24000	37300	1.25	64

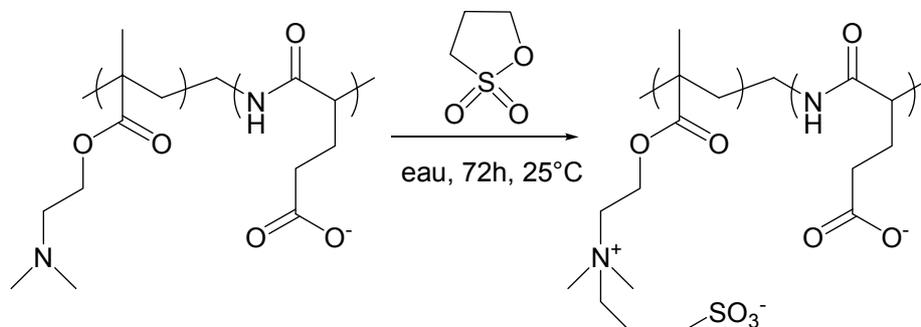
a) *x* et *y* représentent les degrés de polymérisation des blocs PMADAME et PGA, respectivement. b) Déterminés par RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub>+15%TFA avant déprotection. c) Déterminés par CES dans le DMF en présence de LiBr (1g/L) à 60°C avant déprotection.

**Tableau II-4 : Caractéristiques des copolymères PMADAME-*b*-PGA.**

### **B-2-2-4 Synthèse des copolymères à double blocs hydrophiles stimulables : PSPE-*b*-PGA**

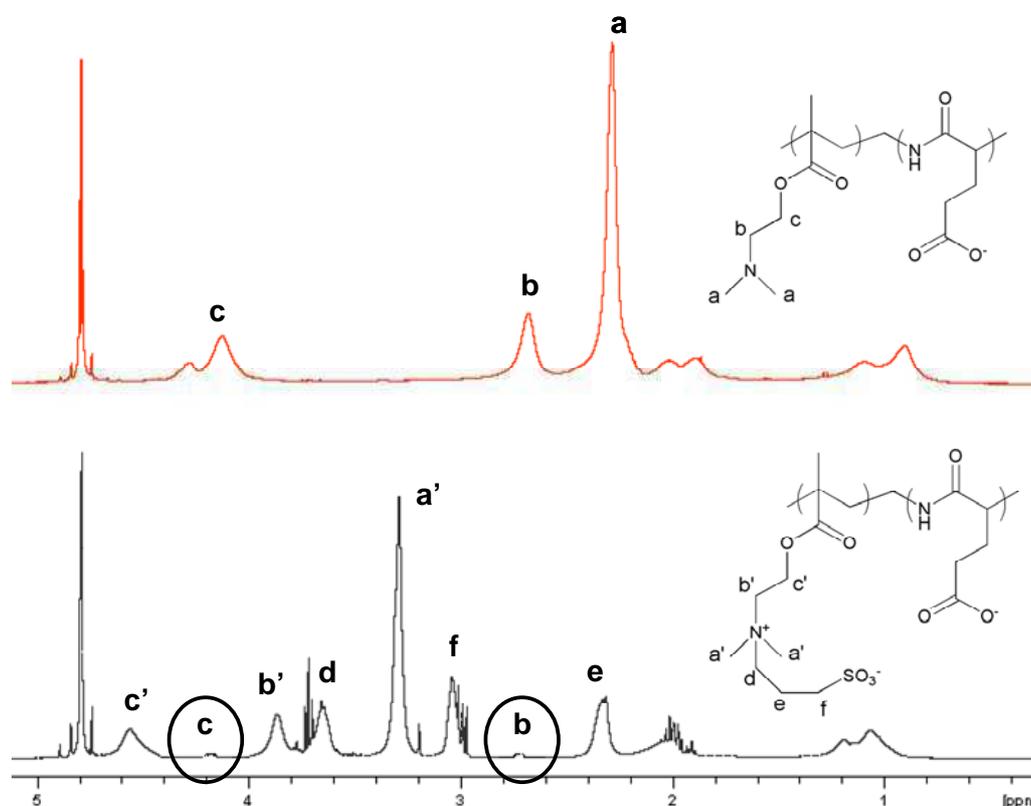
Ces copolymères, poly (méthacrylate de 2-(diméthyle amino) éthyle)propane sultone-*b*-poly(acide glutamique) (PSPE-*b*-PGA) sont issus de la quaternisation des copolymères PMADAME-*b*-

PGA par la 1,3-propane sultone. Cette réaction a été réalisée pour la première fois dans l'eau par Bütün.<sup>51</sup> Les deux blocs PMADAME et PGA étant hydrophiles, nous avons nous aussi utilisé l'eau comme solvant de réaction. La fonction amine tertiaire du bloc PMADAME étant très réactive vis-à-vis de la quaternisation, la réaction a été effectuée à température ambiante (schéma II-20).



**Schéma II-20 : Modification chimique du bloc PMADAME pour mener au PSPE.**

Afin d'étudier ce système en solution aqueuse, nous avons quaternisé le copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>37</sub>. L'analyse par RMN <sup>1</sup>H a permis de quantifier cette réaction. Même si cette dernière est quantitative sur les homopolymères PMADAME,<sup>51</sup> cela ne semble pas être le cas pour notre système. En effet, il nous est impossible de quaterniser ces blocs au-delà de 90% (Figure II-19).



**Figure II-19 : Spectres de RMN <sup>1</sup>H dans le D<sub>2</sub>O des copolymères PMADAME-b-PGA (en haut) et PSPE-b-PGA (en bas) (Bruker 400 MHz).**

En effet, on constate la présence de protons correspondants au précurseur PMADAME à 4.1 et 2.7 ppm après l'étape de quaternisation (figure II-19). Les deux blocs étant chargés, on peut supposer que la présence des interactions électrostatiques entre les deux blocs rend difficile l'obtention d'une quaternisation quantitative.

L'utilisation d'amorceur  $\alpha$ - $\omega$ -difonctionnels a permis de synthétiser des homopolymères PMADAME et PBLG fonctionnalisés de manière quantitative grâce à des méthodes de polymérisation « vivante/contrôlée », l'ATRP et la ROP respectivement. La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre ces homopolymères fonctionnalisés a révélé un couplage quantitatif en présence d'un léger excès de PMADAME (1.2 eq), permettant l'obtention des copolymères PMADAME-*b*-PBLG facilement purifiables par simple précipitation sélective dans le diéthyléther.

Cette nouvelle méthodologie de synthèse est donc adaptée pour développer de manière efficace de nouveaux copolymères diblocs « hybrides » purs et bien définis que nous n'avons pas pu obtenir par une autre méthodologie de synthèse.

De plus, ce copolymère à blocs est le précurseur de deux nouvelles familles de copolymères multistimulables à double blocs hydrophiles : le PMADAME-*b*-PGA et le PSPE-*b*-PGA dont les propriétés en solution aqueuse seront étudiés dans le chapitre III.

Afin de rendre compte de la simplicité de cette méthodologie, nous l'avons appliquée à la synthèse de copolymères à double blocs peptidiques : le PBLG-*b*-PTFALys.

### ***B-2-3 Synthèse des copolypeptides à blocs par « chimie click » PBLG-*b*-PTFALys***

Comme l'ont déjà montré Deming,<sup>34</sup> Hadjichristidis<sup>35</sup> et Lecommandoux,<sup>52</sup> de manière générale, les copolymères à blocs « tout peptidiques » (copolypeptides à blocs) peuvent être synthétisés par polymérisation séquentielle par ouverture de cycle de deux NCA. On peut employer à cet effet des amorceurs aminés, préférentiellement sous vide poussé<sup>35</sup> de façon à minimiser les réactions secondaires, ou bien des catalyseurs à base de métaux de transition, typiquement à base de [Ni(COD)] développé par l'équipe de Deming.<sup>34</sup>

Dans ce travail de thèse, nous proposons d'accéder à de tels copolymères à doubles blocs peptidiques par la méthode de couplage décrite précédemment, grâce à la « chimie click ». En l'occurrence, nous montrerons ici comment réaliser le couplage de deux polypeptides, PBLG et PTFALys, synthétisés préalablement par ouverture de cycle des NCA correspondants

Dans ce but, quatre homopolymères  $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnalisés ont été synthétisés à l'aide des amorceurs A3 et A4, puis les homopolymères portant les fonctions antagonistes (azoture et alcyne) ont été couplés par « chimie click ».

### B-2-3-1 Synthèse des homopolymères $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnalisés PBLG et PTFALys

Les polymérisations par ouverture de cycle du NCA-BLG et du NCA-PTFALys ont été réalisées dans du DMF à 25°C en présence des amorceurs A3 ou A4 (schéma II-21).

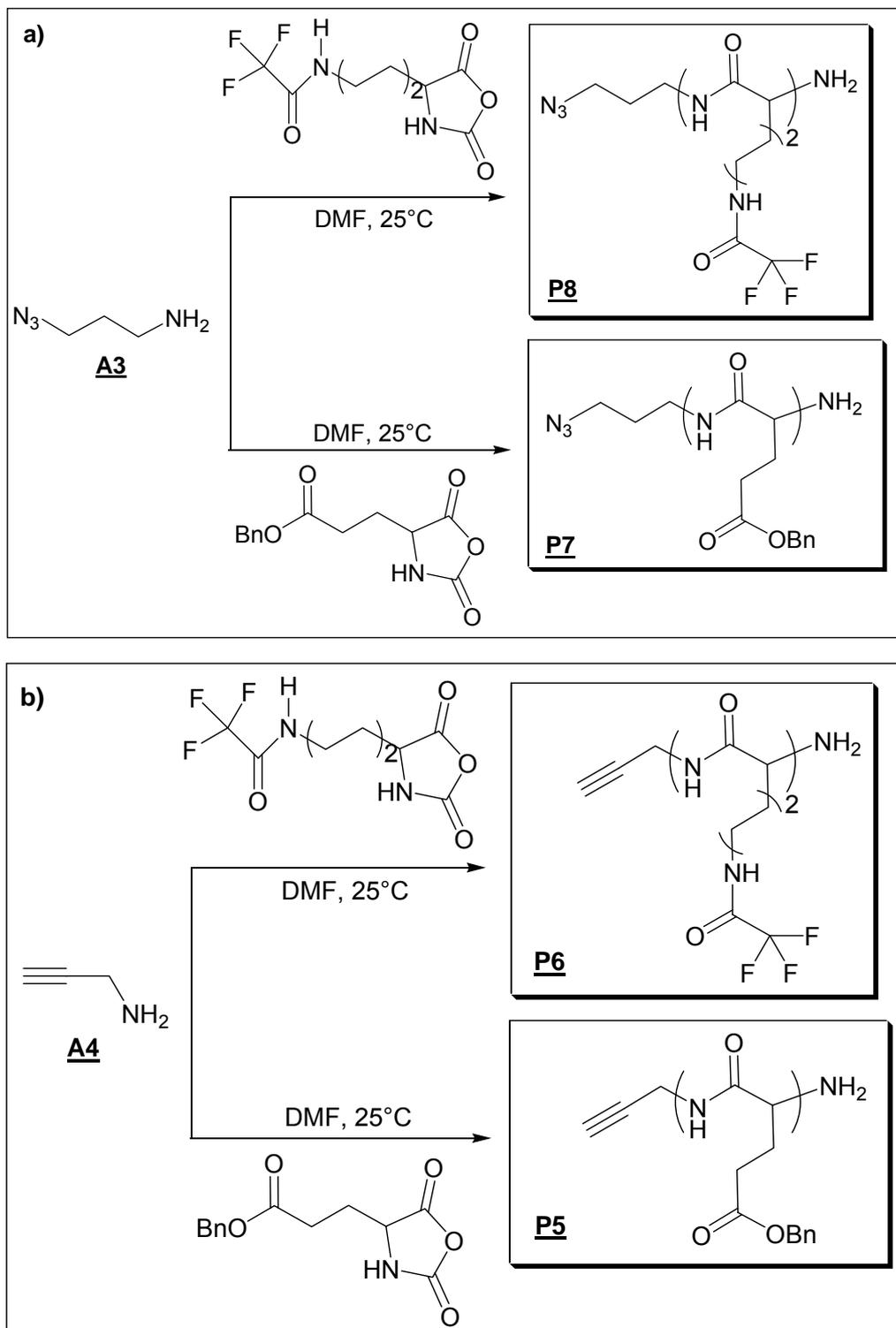
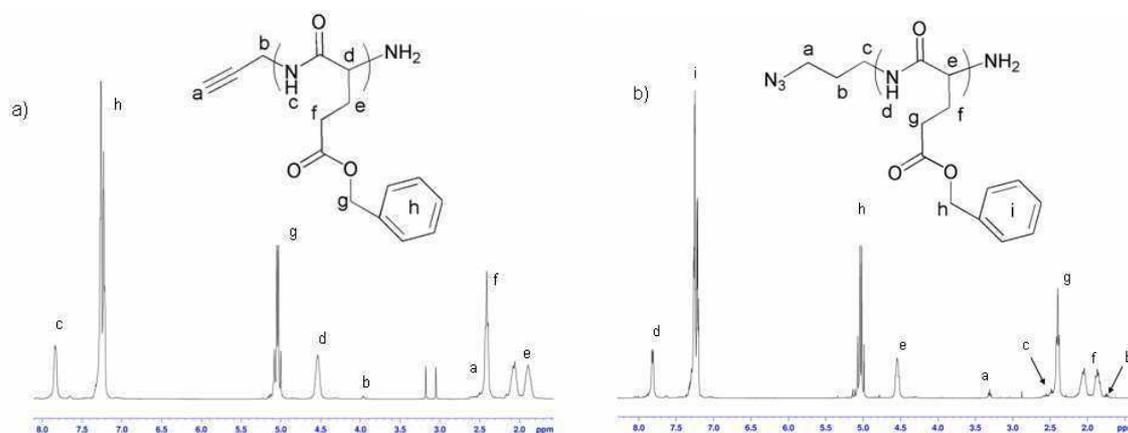


Schéma II-21 : Synthèse des précurseurs  $\alpha$ -fonctionnalisés PBLG et PTFALys : a) azoture, b) alcyne

Les quatre polymères (P5 à P8) ont été récupérés par précipitation dans le diéthyléther après 40 h de polymérisation avec des rendements élevés (>90%). Les deux homopolymères PBLG **P5** et **P7** ont été caractérisés par RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub> contenant 15% d'acide trifluoroacétique (TFA).



**Figure II-20 : Spectres RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> + 15%TFA, 400 MHz) des homopolymères : (a) α-alcyne-PBLG **P5** ; (b) α-azoture-PBLG **P7**.**

Comme précédemment, les masses molaires ont été déterminées en comparant l'intégration relative des pics caractéristiques des amorces (3.3 ppm pour A3 et 4 ppm pour A4) aux protons caractéristiques de la chaîne principale du PBLG, c'est à dire les protons méthylènes à 5 ppm (figure II-20).

En revanche, la PTFALys n'étant pas soluble dans le chloroforme, nous avons utilisé le DMSO-d<sub>6</sub> comme solvant pour analyser les composés **P6** et **P8** par RMN <sup>1</sup>H. Toutefois, les protons caractéristiques des amorces A3 et A4 n'ont pas pu être détectés, à cause du recouvrement de ce pic avec celui associé aux protons de la chaîne principale du polymère. Des spectres similaires ayant été obtenus pour les deux composés PTFALys **P6** et **P8**, seul celui correspondant à **P8** est montré (Figure II-21).

Les masses molaires de PTFALys **P6** et **P8** ont alors été estimées en faisant l'hypothèse que le volume hydrodynamique des chaînes de PTFALys obtenu en CES est semblable à celui du PBLG. Cette hypothèse doit bien entendu être prise avec précaution car les masses molaires déterminées par CES sont relatives à un étalonnage effectué avec des échantillons standards de polystyrène dans notre cas.<sup>53</sup> Dans ce cas, les masses molaires des PTFALys ont été calculées en utilisant un facteur correctif entre les valeurs apparentes données par CES et les valeurs « vraies » déterminées précédemment par RMN <sup>1</sup>H pour les blocs PBLG, comme illustré ci-dessous :

$$DP_{\text{PTFALys}} = DP_{\text{PBLG (RMN)}} * Mn_{\text{CES PTFALys}} / Mn_{\text{CES PBLG}}$$

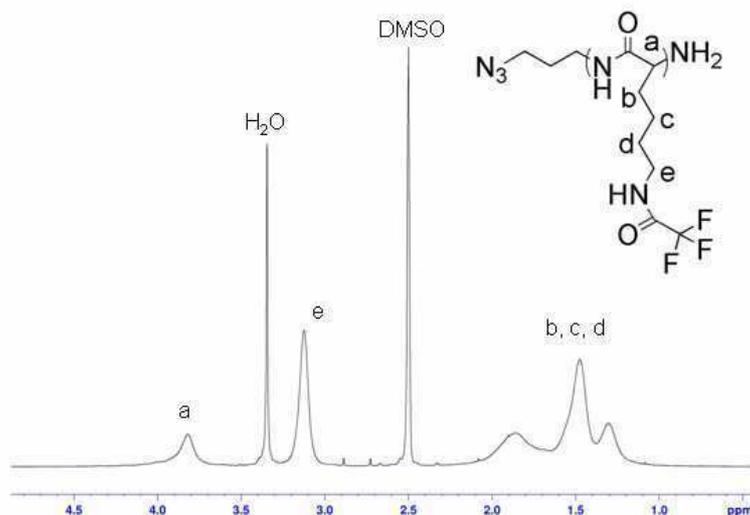


Figure II-21 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de l' $\alpha$ -azoture-PTFALys **P8**.

Nous avons ensuite vérifié, en déterminant la composition globale du copolymère final PBLG-*b*-PTFALys, que la masse molaire du bloc PTFALys était en accord avec la valeur ciblée pour le précurseur PTFALys avant couplage (tableau II-5).

Les composés **P5**, **P6**, **P7** et **P8** ont ensuite été caractérisés par CES en utilisant le DMF comme solvant d'éluion à 60°C en présence LiBr. Comme montré sur la figure II-22, la distribution des masses molaires est étroite et monomodale pour les quatre précurseurs. Dans tous les cas, l'indice de dispersité est inférieur à 1.2 ce qui confirme un bon contrôle de la polymérisation des NCA par ouverture de cycle en présence des amorceurs  $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnalisés A3 et A4.

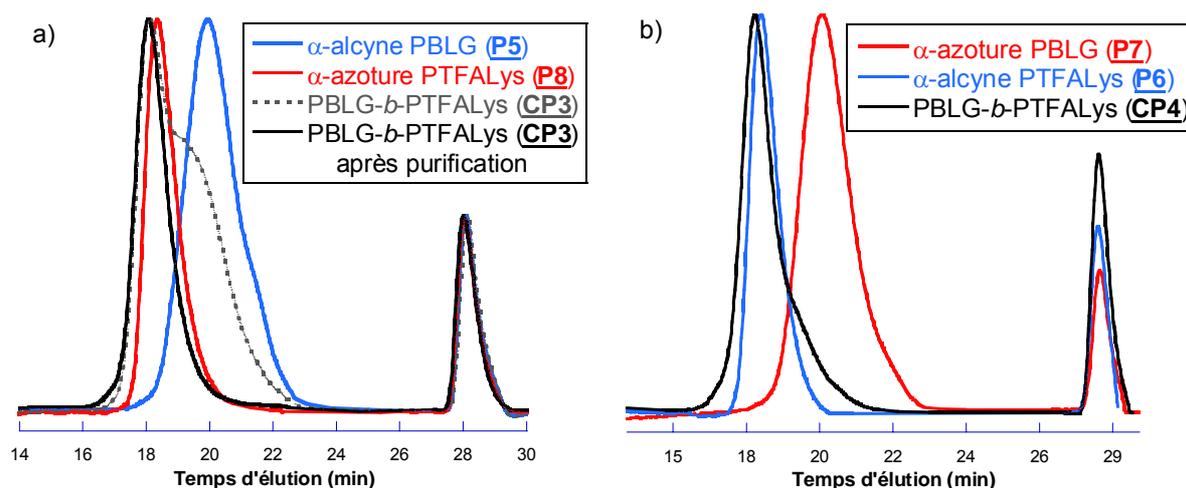


Figure II-22 : CES (DMF, 60°C, 1g/L LiBr) des copolymères diblocs PBLG-*b*-PTFALys **CP3** (a) et **CP4** (b) ainsi que des homopolymères précurseurs : a)  $\alpha$ -alkyne-PBLG **P5** et  $\alpha$ -azoture-PTFALys **P8**; b)  $\alpha$ -alkyne-PTFALys **P6** et  $\alpha$ -azoture-PBLG **P7**

### B-2-3-2 Réaction de couplage par « chimie click »

Les réactions de couplage ont été effectuées dans le DMF à 50°C par la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre, d'une part, l' $\alpha$ -alcyne-PBLG **P5** et l' $\alpha$ -azoture-PTFALys **P8** et, d'autre part, entre l' $\alpha$ -azoture-PBLGlu **P7** et l' $\alpha$ -alcyne-PTFALys **P6**, en utilisant le bromure de cuivre (CuBr) complexé par la pentamethyldiéthylènetriamine (PMDETA) comme système catalytique (schéma II-22).

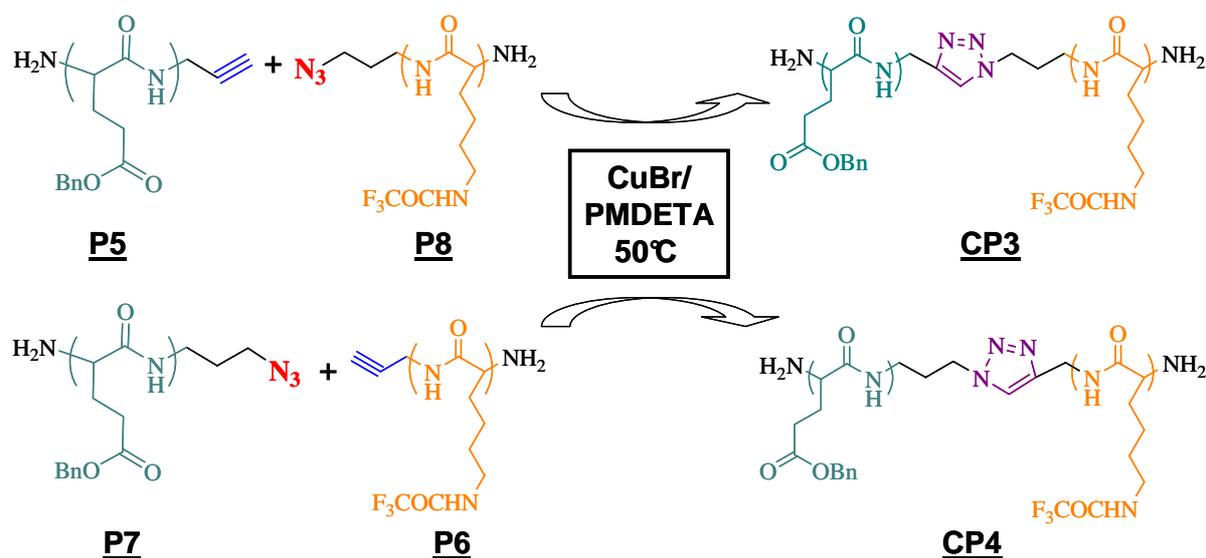


Schéma II-22 : Couplage des copolypeptides à blocs pour la synthèse de PBLG-*b*-PTFALys

Comme pour le copolymère à blocs PMADAME-*b*-PBLG, nous avons réalisé la réaction de couplage en présence d'un excès d'un des deux homopolymères. Ainsi, 50% d'excès molaire (1.5 éq.) d' $\alpha$ -alcyne-PBLG (**P5**) et d' $\alpha$ -alcyne-PTFALys (**P6**) ont été utilisés pour favoriser des rendements quantitatifs de synthèse des deux copolypeptides à blocs PBLG-*b*-PTFALys (**CP3** et **CP4**). Après 36h d'agitation, les deux composés sont récupérés par précipitation dans l'eau, de façon à se débarrasser des sels de cuivre, filtrés puis séchés. Dans les deux cas, les chromatogrammes obtenus en CES montrent un déplacement vers les fortes masses molaires après la réaction de couplage, par comparaison avec les homopolymères précurseurs (Figure II-22). Après précipitation sélective dans le chloroforme, la réponse RI en CES du copolypeptide **CP3** montre une allure monomodale et symétrique (figure II-22 a), confirmant la formation du diblocs sans la présence d' $\alpha$ -alcyne-PBLG résiduel. Cette étape de précipitation sélective consiste à se débarrasser de l'excès de l' $\alpha$ -alcyne-PBLG (**P5**). Pour cela, on a choisi un bon solvant de ce polymère et un mauvais du copolypeptide à blocs formé PBLG-*b*-PTFALys (**CP3**), à savoir le chloroforme. Ainsi, après filtration, on récupère un composé pur absent de toute trace d'homopolymère résiduel.

En revanche, la même méthode de purification par précipitation sélective dans le chloroforme semble moins efficace dans le cas du copolypeptide **CP4**. En effet, on observe toujours un épaulement dans le domaine des faibles masses molaires, correspondant à l'homopolymère  $\alpha$ -alcyne-PTFALys (**P6**) (figure II-22 b). La PTFALys n'étant pas soluble dans le chloroforme, il semble plus

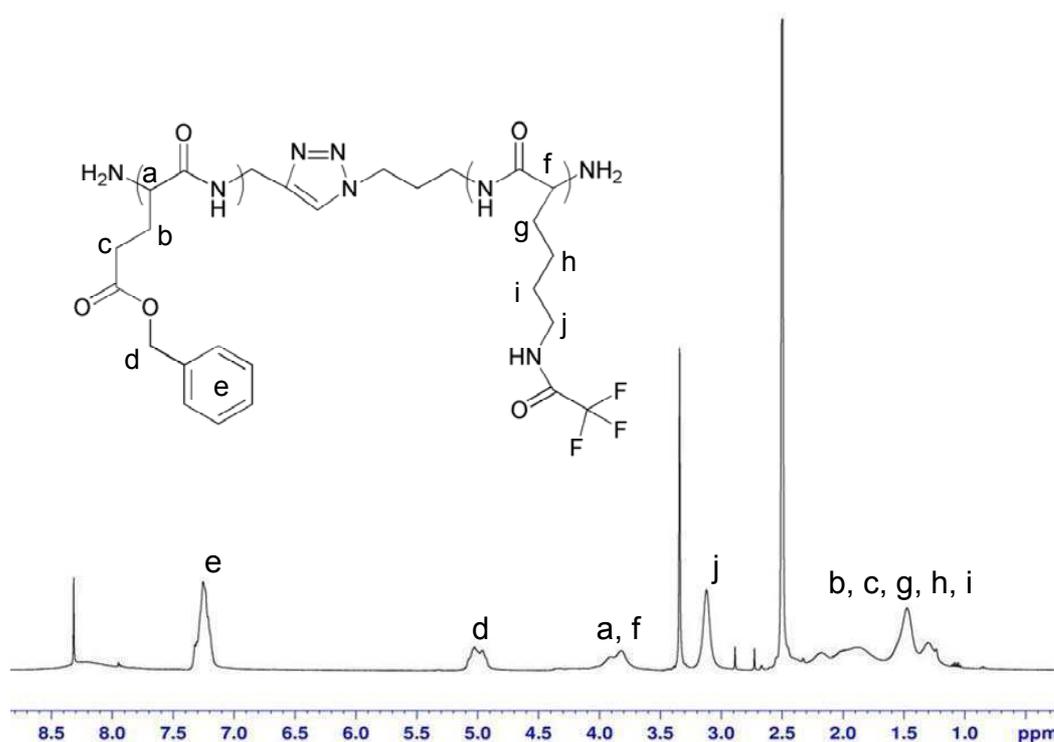
astucieux d'utiliser un excès de PBLG de façon à obtenir un copolypeptide PBLG-*b*-PTFALys pur, sans présence de précurseur résiduel.

Homopolymères $\alpha$ -alcyne				Homopolymères $\alpha$ -azoture				PBLG- <i>b</i> -PTFALys			
N°	$\overline{DP}_n$	$\overline{M}_n$ SEC (g.mol <sup>-1</sup> )	PDI	N°	$\overline{DP}_n$	$\overline{M}_n$ SEC (g.mol <sup>-1</sup> )	PDI	N°	Compo.	$\overline{M}_n$ SEC (g.mol <sup>-1</sup> )	PDI
P5	42 <sup>a)</sup>	13830	1.17	P8	86 <sup>b)</sup>	28390	1.09	CP3	42-84 <sup>c)</sup>	35100	1.15
P6	94 <sup>b)</sup>	31000	1.15	P7	44 <sup>a)</sup>	14500	1.09	CP4	-	33100	1.19

a) Degrés de polymérisation expérimentaux obtenus à partir de l'intégration relative des protons caractéristiques des bouts de chaînes par rapport à ceux de la chaîne principale. b) Estimés par CES dans le DMF à 60 °C en présence de LiBr, (calibration avec des étalons de polystyrène) en utilisant l'expression :  $DP_{PTFALys} = DP_{PBLG(RMN)} * M_{n,CES,PTFALys} / M_{n,CES,PBLG}$  (voir aussi le texte). c) Déterminés par RMN <sup>1</sup>H dans le DMSO-d<sub>6</sub>, en prenant le PBLG comme bloc référence.

**Tableau II-5 : Caractéristiques moléculaires des homopolymères fonctionnalisés PBLG et PTFALys et des copolymères diblocs PBLG-*b*-PTFALys correspondants obtenus par « chimie click ».**

La caractérisation du diblocs pur **CP3** par RMN <sup>1</sup>H confirme la structure attendue (figure II-23). En effet, le DMSO-d<sub>6</sub> étant un bon solvant des deux blocs, nous pouvons déterminer la composition globale de ce copolypeptide (tableau II-5).



**Figure II-23 : Spectre de RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) du copolypeptide à blocs PBLG-*b*-PTFALys **CP3****

La masse molaire du bloc PTFALys **P8** ainsi déterminée est en parfait accord avec la valeur ciblée lors de sa synthèse.

Enfin, l'efficacité de la réaction de couplage par « chimie click » a été vérifiée par spectroscopie infra-rouge (FTIR) avant et après couplage. La figure II-24 montre les spectres FTIR des homopolymères **P5** et **P8** avant couplage ainsi que le copolypeptide **CP3** après couplage. La disparition complète de la bande azoture à  $2100\text{ cm}^{-1}$  confirme le couplage quantitatif. Ces spectres nous renseignent par ailleurs sur la conformation des polypeptides. La figure II-24 nous montre les bandes d'absorption caractéristiques des fonctions amide I et amide II, à  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$  et  $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$ , respectivement, correspondant à la conformation en hélice- $\alpha$ .<sup>54</sup> Par conséquent, nous pouvons affirmer que le copolypeptide PBLG-*b*-PTFALys montre une conformation en hélice- $\alpha$  dans le THF et se comporte donc comme un système « rigide-rigide » dans ce solvant.

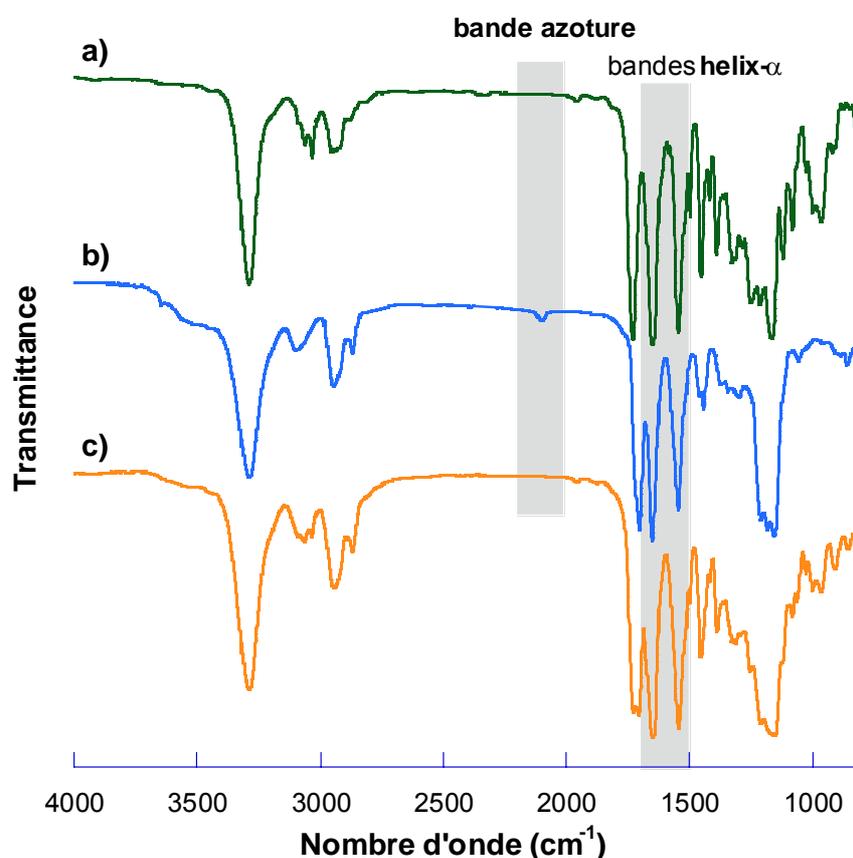


Figure II-24 : FTIR du copolymère diblocs PBLG-*b*-PTFALys **CP3** (c) et des homopolymères correspondants **P5** (a) et **P8** (b).

En conclusion, nous avons proposé une nouvelle méthodologie de synthèse simple et efficace pour l'obtention de copolypeptides synthétiques *via* la « chimie click » entre deux précurseurs peptidiques possédant des fonctions antagonistes, alcyne et azoture, en extrémités de chaînes. Ces deux fonctions ont pu être introduites de manière quantitative dans le PBLG et la PTFALys grâce à l'utilisation d'amorceurs  $\omega$ -amino  $\alpha$ -fonctionnels qui ont permis l'amorçage de la ROP des NCA

correspondants suivant la voie amine. Il est important de noter qu'aucune interférence des fonctions alcyne et azoture n'a été constatée durant la polymérisation des homopolymères. La réaction de couplage par « chimie click » s'est avérée quantitative.

Cette stratégie de couplage par « chimie click » permet d'envisager des perspectives intéressantes, notamment l'obtention de nouveaux systèmes, associant par exemple des propriétés antagonistes. Les copolypeptides à blocs sont en effet très utilisés dans le domaine biomédical du fait de leur capacité à mimer les protéines naturelles. Deming a référencé dans un article de revues très récent quelques unes des applications de ces copolymères à double blocs peptidiques synthétiques.<sup>55</sup>

Si l'on s'intéresse au copolypeptide de cette étude, PBLG-*b*-PTFALys, Lecommandoux et al. ont montré, qu'après hydrolyse basique, le nouveau copolymère à double blocs hydrophiles obtenu, PGA-*b*-PLys, composé d'un polyacide faible, PGA, et d'une polybase faible, PLys, s'auto-assemblait en milieu aqueux sous forme de vésicules directes ou inverses en fonction du pH,<sup>52</sup> ces dernières pouvant être des candidates intéressantes notamment dans le domaine de l'encapsulation et du relargage contrôlé de principes actifs.

## CONCLUSION

Nous avons synthétisé différents copolymères de tailles de blocs contrôlées grâce à deux méthodes principales : la voie séquentielle pour l'obtention des copolymères « hybrides » multistimulables à double blocs hydrophiles Jeffamine-*b*-PGA et la voie de couplage par « chimie click » pour les copolymères à blocs « hybrides » amphiphiles PMADAME-*b*-PBLG (qui donneront naissance après modification chimique à deux nouveaux copolymères à blocs multistimulables : PMADAME-*b*-PGA et PSPE-*b*-PGA) et les copolypeptides PBLG-*b*-PTFALys (Schéma II-23).

La méthode de couplage est une nouvelle méthodologie de synthèse suffisamment flexible pour permettre l'obtention de copolymères à blocs « hybrides » que nous n'avons pas pu synthétiser par d'autres voies. Cette méthodologie originale, simple et efficace nous a permis de publier deux articles, le premier dans *Macromolecules* pour le PMADAME-*b*-PBLG<sup>15</sup> et le deuxième dans *Macromol. Rapid Commun.* pour le PBLG-*b*-PTFALys<sup>56</sup>.

L'étude des propriétés associatives en milieu aqueux des différents copolymères à blocs, en fonction des paramètres extérieurs (pH, T, ...) ainsi que de leur composition, est présentée dans le chapitre suivant.

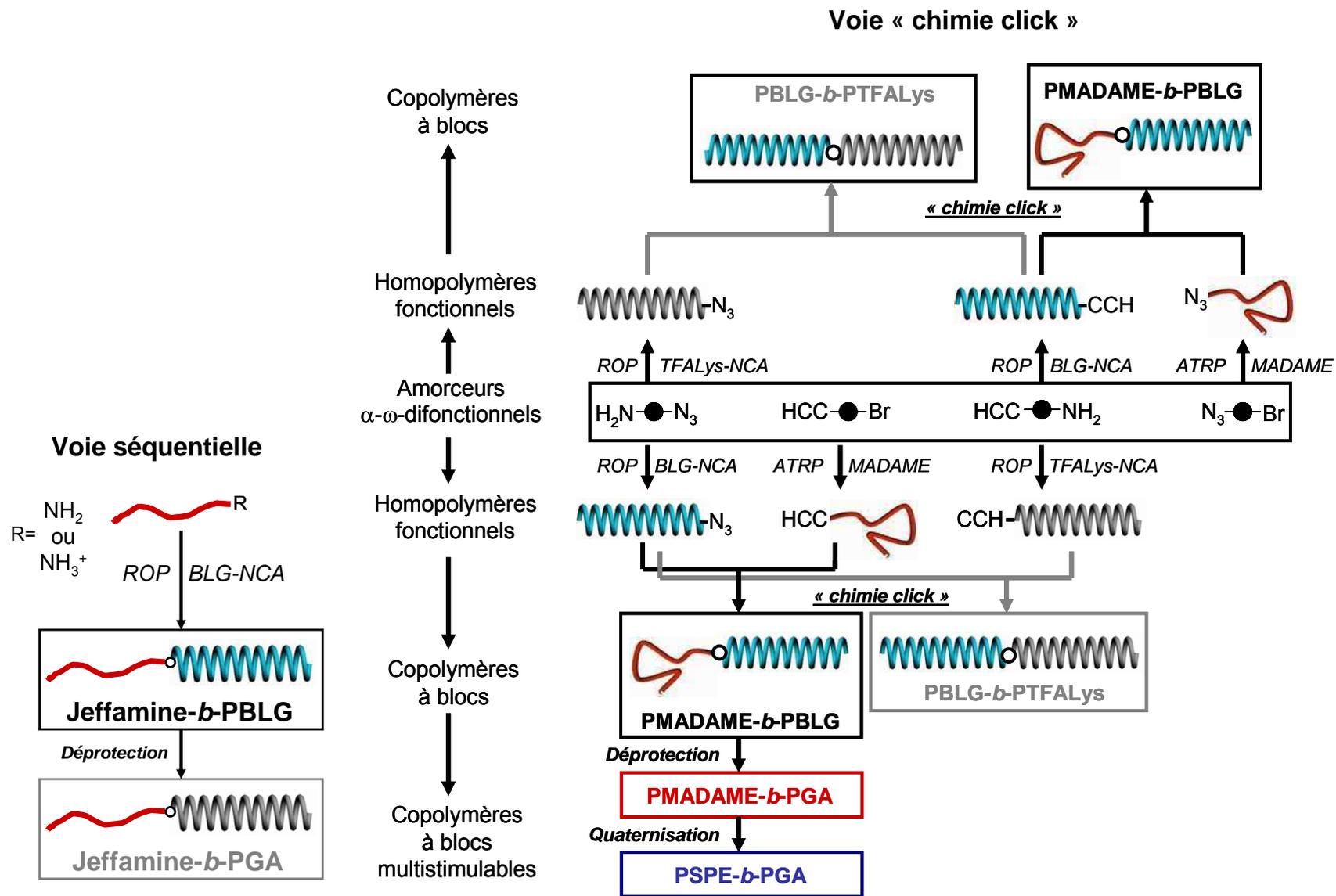


Schéma II-23 : schéma général des séquences réactionnelles utilisées pour la synthèse des copolymères à blocs traités dans cette étude

## Références bibliographiques

- <sup>1</sup> Hadjichristidis, N.; Iatrou, H.; Pitsikalis, M.; Pispas, S.; Avgeropoulos, A. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 725.
- <sup>2</sup> Matyjaszewski, K. *J. Phys. Org. Chem.* **1995**, *8*, 197.
- <sup>3</sup> Webster, O. *Science* **1991**, *251*, 887.
- <sup>4</sup> Taton, D.; Gnanou, Y., *Block Copolymers in Nanoscience*. Lazzari, M., Liu, G., Lecommandoux, S. ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: Darmstadt, **2006**; p 9.
- <sup>5</sup> Matmour, R.; More, A. S.; Wadgaonkar, P. P.; Gnanou, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8158.
- <sup>6</sup> Yagci, Y.; Atilla Tasdelen, M. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 1133.
- <sup>7</sup> Bernaerts, K. V.; Du Prez, F. E. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 671.
- <sup>8</sup> Mespouille, L.; Vachaudéz, M.; Suriano, F.; Gerbaux, P.; Coulembier, O.; Degée, P.; Flammang, R.; Dubois, P. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 2151.
- <sup>9</sup> Gao, H.; Min, K.; Matyjaszewski, K. *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 1370.
- <sup>10</sup> Durmaz, H.; Dag, A.; Altintas, O.; Erdogan, T.; Hizal, G.; Tunca, U. *Macromolecules* **2007**, *40*, 191.
- <sup>11</sup> Quemener, D.; Davis, T. P.; Barner-Kowollik, C.; Stenzel, M. H. *Chem. Commun.* **2006**, 5051.
- <sup>12</sup> Altintas, O.; Hizal, G.; Tunca, U. *J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.* **2006**, *44*, 5699.
- <sup>13</sup> Altintas, O.; Yankul, B.; Hizal, G.; Tunca, U. *J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.* **2006**, *44*, 6458.
- <sup>14</sup> Opsteen, J. A.; Van Hest, J. C. M. *Chem. Commun.* **2005**, 57.
- <sup>15</sup> Agut, W.; Taton, D.; Lecommandoux, S. *Macromolecules* **2007**, *40*, 5653.
- <sup>16</sup> Reynhout, I. C.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2327.
- <sup>17</sup> Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- <sup>18</sup> Nandivada, H.; Jiang, X.; Lahann, J. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 2197.
- <sup>19</sup> Lutz, J.-F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018.
- <sup>20</sup> Golas, P. L.; Matyjaszewski, K. *QSAR & Combinatorial Science* **2007**, *26*, 1116.
- <sup>21</sup> Evans, R. A. *Austr. J. Chem.* **2007**, *60*, 384.
- <sup>22</sup> Binder, W. H.; Sachsenhofer, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 15.
- <sup>23</sup> Huisgen, R., In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*; Padwa, A., Ed.; Wiley: New York, 1984; p 1.
- <sup>24</sup> Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- <sup>25</sup> Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- <sup>26</sup> Matyjaszewski, K.; Xia, J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921.
- <sup>27</sup> Kamigaito, M.; Ando, T.; Sawamoto, M. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3689.
- <sup>28</sup> Leuchs, H. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 857.
- <sup>29</sup> Kricheldorf, H. R., *Models of Biopolymers by Ring Opening Polymerization*. In Raton, B., Ed. **1990**.
- <sup>30</sup> Bamford, C. H., *Poly(Amino Acid)s Polypeptides and Proteins*. University of Wisconsin Press, **1962**.

- <sup>31</sup> Kricheldorf, H. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5752.
- <sup>32</sup> Deming, T. J. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *202*, 1.
- <sup>33</sup> Deming, T. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 1145.
- <sup>34</sup> Deming, T. J. *Nature* **1997**, *390*, 386.
- <sup>35</sup> Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1653.
- <sup>36</sup> Dimitrov, I.; Schlaad, H. *Chem. Commun.* **2003**, 2944.
- <sup>37</sup> Dimitrov, I. V.; Berlinova, I. V.; Vladimirov, N. G. *Macromolecules* **2006**, *39*, 2423.
- <sup>38</sup> Lutz, J.-F.; Schütt, D.; Kubowicz, S. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 23.
- <sup>39</sup> Sanda, F.; Gao, G.; Masuda, T. *Macromol. Bioscience* **2004**, *4*, 570.
- <sup>40</sup> Guillermain, C.; Gallot, B. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 1346.
- <sup>41</sup> Checot, F.; Brulet, A.; Oberdisse, J.; Gnanou, Y.; Mondain-Monval, O.; Lecommandoux, S. *Langmuir* **2005**, *21*, 4308.
- <sup>42</sup> Tsarevsky, N. V.; Sumerlin, B. S.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2005**, *38*, 3558.
- <sup>43</sup> Carboni, B.; Benalil, A.; Vaultier, M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3736.
- <sup>44</sup> Crespo, J. S.; Lecommandoux, S.; Borsali, R.; Klok, H. A.; Soldi, V. *Macromolecules* **2003**, *36*, 1253.
- <sup>45</sup> Zhang, X.; Xia, J.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5167.
- <sup>46</sup> Shen, Y.; Zhu, S.; Zeng, F.; Pelton, R. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5399.
- <sup>47</sup> Zeng, F.; Shen, Y.; Zhu, S.; Pelton, R. *Macromolecules* **2000**, *33*, 1628.
- <sup>48</sup> Pantoustier, N.; Moins, S.; Wautier, M.; Degee, P.; Dubois, P. *Chem. Commun.* **2003**, 340.
- <sup>49</sup> Liu, S.; Weaver, J. V. M.; Tang, Y.; Billingham, N. C.; Armes, S. P.; Tribe, K. *Macromolecules* **2002**, *35*, 6121.
- <sup>50</sup> Mao, B.; Gan, L.-H.; Gan, Y.-Y.; Li, X.; Ravi, P.; Tam, K.-C. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 5161.
- <sup>51</sup> Bütün, V. *Polymer* **2003**, *44*, 7321.
- <sup>52</sup> Rodriguez-Hernandez, J.; Lecommandoux, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2026.
- <sup>53</sup> Guillaneuf, Y.; Castignolles, P. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 897.
- <sup>54</sup> Klok, H.-A.; Lecommandoux, S. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1217.
- <sup>55</sup> Deming, T. J. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 858.
- <sup>56</sup> Agut, W.; Agnaou, R.; Lecommandoux, S.; Taton, D. *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1147.



# Chapitre III

Etude des propriétés d'auto-  
assemblage des copolymères à  
blocs en solution aqueuse



<b>A- Etude en milieu aqueux du copolymère Jeffamine-<i>b</i>-PGA<sub>30</sub> .....</b>	<b>129</b>
<b>A-1 Modèle de la sphère.....</b>	<b>132</b>
<b>A-2 Modèle de micelle sphérique de copolymère.....</b>	<b>135</b>
<b>A-3 Conclusion .....</b>	<b>138</b>
<b>B- Etude en milieu aqueux d'une nouvelle famille de copolymères à blocs « adaptatifs » .....</b>	<b>139</b>
<b>B-1 Propriétés du copolymère à blocs PMADAME-<i>b</i>-PGA.....</b>	<b>140</b>
B-1-1 Etude en fonction du pH .....	141
<i>B-1-1-1 Etude à pH=6.2.....</i>	<i>147</i>
<i>B-1-1-2 Etude à pH=4, pH=5, pH=6.....</i>	<i>150</i>
B-1-2 Etude en fonction de la température .....	152
B-1-3 Conclusion .....	162
<b>B-2 Propriétés du copolymère à blocs PSPE-<i>b</i>-PGA.....</b>	<b>164</b>
B-2-1 Modulation de la UCST de l'homopolymère PSPE.....	165
<i>B-2-1-1 Influence de la masse molaire du PSPE.....</i>	<i>165</i>
<i>B-2-1-2 Influence du taux de quaternisation .....</i>	<i>166</i>
<i>B-2-1-3 Influence de l'agent de quaternisation.....</i>	<i>166</i>
B-2-2 Etude en milieu aqueux du copolymère PSPE <sub>85</sub> - <i>b</i> -PGA <sub>37</sub> .....	167
B-2-3 Conclusion .....	168
<b>B-3 Propriétés du copolymère à blocs PMADAME-<i>b</i>-PBLG .....</b>	<b>170</b>
B-3-1 Mise en solution .....	171
<i>B-3-1-1 Mise en solution par dissolution directe .....</i>	<i>171</i>
<i>B-3-1-2 Mise en solution par la méthode de l'émulsification.....</i>	<i>174</i>
<i>B-3-1-3 Mise en solution par dissolution indirecte ou méthode du « co-solvant » .....</i>	<i>176</i>
B-3-2 Incorporation de particules magnétiques dans la membrane hydrophobe des vésicules .....	180
B-3-3 Conclusion .....	185



L'objectif de ce troisième chapitre est d'étudier le comportement en solution aqueuse des différents copolymères multistimulables précédemment synthétisés en fonction du pH, de la température et de la force ionique.

Nous avons tenté de classer ces composés selon leur degré d'adaptabilité, c'est-à-dire leur capacité à changer de morphologie en fonction des paramètres extérieurs (schéma III-1).

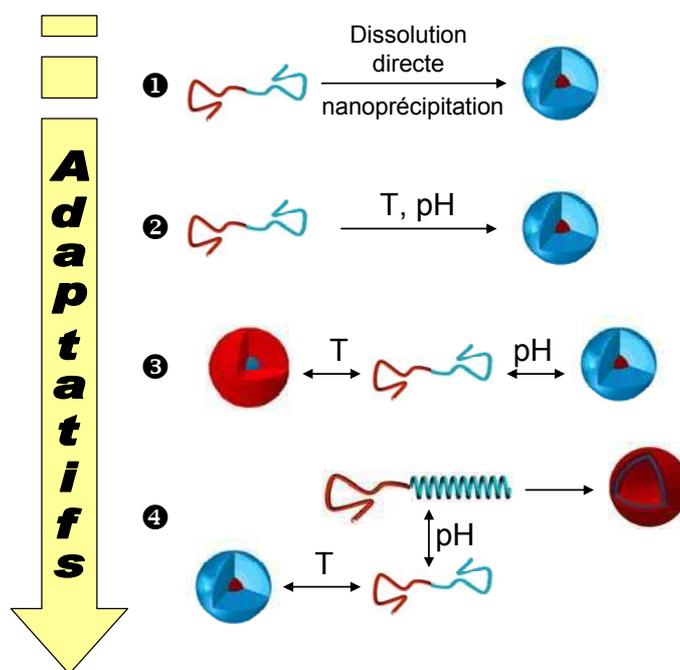


Schéma III-1 : Classification des copolymères à blocs en fonction de leur degré d'adaptabilité

La première famille concerne les copolymères amphiphiles, c'est-à-dire composés d'un bloc hydrophile et d'un segment hydrophobe (schéma III-1 cas 1). Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre bibliographique A-1), ils s'organisent en solution aqueuse pour former différentes morphologies, celles-ci dépendent notamment de la technique de mise en solution choisie. Etant composé d'un bloc hydrophobe « permanent », ces copolymères sont présents dans l'eau uniquement sous forme d'agrégats micellaires.

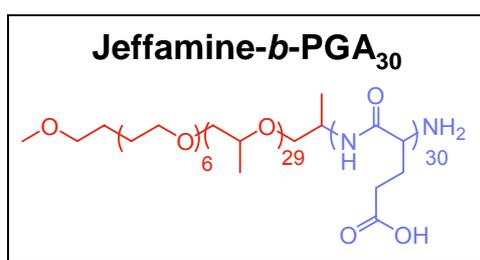
Les trois autres familles, en revanche (schéma III-1 cas 2, 3, 4) ont la capacité de pouvoir former des chaînes libres dans l'eau : ce sont des copolymères à double blocs hydrophiles stimulables ». Possédant au moins un bloc stimulant, leur auto-assemblage se produit par précipitation de ce dernier après changement des paramètres extérieurs. Nous avons choisi de faire la distinction entre : (2) les copolymères possédant un bloc stimulant capable de passer de l'état de chaînes libres à celui de nanoparticules, (3) ceux possédant deux blocs hydrophiles stimulables ayant ainsi la capacité de s'organiser sous forme de micelles et micelles inverses et enfin (4) les plus adaptatifs, c'est-à-dire composés également de deux blocs stimulables mais dont l'un des blocs (par exemple peptidique) présente la particularité de changer de conformation par changement de sa structure secondaire (hélice- $\alpha$  à pelote statistique par exemple).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à des copolymères appartenant à la dernière catégorie. Dans un premier temps, nous avons examiné le comportement d'un copolymère à blocs Jeffamine-*b*-PGA, comprenant un bloc thermosensible (Jeffamine) et un bloc peptidique pH-sensible (PGA). Notre attention s'est ensuite focalisée sur le copolymère PMADAME-*b*-PBLG, précurseur de deux autres copolymères à blocs multistimulables : (i) le PMADAME-*b*-PGA et (ii) le PSPE-*b*-PGA. Ces copolymères possèdent tous deux un bloc polypeptidique sensible au pH (PGA) et un autre thermosensible : à LCST pour le premier et UCST pour le second.

Afin d'étudier ces copolymères et rendre compte de la formation d'agrégats micellaires en milieu aqueux, différentes techniques de caractérisation ont été utilisées : diffusion dynamique de la lumière (DLS), diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) et microscopie électronique en transmission (TEM).

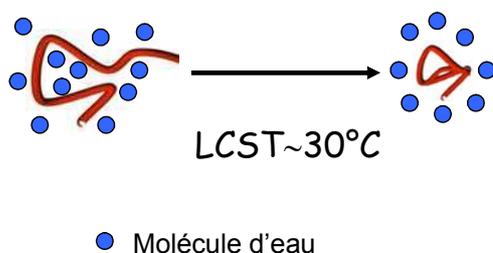
## A- Etude en milieu aqueux du copolymère Jeffamine-*b*-PGA<sub>30</sub>

Rappelons que ce copolymère Jeffamine-*b*-PGA<sub>30</sub> a été obtenu après hydrolyse basique du Jeffamine-*b*-PBLG (Chapitre II). Ce copolymère hybride à double blocs hydrophiles (CDBH) présente l'intérêt de s'auto-assembler dans l'eau en réponse à des stimuli externes : le pH et la température. En effet, la Jeffamine est thermosensible et possède une LCST vers 30°C alors que le PGA est pH-sensible (pKa~4.1). Les propriétés dans l'eau de ce CDBH sont présentées dans le schéma III-2.



### Bloc synthétique

- Copolymère statistique :
  - 29 unités d'oxyde de propylène
  - 6 unités d'oxyde d'éthylène
- Thermosensible : LCST ~ 30°C



### Bloc polypeptide

- Biocompatible
- Biodégradable
- Utilisé comme « conjugué » (avec de la doxorubicine en particulier)
- sensible au pH : pKa ~ 4.1
- Changement réversible de structure secondaire

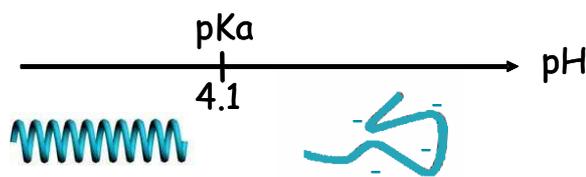


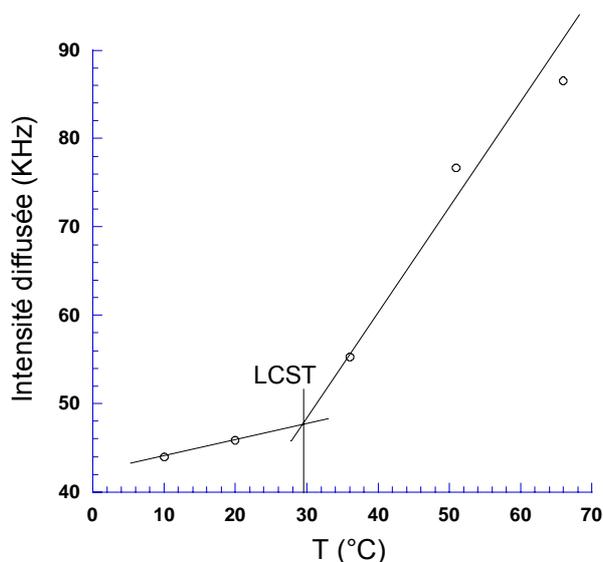
Schéma III-2 : Caractéristiques du copolymère Jeffamine-*b*-PGA<sub>30</sub>

On peut d'abord mentionner qu'il nous a été impossible d'obtenir des agrégats bien définis à pH acide (c'est-à-dire lorsque le PGA est sous une conformation en hélice- $\alpha$ ) du fait de la précipitation du système. Le bloc Jeffamine probablement trop court, ne semble pas permettre une stabilisation efficace des nanoparticules formées. Par conséquent, nous nous sommes focalisés sur l'influence de la température sur la formation des nano-objets.

Afin de tirer le meilleur profit des différents résultats obtenus par DLS et par SANS, les mêmes solutions de copolymères ont été analysées par ces deux techniques de caractérisation. Les études

ont donc été réalisées sur une solution de Jeffamine-*b*-PGA<sub>30</sub> en milieu basique (pH11) à une concentration de  $c=25$  mg/ml, à différentes températures.

Le copolymère a d'abord été mis en solution en milieu basique par ajout de NaOH (pH 11,  $c = 25$ mg/mL) à 20°C pour garantir la solubilisation des deux blocs. Dans de telles conditions, le bloc PGA est chargé alors que le bloc Jeffamine se situe en dessous de sa LCST. Ce CDBH est donc dans une conformation de type pelote statistique et forme des unimères à 20°C comme en atteste la faible intensité diffusée (figure III-1).



**Figure III-1 : Intensité diffusée du copolymère Jeffamine-*b*-PGA<sub>30</sub> dans l'eau obtenue par DLS à 90° à différentes températures ( $c=25$  mg/ml, pH=11).**

Le fait d'augmenter la température de la solution au-delà de la LCST de la Jeffamine conduit à la formation d'agrégats, comme l'indique l'augmentation de l'intensité diffusée (figure III-1). De plus, la dépendance angulaire linéaire de la fréquence  $\Gamma$  en fonction de  $q^2$  (figure III-2), mesurée à  $T > LCST$ , confirme un caractère diffusif homogène caractéristique des particules sphériques.

On observe donc la formation de nano-objets bien définis dès 36°C, c'est-à-dire dès qu'on applique une température légèrement supérieure à la LCST du bloc Jeffamine (~30°C).

Ces agrégats stables de dimension nanométrique sont dus à la précipitation des chaînes de Jeffamine constituant le cœur des micelles. Les structures micellaires sont ici stables même aux fortes concentrations grâce aux blocs PGA qui empêchent les phénomènes d'agrégation. Ces derniers forment, en effet, une couronne protectrice permettant une stabilisation à la fois stérique et électrostatique (électrostérique). Le rayon hydrodynamique  $R_H$  de ces micelles augmente légèrement de 11.2nm à 13.5nm lorsqu'on augmente la température de 36°C à 66°C.

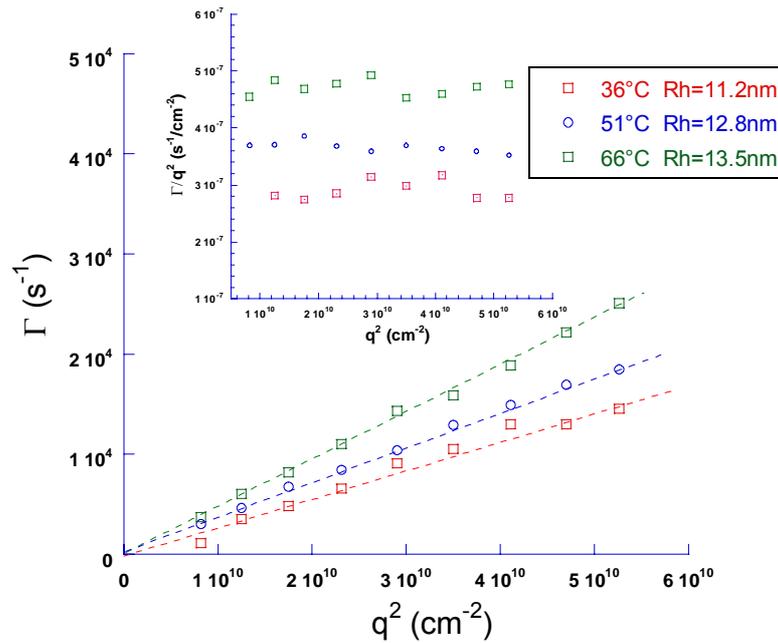


Figure III-2 : Fréquence mesurée en fonction de  $q^2$  à différents angles pour le copolymère Jeffamine-b-PGA<sub>30</sub> ( $c=25$  mg/ml,  $pH=11$ ) à différentes températures au-delà de la LCST. L'encadré représentant  $\Gamma/q^2$  ( $=D_{app}$ ) en fonction de  $q^2$  prouve la formation de micelles sphériques.

La présence d'unimères à basse température (20°C) a également été mis en évidence par SANS. En effet, la diminution de l'intensité avec une pente en  $q^{-5/3}$  (figure III-3) est typique de chaînes de polymère en bon solvant. En augmentant progressivement la température, le facteur de forme est modifié, passant d'un facteur de forme de chaîne libre à 20°C à celui d'une sphère à 36°C. De plus, entre 36 et 66°C, l'intensité diffusée aux faibles valeurs de  $q$  augmente progressivement ce qui signifie que le contraste et/ou la masse molaire (c'est-à-dire le nombre d'agrégation) des micelles augmente. Des expériences précédentes réalisées sur d'autres copolymères à blocs<sup>1,2</sup> ont montré que l'intensité diffusée de micelles de type cœur-couronne est principalement due au cœur de la micelle : la couronne étant trop hydratée, son intensité diffusée est négligeable. Aussi, la densité de longueur de diffusion du PGA dans l'eau deutériée est très faible (la densité de longueur de diffusion du PGA est  $\rho_{PGA} = 5.11 \times 10^{-10}$  cm<sup>-2</sup>, celle de l'eau lourde étant de  $\rho_{D2O} = 6.38 \times 10^{-10}$  cm<sup>-2</sup>). On peut donc affirmer que la variation d'intensité diffusée en fonction de la température provient uniquement des blocs Jeffamine constituant le cœur des agrégats.

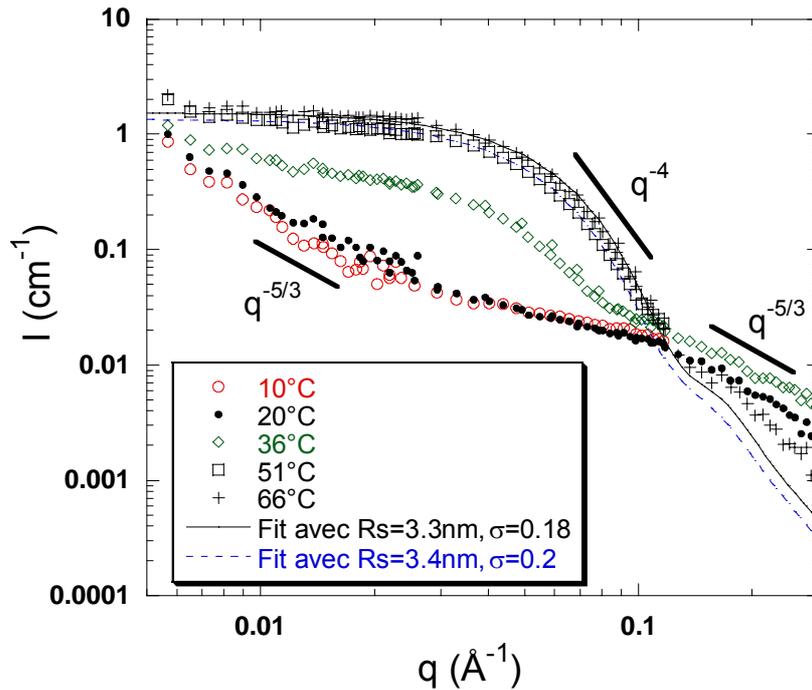


Figure III-3 : Intensité diffusée en SANS en fonction de  $q$  pour le copolymère Jeffamine-b-PGA<sub>30</sub> à différentes températures ( $c=25$  mg/ml,  $pH=11$ ). Les courbes à hautes températures peuvent être parfaitement ajustées avec le facteur de forme d'une sphère (les valeurs du rayon  $R_s$  et de la distribution Log normal  $\sigma$  sont renseignées dans la légende).

Deux modèles théoriques ont alors été développés afin de mieux décrire le mécanisme de formation de ces objets :

Celui de la sphère qui prend en compte l'intensité d'un agrégat sphérique formé par la Jeffamine entourée d'eau lourde

Celui de la micelle sphérique de copolymère qui prend également en compte la contribution de la couronne

### A-1 Modèle de la sphère

La diffusion de  $N$  particules identiques de symétrie sphérique ayant un volume  $V_p$  placées dans un volume total  $V$  peut être décrite en fonction du module du vecteur de diffusion  $q$  :

$$I(q) = \frac{N}{V} (\Delta\rho)^2 V_p^2 P(q) S(q) \quad (\text{Equation III-1})$$

$P(q)$  représente le facteur de forme des particules,  $S(q)$  le facteur de structure et  $(\Delta\rho)^2$  le contraste, c'est-à-dire la différence de densité de longueur de diffusion entre les particules et le solvant. Dans le cas de solutions très diluées, le facteur de structure  $S(q) \rightarrow 1$  et l'équation III-1 devient :

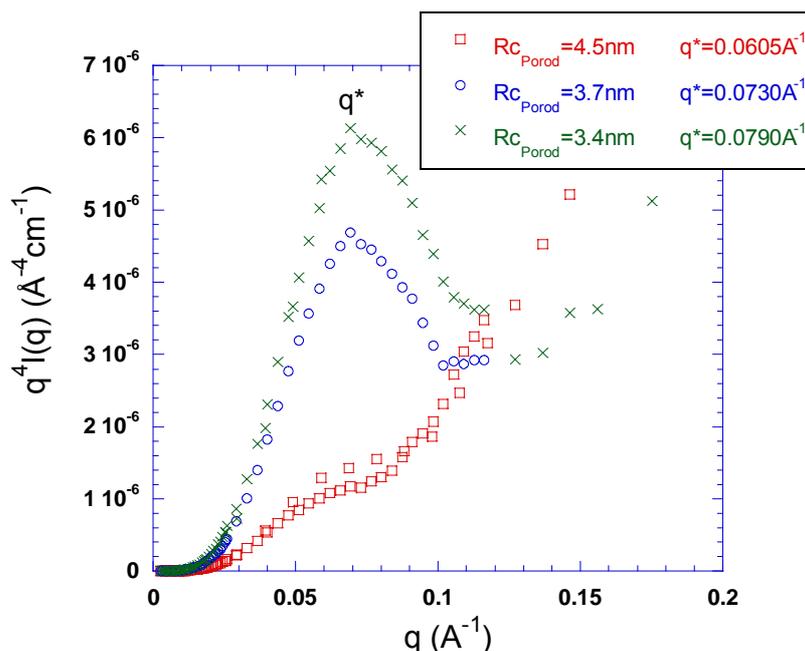
$$I(q) = \frac{N}{V} (\Delta\rho)^2 V_p^2 P(q) \quad (\text{Equation III-2})$$

Le facteur de forme d'une sphère homogène de rayon  $R_s$  peut s'écrire<sup>3</sup> :

$$P_{sphère}(q) = \left[ \frac{3(\sin(qR_s) - qR_s \cos(qR_s))}{(qR_s)^3} \right]^2 \quad (\text{Equation III-3})$$

Les valeurs du rayon du cœur des micelles ainsi que leur dispersité en taille ont été obtenues en ajustant les courbes expérimentales à l'aide de facteurs de forme simulés<sup>2,4</sup> prenant en compte les différentes fonctions de résolution expérimentales. Ainsi, connaissant la densité de longueur de diffusion de la Jeffamine ( $\rho_{eff} = 4.17 \times 10^{-9} \text{ cm}^{-2}$ ), nous avons pu déterminer les rayons des cœurs des agrégats :  $R_s = R_c$  (figure III-3).

Ces résultats ont été confirmés aux différentes températures en ayant recours à la représentation de Porod<sup>5</sup> de l'intensité diffusée par SANS, comme montré sur la figure III-4. Dans cette représentation, la taille des cœurs de Jeffamine est liée à la position de la première oscillation ( $q^*$ ) par la relation  $R_c = 2,7/q^*$  pour le cas de sphères monodisperses. On constate en effet que le rayon du cœur des micelles décroît de 4.5nm à 3.4nm lorsque la température augmente de 36°C à 66°C.



**Figure III-4 : Intensité diffusée par SANS dans la représentation de Porod ( $q^4 I(q)$ ) pour le copolymère Jeffamine-*b*-PGA<sub>30</sub> dans l'eau à différentes températures : 36°C (carré), 51°C (cercle), 66°C (croix).**

Un tel comportement peut être attribué à un changement de l'état d'hydratation du cœur hydrophobe des micelles, comme l'ont déjà montré Hatton et coll.<sup>6,7</sup> également par des mesures de SANS pour le système poly(oxyde d'éthylène deutérié)-*b*-poly(oxyde de propylène)-*b*-poly(oxyde d'éthylène deutérié) (dPEO-*b*-PPO-*b*-dPEO). A partir d'expériences de variations de contraste, ces mêmes auteurs ont observé que le nombre d'agrégation ainsi que la proportion de PPO dans le cœur des micelles augmentent avec la température, le rayon du cœur, quant à lui, demeurant constant.

Dans notre étude, nous observons une diminution du rayon du cœur des micelles lorsque la température augmente donc nous présumons en première approximation que le nombre d'agrégation reste le même et que seul le taux d'hydratation change. Ainsi, les différentes mesures réalisées nous ont permis d'obtenir des informations quantitatives grâce à des équations simples. Par exemple, le nombre d'agrégation des micelles s'écrit :

$$Z = \frac{\overline{M_{w \text{ micelle}}}}{M_{w \text{ copolymère}}} \quad (\text{Equation III-4})$$

avec  $M_{w \text{ micelle}}$ , la masse molaire moyenne en masse des micelles et  $M_{w \text{ copolymère}}$ , la masse molaire moyenne en masse du copolymère.

A haute température, quand elle est entièrement déshydratée, la Jeffamine forme le cœur sphérique, dense et homogène des micelles. Ainsi, le volume de ces micelles peut être déterminé en prenant en compte uniquement les caractéristiques du cœur hydrophobe grâce à l'expression :

$$V_c = \frac{4}{3} \pi \cdot R_c^3 = \frac{Z M_{\text{Jeffamine}}}{\rho_{\text{Jeffamine}} \cdot N_A} \quad (\text{Equation III-5})$$

avec  $R_c$  le rayon du cœur,  $M_{\text{Jeffamine}}$ , la masse molaire moyenne en nombre de la Jeffamine,  $N_A$ , le nombre d'Avogadro et  $\rho_{\text{Jeffamine}}$ , la densité de la Jeffamine ( $1.004 \text{ g.cm}^{-3}$ ).

Le nombre d'agrégation  $Z$  s'écrit alors :

$$Z = \frac{4 \pi \cdot R_c^3 \rho_{\text{Jeffamine}} \cdot N_A}{3 M_{\text{Jeffamine}}} \quad (\text{Equation III-6})$$

Avec ces équations, on obtient un nombre d'agrégation  $Z=45$  pour les micelles formées à  $66^\circ\text{C}$ , valeur « typique » pour des micelles sphériques. Nous avons également déterminé le nombre d'agrégation à partir de l'intensité diffusée à  $q \rightarrow 0$ . En effet, dans ces conditions  $P(q \rightarrow 0) = 1$  et l'équation III-2 s'écrit :

$$I(q)_{q \rightarrow 0} = \frac{N}{V} (\Delta \rho)^2 V_p^2 = \frac{c \cdot N_A}{M_{w \text{ micelle}}} (\Delta \rho)^2 V_p^2 \quad (\text{Equation III-7})$$

avec  $c = \frac{N M_{w \text{ micelle}}}{V N_A}$ , la concentration du copolymère à blocs en solution et  $M_{w \text{ micelle}}$ , la masse molaire moyenne en masse des micelles.

La combinaison des équations III-4 et III-7 donne accès à un nombre d'agrégation  $Z=48$  à  $66^\circ\text{C}$ , soit en parfaite concordance avec la précédente valeur (avec  $\Delta\rho = \rho_{D20} - \rho_{\text{Jeffamine}} = 6.38 \times 10^{-10} - 4.17 \times 10^{-9} = 3.52 \times 10^{-9} \text{ cm}^{-2}$ ). Cela confirme donc la complète déshydratation du coeur des micelles à  $66^\circ\text{C}$ .

Enfin, en supposant d'une part, que le coeur des micelles est entièrement déshydraté à  $66^\circ\text{C}$  et, d'autre part, que le nombre d'agrégation reste identique à haute température, on peut en estimer leur taux d'hydratation à plus basse température ( $36^\circ\text{C}$ ) grâce au rapport des volumes :

$$\text{Taux d'hydratation} = 1 - \frac{3.4^3}{4.5^3} = 57\% \quad (\text{Equation III-8})$$

Les micelles possèdent donc un coeur hydraté d'environ 60% à  $36^\circ\text{C}$ . Ce taux d'hydratation diminue progressivement lorsqu'on augmente la température, le rayon du coeur des micelles passant en effet de 4.5nm à  $36^\circ\text{C}$  à 3.3 nm à  $66^\circ\text{C}$  (figures III-3 et III-4).

## ***A-2 Modèle de micelle sphérique de copolymère***

Bien que le modèle de la sphère permette de très bien ajuster les données expérimentales obtenues à  $51^\circ\text{C}$  et  $66^\circ\text{C}$ , il reste cependant inapproprié pour décrire les données fournies aux grandes valeurs de  $q$  à  $36^\circ\text{C}$ . Nous avons donc choisi le modèle de micelle sphérique de copolymères développé par Pedersen<sup>8,9</sup> pour décrire le comportement du copolymère en solution à  $66^\circ\text{C}$  (pour confirmer les valeurs obtenues grâce au modèle de la sphère) et à  $36^\circ\text{C}$ .

Ce modèle prend en compte à la fois la contribution du coeur ainsi que celle des chaînes à la surface des micelles. Le facteur de forme de micelle sphérique de copolymère est la somme de quatre termes :

le facteur de forme du coeur sphérique :  $P_{\text{sphère}}(q)$

le facteur de forme des chaînes de polymères dans la couronne :  $P_{\text{chaînes}}(q)$

le terme croisé entre le coeur et les chaînes :  $S_{\text{core-couronne}}(q)$

le terme croisé entre les chaînes de la couronne :  $S_{\text{couronne-couronne}}(q)$

Le facteur de forme peut donc s'écrire :<sup>8,9</sup>

$$P_{\text{micelle sphérique}}(q) = Z^2\beta_{\text{coeur}}^2 P_{\text{sphère}}(q) + Z\beta_{\text{couronne}}^2 P_{\text{chaînes}}(q) + 2Z^2\beta_{\text{coeur}}\beta_{\text{couronne}} S_{\text{coeur-couronne}}(q) + Z(Z-1)\beta_{\text{couronne}}^2 S_{\text{couronne-couronne}}(q) \quad (\text{Equation III-9})$$

avec  $Z$  le nombre d'agrégation des micelles,  $\beta_{\text{coeur}}$  et  $\beta_{\text{couronne}}$  les longueurs de diffusion du coeur et de la couronne, respectivement. Celles-ci peuvent être calculées grâce aux relations :

$$\beta_{\text{coeur}} = V_{\text{coeur}}(\rho_{\text{coeur}} - \rho_{\text{solvant}}) \quad \text{et} \quad \beta_{\text{couronne}} = V_{\text{couronne}}(\rho_{\text{couronne}} - \rho_{\text{solvant}})$$

avec  $V_{\text{coeur}}$  et  $V_{\text{couronne}}$  le volume des blocs constituant le coeur et la couronne, respectivement. Les grandeurs  $\rho_{\text{coeur}}$  et  $\rho_{\text{couronne}}$  représentent, respectivement, les densités de longueur de diffusion cohérentes correspondantes et  $\rho_{\text{solvant}}$  celle du solvant.

Les expressions des termes croisés, cœur-couronne et couronne-couronne, dans l'équation III-9, dépendent de la géométrie du cœur. En ce qui concerne les chaînes de PGA à la surface des micelles, nous avons choisi de les modéliser avec une fonction de Debye<sup>10</sup> définie comme :

$$P(q) = \frac{2(e^{-x} - 1 + x)}{x^2} \text{ avec } x = q^2 R_g^2 \quad (\text{Equation III-10})$$

Ce modèle de micelle sphérique de copolymères est fonction de nombreux paramètres : Z, le nombre d'agrégation ; R<sub>s</sub>, le rayon des cœurs sphériques avec une polydispersité  $\sigma$  ; et R<sub>g</sub>, le rayon de giration des chaînes dans la couronne. De plus, le contraste du cœur entre la Jeffamine et D<sub>2</sub>O peut varier en fonction du taux d'hydratation (x) du cœur. Ainsi, dans l'équation III-9,  $\rho_{\text{cœur}}$  devient  $\rho_{\text{cœur}} = V_{\text{cœur}}(1-x)(\rho_{\text{cœur}} - \rho_{\text{solvant}})$ .

Les paramètres optimums des deux modèles sont regroupés dans le tableau III-1.

	Modèle de la sphère		Modèle de micelle sphérique de copolymères				
	R <sub>s</sub> (nm)	$\sigma$	R <sub>s</sub> (nm)	$\sigma$	Z	R <sub>g</sub> (nm)	x <sup>a</sup>
66°C	3.3 ± 0.05	0.18 ± 0.02	3.6 ± 0.05	0.15 ± 0.02	45 ± 2	2 ± 2	0
51°C	3.4 ± 0.05	0.20 ± 0.02	3.8 ± 0.05	0.18 ± 0.02	45 ± 2	1 ± 1	0.10 ± 0.05
36°C	4.5 ± 0.05	0.20 ± 0.02	4.0 ± 0.05	0.2 ± 0.02	5 ± 1	1.3 ± 0.15	0.80 ± 0.05

a) Taux d'hydratation du cœur de Jeffamine dans le D<sub>2</sub>O

**Tableau III-1 : Comparaison des paramètres optimums des modèles de la sphère et de la micelle sphérique de copolymères.**

A haute température, l'ajustement de la courbe expérimentale par le modèle de micelle sphérique de copolymère donne une valeur de R<sub>s</sub> très proche de celle déterminée par le modèle de la sphère. Cependant, à cette température, quelle que soit la longueur des chaînes de PGA (une valeur de R<sub>g</sub> entre 1 et 5 nm), le facteur de forme obtenu dans la gamme de q observé ne change pas : il nous a été impossible d'améliorer la qualité de l'ajustement dans la gamme des grands q comme on peut l'observer sur la figure III-5. La diminution importante de l'intensité dans cette région de q est due à la forme sphérique des micelles. Cela signifie donc que l'intensité diffusée provenant des chaînes de PGA est négligeable et qu'elle est très majoritairement due aux cœurs sphériques des micelles. Le faible écart à la courbe expérimentale vient certainement de la contribution d'un signal incohérent. Les deux modèles sont donc équivalents pour décrire de façon satisfaisante les courbes expérimentales à 66°C.

A plus basse température (36°C), en revanche, le modèle de micelle sphérique de copolymère semble plus approprié pour ajuster les courbes expérimentales (figure III-5). Même si le rayon du cœur des micelles reste très proche, indépendamment du modèle, le nombre d'agrégation, quant à lui, varie énormément.

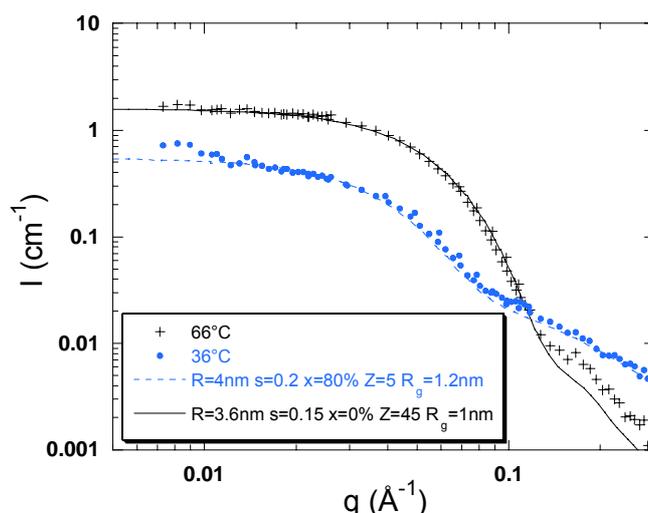


Figure III-5 : Intensité diffusée en SANS en fonction de  $q$  pour le copolymère Jeffamine-*b*-PGA<sub>30</sub> à différentes température ( $c=25$  mg/ml,  $pH=11$ ). Les courbes sont ajustées avec le modèle de Pedersen<sup>8,9</sup> de micelle de copolymères sphérique en introduisant le taux d'hydratation du cœur  $x$ .

En effet, la valeur déduite du meilleur ajustement est  $Z = 5$  et le taux d'hydratation est de 80%. Avec un nombre d'agrégation si petit et un taux d'hydratation si élevé, l'intensité du signal provenant du cœur des micelles est plus faible qu'à 66°C. A 36°C, la contribution des chaînes devient significative et affecte la forme de la courbe de diffusion aux grands  $q$ . Le meilleur ajustement de la courbe expérimentale a été obtenu pour une valeur de  $R_g = 1.3$ nm. On peut observer que le fit réalisé avec ce modèle décrit parfaitement la courbe expérimentale sur toute la gamme de  $q$ , contrairement au modèle de la sphère. Avec ce modèle plus adapté, on obtient un taux d'hydratation du cœur de 80% à 36°C, valeur plus importante que celle déduite de l'expression  $R_s$  par le modèle de la sphère.

De ces analyses réalisées à l'aide du modèle de micelle de copolymères sphérique, nous pouvons conclure que même si la formation de nanoparticules est détectable à 36°C, en particulier par DLS au dessus de la LCST de la Jeffamine (figure III-2), les agrégats sont néanmoins très hydratés avec un nombre d'agrégation très faible. Les micelles cœur-couronne sont obtenues à plus haute température avec un nombre d'agrégation constant.

Nos observations sur la déshydratation progressive des micelles avec la température sont en accord avec les précédents travaux de Hatton<sup>6,7</sup> et de ceux concernant les homopolymères comme le PVCL ou encore le PNIPAAm formant des mésoglobules.<sup>11,12</sup> Dans les travaux de Hatton, cependant, l'expulsion des molécules d'eau était accompagnée d'une augmentation du nombre d'agrégation des micelles, gardant ainsi la taille du cœur constante. Dans nos travaux, en revanche, la déshydratation s'accompagne d'une diminution de la taille des micelles qui tend à prouver que le nombre d'agrégation reste constant. De telles structures peuvent être qualifiées de « micelles mésoglobulaires » : elles possèdent à la fois les caractéristiques des micelles « classiques » (taille, nombre d'agrégation) et des mésoglobules en raison du changement du taux d'hydratation du cœur hydrophobe en fonction de la température.

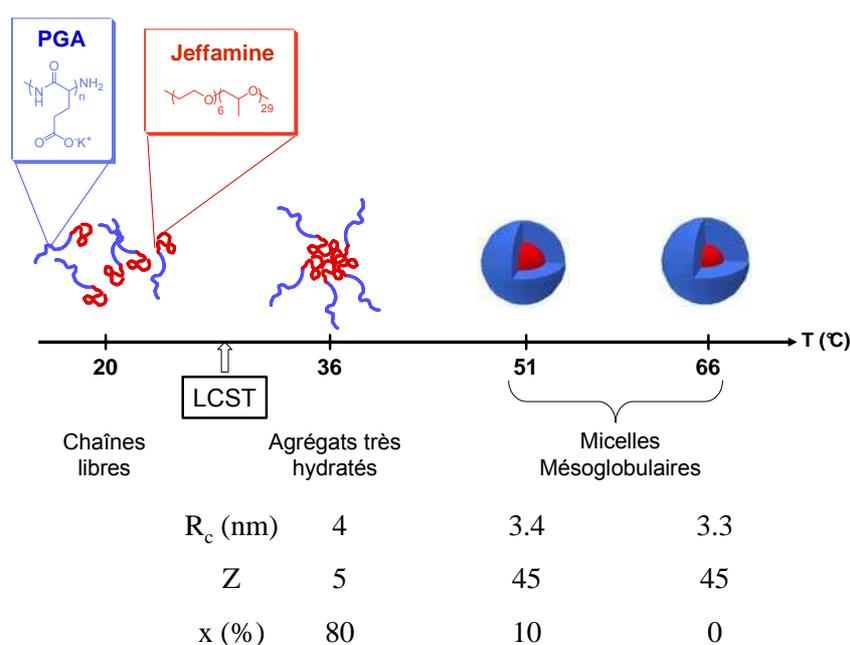
### A-3 Conclusion

Les études menées par DLS sur ce copolymère multistimulable à double blocs hydrophiles ont démontré le caractère thermosensible du bloc Jeffamine : pour des températures inférieures à sa LCST, ce CDBH est présent sous forme de chaînes libres en solution aqueuse alors que pour des températures supérieures, les blocs Jeffamine deviennent hydrophobes et le copolymère s'auto-assemble en micelles sphériques.

Ce comportement a ensuite été vérifié par des expériences de SANS. Le taux d'hydratation du cœur de ces micelles varie avec la température. En combinant les modèles de la sphère et de micelle sphérique de copolymère (Pedersen), les données expérimentales ont pu être ajustées et le taux d'hydratation quantifié. La taille du cœur des micelles diminue en augmentant la température, phénomène dû à la déshydratation de la Jeffamine. Les micelles sphériques sont complètement déshydratées à 66°C. Le comportement de ce système Jeffamine-*b*-PGA<sub>30</sub> en milieu aqueux en fonction de la température est représenté schématiquement dans le schéma III-3.

Cette étude a montré tout l'intérêt d'utiliser la technique de SANS pour caractériser de tels systèmes multistimulables. En effet, la formation de micelles bien définies est perçue en DLS pour des températures équivalentes à la LCST des blocs thermosensibles. La réalité est en fait différente, dans la mesure où la formation des micelles cœur-couronne bien définies n'a été observée que pour des températures plus élevées par SANS, technique qui nous permet d'avoir une image beaucoup plus précise de l'organisation du système.

En modulant l'hydrophilicité et l'hydrophobicité du cœur, de tels copolymères peuvent être utilisés, par exemple, dans des applications d'encapsulation de petites molécules (médicaments) dont les interactions avec le cœur pourraient être contrôlées en fonction de la température.



**Schéma III-3 : Formation des « micelles mésoglobulaires » avec la température pour le copolymère Jeffamine-*b*-PGA<sub>30</sub> (c=2.5% mas.) à pH11. Avec  $R_c$  le rayon du cœur des micelles, Z le nombre d'agrégation et x le taux d'hydratation**

## **B- Etude en milieu aqueux d'une nouvelle famille de copolymères à blocs « adaptatifs »**

L'étude porte ici sur le copolymère hybride à blocs amphiphiles PMADAME-*b*-PBLG. Ce système se compose de deux blocs dont on peut rapidement décrire les caractéristiques :

La PMADAME est un polymère hydrosoluble et multistimulable. En effet, elle est thermosensible avec une LCST aux alentours de 39°C à pH basique. Elle possède également des fonctions amines tertiaires protonables ce qui la rend sensible au pH ( $pK_a \sim 7$ ). Elle est aussi utilisée dans le domaine biomédical notamment pour sa capacité à complexer l'ADN.<sup>13</sup>

Le PBLG, quant à lui, est un polypeptide hydrophobe adoptant une conformation en hélice- $\alpha$  dans l'eau. Ce polymère est de plus en plus utilisé dans les biotechnologies.<sup>14</sup>

Nous nous sommes intéressés à ces copolymères à blocs car, en plus des ses propriétés singulières en milieu aqueux, il est aussi précurseur de deux autres CDBH. En effet :

La PMADAME est le précurseur du PSPE, un polymère zwitterionique thermosensible possédant une UCST vers 10°C.

Le PBLG est le précurseur du PGA, un des polypeptides les plus utilisés dans les applications médicales, notamment en tant que « conjugué ». Il est hydrosoluble, biodégradable, biocompatible et sensible au pH ( $pK_a \sim 4.1$ ) : il peut ainsi changer de structure secondaire en passant d'une conformation de pelote statistique à pH basique à une conformation en hélice- $\alpha$  à pH acide.

Cette deuxième partie va donc consacrer un volet à l'étude physico-chimique de chaque famille de copolymères, à savoir :

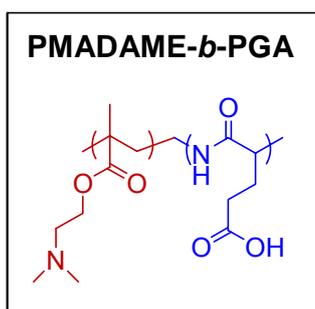
B-1) PMADAME-*b*-PGA

B-2) PSPE-*b*-PGA

B-3) PMADAME-*b*-PBLG

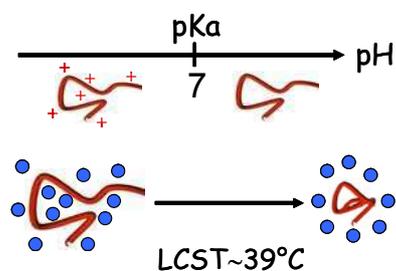
## B-1 Propriétés du copolymère à blocs PMADAME-*b*-PGA

Cette partie traite de l'étude en solution du copolymère multistimulable à double blocs hydrophiles : PMADAME-*b*-PGA. Les caractéristiques des deux blocs sont regroupées dans le schéma III-4. Ce système étant stimulable à la fois par effet de pH et de température, nous avons choisi de faire la distinction concernant le comportement de ce système dans l'eau en fonction de l'un ou de l'autre stimulus.



### Bloc multistimulable

- Sensible au pH : pKa~7
- Thermosensible : LCST~39°C à pH basique
- Complexant de l'ADN



### Bloc polypeptide

- Biocompatible
- Biodégradable
- Utilisé comme « conjugué »  
(avec la doxorubicine en particulier)
- Sensible au pH : pKa ~ 4.1
- Changement réversible  
de structure secondaire

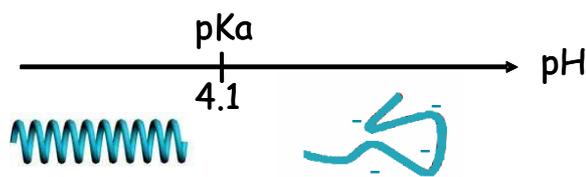


Schéma III-4 : Caractéristiques des copolymères à blocs PMADAME-*b*-PGA

La première partie est consacrée à l'étude en solution en fonction du pH. Pour cela, toutes les expériences ont été menées dans l'eau à 25°C.

La deuxième partie sera centrée sur le caractère thermostimulable du système. Nous étudierons les propriétés d'auto-assemblage en fonction de la température.

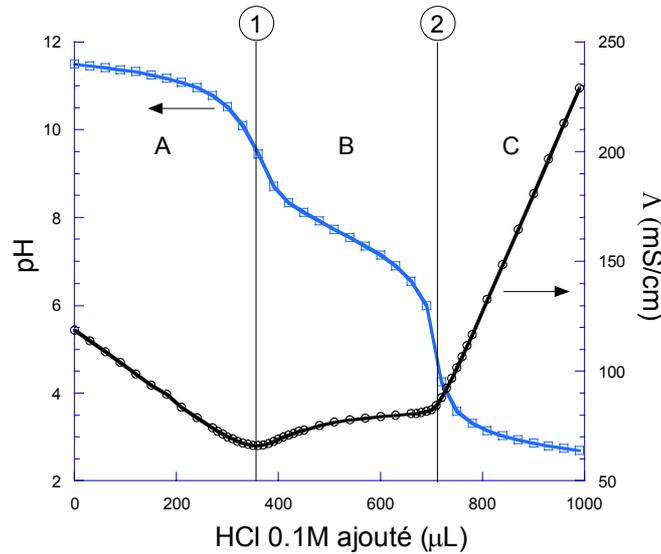
Trois copolymères à blocs de composition variables ont ainsi été synthétisés, avec comme unique différence la longueur du segment polypeptidique : PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PGA<sub>37</sub>, PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PGA<sub>77</sub>, PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PGA<sub>186</sub>.

Différentes techniques de caractérisation ont été utilisées pour vérifier la formation d'agrégats en milieu aqueux ainsi que leur morphologie : diffusion dynamique de la lumière (DLS), diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) et microscopie électronique en transmission (TEM).

### **B-1-1 Etude en fonction du pH**

Le polyampholyte PMADAME-*b*-PGA possède deux blocs ionisables donc tous deux sensibles au pH. En effet, le bloc PMADAME est chargé positivement à pH neutre et acide par protonation des amines tertiaires ; et le bloc PGA à pH neutre et basique se déprotonate et devient chargé négativement.

Nous avons tout d'abord réalisé un dosage pH-métrique et conductimétrique des trois composés afin de quantifier le nombre de fonctions ionisables. La figure III-7 montre l'évolution du pH et de la conductivité en fonction de la quantité d'acide chlorhydrique ajouté pour une solution aqueuse du copolymère PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PGA<sub>37</sub>.



**Figure III-7 : Dosage pH-métrique (carré bleu) et conductimétrique (rond noir) d'une solution aqueuse de PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PGA<sub>37</sub> (0.05% mas.) à 25°C.**

La conductivité et le pH sont mesurés séparément de façon à ce que les sels contenus dans la sonde du pH-mètre ne perturbent pas la conductivité de la solution de copolymères. Les espèces conductrices dans la solution de copolymères sont  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$  et les charges  $\text{COO}^-$  et  $\text{N}^+$  portées par le copolymère (cp). Par conséquent, la conductivité peut être exprimée de la façon suivante :

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

avec  $C_i$  la concentration en ions dans la solution et  $\lambda_i$  la conductivité molaire équivalente correspondant à chaque ion.

Durant le dosage, la concentration des espèces conductrices évolue à l'exception de celle des ions  $\text{Na}^+$  qui reste inchangée. En effet, la solution est d'abord placée dans des conditions basiques par ajout de NaOH en excès, puis dosée par une solution de HCl. On peut noter la présence de trois régions séparées par deux points d'inflexion 1 et 2 (figure III-7). La conductivité initiale de la solution de copolymères correspond à la présence des ions libres  $\text{Na}^+$  ( $\lambda_{\text{Na}^+} = 5.01\text{mS.m}^2.\text{mol}^{-1}$ ),  $\text{OH}^-$  ( $\lambda_{\text{OH}^-} = 19.86\text{mS.m}^2.\text{mol}^{-1}$ ) ainsi que les groupements carboxyliques des unités de PGA. L'ajout de HCl diminue la concentration en  $\text{OH}^-$  alors que la concentration en  $\text{Cl}^-$  augmente. Ceci se traduit par une diminution de la conductivité de la solution jusqu'au premier point d'inflexion (1) qui correspond à la fin du dosage des ions  $\text{OH}^-$  en excès et au début du dosage des fonctions amine des blocs PMADAME. A partir de ce point, la conductivité croît du fait de l'augmentation des ions  $\text{Cl}^-$  ( $\lambda_{\text{Cl}^-} = 7.63\text{mS.m}^2.\text{mol}^{-1}$ ) provoqué par l'ajout de HCl, tandis que les fonctions carboxyliques du PGA et amine du PMADAME se protonent. A partir du deuxième point d'inflexion (2), la conductivité de la solution augmente plus rapidement, ce qui signifie que les fonctions carboxyliques des blocs PGA sont entièrement protonées, rendant libres les ions  $\text{H}^+$  ( $\lambda_{\text{H}^+} = 34.98\text{mS.m}^2.\text{mol}^{-1}$ ).

On remarque une bonne concordance entre les deux types de dosages réalisés à masse constante. En revanche, le nombre de moles correspondant aux fonctions dosées (entre les deux points d'inflexion) ne coïncide pas avec le nombre de moles calculé par rapport aux DP des deux blocs obtenus par RMN (tableau III-3), les données expérimentales sont systématiquement inférieures aux valeurs théoriques. Durant le dosage, nous avons remarqué une gamme de pH pour laquelle la solution se trouble, pouvant correspondre à la formation d'agrégats en solution. Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, ce comportement est caractéristique d'une solution de polyampholytes.<sup>15</sup>

Copolymères	Fonctions à doser	Fonctions dosées
	(calculées)	( $\mu\text{mol}$ )
	( $\mu\text{mol}$ )	
PMADAME <sub>85</sub> - <i>b</i> -PGA <sub>37</sub>	33.7	22.0
PMADAME <sub>85</sub> - <i>b</i> -PGA <sub>77</sub>	34.8	18.5
PMADAME <sub>85</sub> - <i>b</i> -PGA <sub>186</sub>	36.3	25.0

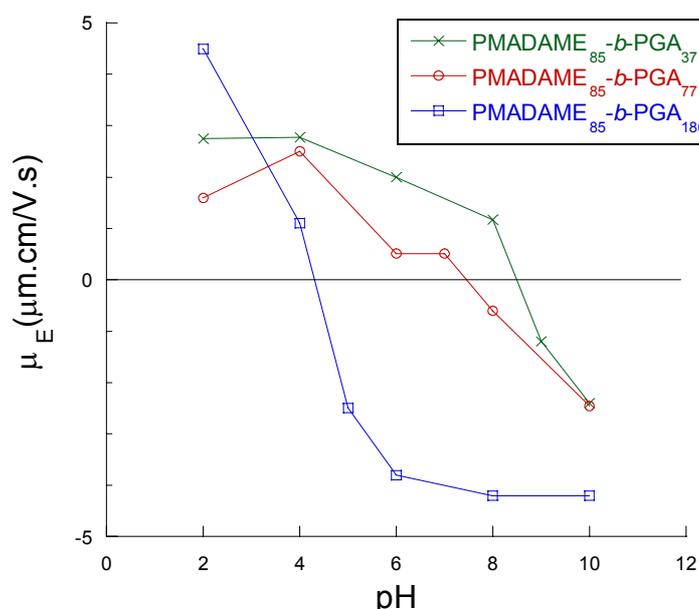
**Tableau III-3 : Récapitulatif des données extraites des différents dosages réalisés à masse constante**

Lorsque les deux blocs sont chargés (de manière opposée), les interactions électrostatiques présentes conduisent à l'agrégation du système. Concernant le dosage de ce type de système, la situation n'est pas aussi simple que pour des petites molécules acide ou basique. En effet, il a été démontré qu'il est difficile d'extraire des valeurs correctes des dosages réalisés proche du point isoélectrique du fait de l'insolubilité des chaînes de copolymères.<sup>16</sup> Aussi, l'ionisation des groupements acides et basiques dépend fortement des interactions avec les groupements voisins.<sup>17</sup> Par

conséquent, ceci explique les différences observées entre les valeurs théoriques et expérimentales concernant le nombre de fonctions à doser dans chacune des solutions de copolymères à blocs (tableau III-3).

Afin d'étudier plus en détails les trois composés en solution aqueuse, nous avons, dans un second temps, déterminé leur point isoélectrique (PI). Afin de minimiser l'erreur expérimentale, nous avons utilisé deux méthodes différentes dont les résultats pourront être comparés à ceux déterminés par une méthode de calcul théorique.

La première méthode expérimentale consiste à mesurer la mobilité électrophorétique ( $\mu_E$ ) des solutions des copolymères ( $c=0.05\%$  mas.) en fonction du pH. La loi de Henry, permettant d'accéder à la valeur du potentiel zêta ( $\zeta$ ), n'est valable que pour des particules sphériques, homogènes et monodisperses, ce qui n'est pas le cas dans notre pour certaines gammes de pH où les copolymères sont présents sous forme de chaînes libres. Par conséquent, seule la variation de  $\mu_E$  a été mesurée (figure III-8).

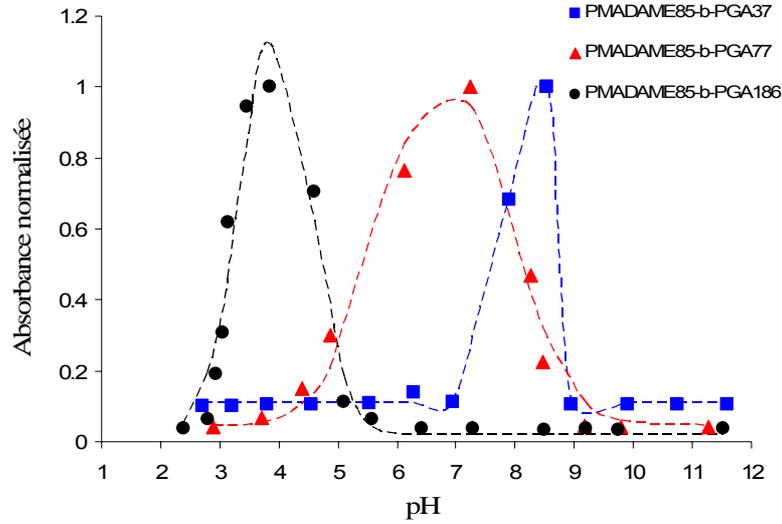


**Figure III-8 : Mobilité électrophorétique ( $\mu_E$ ) mesurée en fonction du pH pour des solutions aqueuses de copolymères PMADAME-b-PGA ( $c= 0.05\%$  mas.) à 25 °C sans sel ajouté.**

Pour des valeurs de pH inférieures au PI, les agrégats formés par les copolymères PMADAME-b-PGA sont stabilisés par des charges positives provenant des blocs PMADAME. Au PI, la charge globale est nulle car les charges opposées portées par les deux blocs se compensent. Enfin, cette charge devient négative pour des valeurs de pH supérieures au PI.

La deuxième méthode consiste à considérer comme PI le pH correspondant à la valeur centrale de la zone de précipitation. Dans notre étude, cette région a été déterminée grâce à des mesures de turbidité en mesurant l'absorbance à  $\lambda=550\text{nm}$  de solutions des trois copolymères

(c=0.1% mas.) dans l'eau, comme le montre la figure III-9. Nous avons ajusté les résultats expérimentaux avec une courbe de distribution gaussienne dont la moyenne représente le PI.



**Figure III-9 : Mesures d'absorbance UV-visible ( $\lambda=550$  nm) des copolymères à blocs PMADAME-b-PGA à différentes valeurs de pH et ajustées avec une courbe de distribution gaussienne.**

La méthode théorique, quant à elle, consiste à utiliser les équations développées par Patrickios et coll.<sup>18</sup>

Concernant les polyampholytes riches en fonctions acides, nous utiliserons l'équation :

$$pH_{PI} = pKa_{PGA} - \log \left[ \frac{R}{2} \left\{ -\frac{1-R}{R} + \left( \left( \frac{1-R}{R} \right)^2 + \frac{4}{R} 10^{(pKa_{PGA} - pKa_{PMADAME})} \right)^{1/2} \right\} \right]$$

Pour les polyampholytes contenant une majorité de fonctions basique, l'équation est :

$$pH_{PI} = pKa_{PMADAME} + \log \left[ \frac{1}{2} \left\{ \frac{1-R}{R} + \left( \left( \frac{1-R}{R} \right)^2 + \frac{4}{R} 10^{(pKa_{PGA} - pKa_{PMADAME})} \right)^{1/2} \right\} \right]$$

Dans ces équations, R est le rapport molaire entre les fonctions acides et basiques,  $pKa_{PGA} = 4.1$  et  $pKa_{PMADAME} = 7$ .

Le tableau III-4 rassemble les valeurs des PI obtenues par ces trois méthodes. L'agrégation des chaînes provenant des interactions électrostatiques entre les blocs explique les faibles différences observées entre les valeurs expérimentales et théoriques. On peut aussi noter qu'il est possible d'obtenir une valeur de PI sur une large gamme de pH pour un même copolymère à blocs : il suffit, en effet, de jouer sur la taille des blocs. Concernant nos copolymères, le PI varie environ de 4 à 8 en fonction de la longueur du bloc PGA.

composition	PI <sup>a</sup>	PI <sup>b</sup>	PI <sup>c</sup>
PMADAME <sub>x</sub> -b-PGA <sub>y</sub>			
PMADAME <sub>85</sub> -b-PGA <sub>37</sub>	8.5	8.2	7.1
PMADAME <sub>85</sub> -b-PGA <sub>77</sub>	7.8	6.8	6.1
PMADAME <sub>85</sub> -b-PGA <sub>186</sub>	4.5	3.9	4

a) PI déterminé par des mesures de potentiel zêta. b) PI déterminé par des mesures d'absorbance à  $\lambda=550\text{nm}$ . c) PI calculé à partir des équations théoriques.

**Tableau III-4 : Valeurs des PI déterminés par les différentes méthodes expérimentales et théorique pour les copolymères PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>37</sub>, PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>77</sub> et PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>186</sub>.**

L'intensité diffusée et la taille des agrégats formés par les trois copolymères dans l'eau ont été mesurées par diffusion de la lumière. En comparant ces résultats avec ceux obtenus lors de l'étude en absorbance, nous observons que les trois copolymères possèdent des comportements similaires en fonction du pH. On distingue en effet trois régions différentes (notées A, B, C sur la figure III-10).

Pour des valeurs de pH supérieures au PI (région C), les tailles ainsi que l'absorbance mesurées sont très faibles. En effet, dans cette gamme de pH, le bloc PGA est déprotoné alors que le bloc PMADAME est neutre mais reste cependant soluble car les mesures ont été réalisées à 25°C, c'est-à-dire en dessous de la LCST. Ainsi, les deux blocs constituant les copolymères étant solubles, ces derniers se présentent sous la forme de chaînes libres en solution.

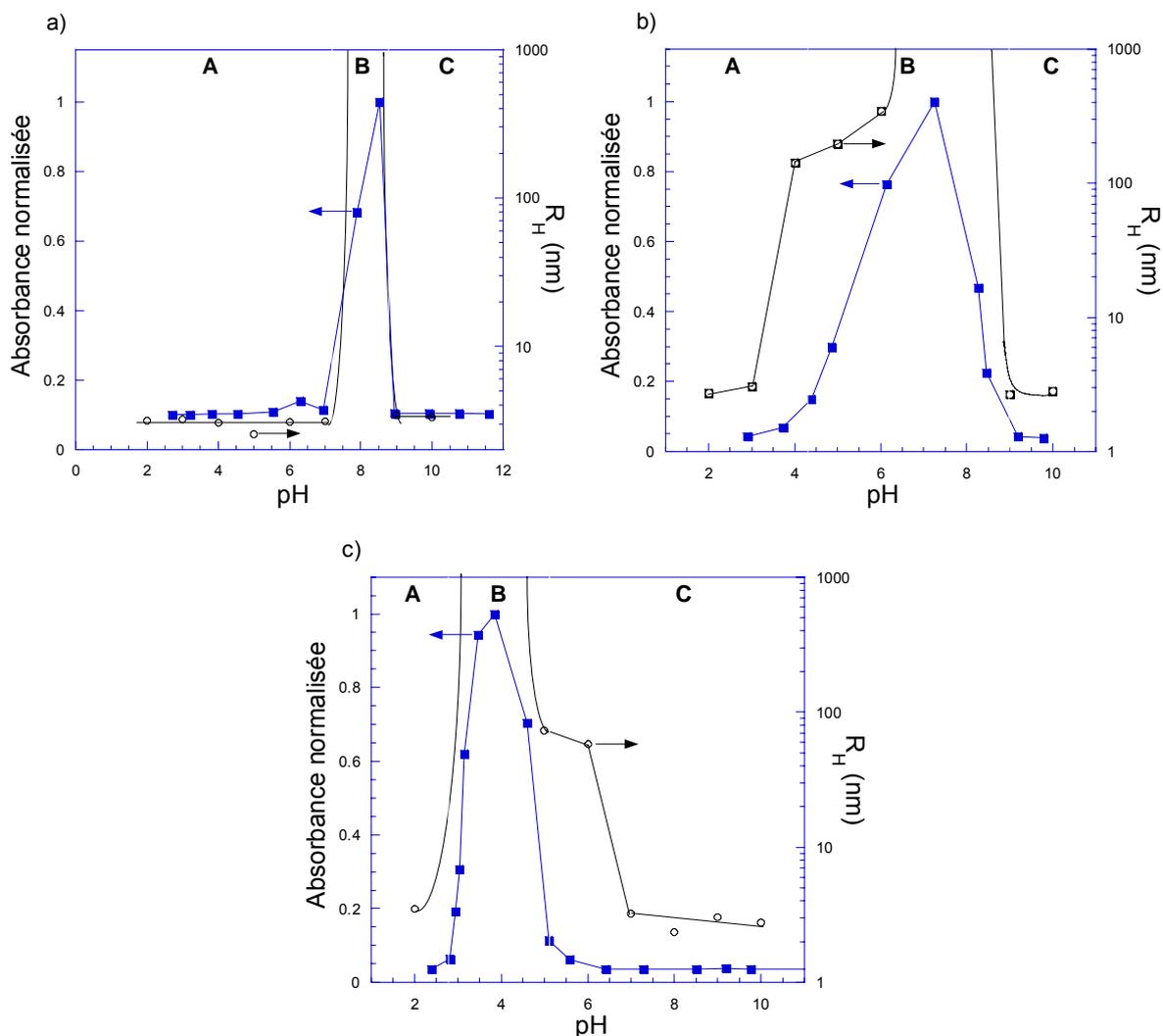
Pour des valeurs de pH inférieures à leur PI (région A), on observe le même comportement que précédemment ce qui peut paraître surprenant dans la mesure où dans cette gamme de pH, le PGA est protoné et donc dans une conformation d'hélice- $\alpha$ . Nous avons montré dans la partie bibliographique l'intérêt d'incorporer un bloc polypeptidique dans un copolymère à blocs. Ces polymères apportent, de part leur changement de structure secondaire de pelote statistique à hélice- $\alpha$ , la rigidité nécessaire au système pour s'auto-assembler sous forme de phase lamellaire conduisant, dans la plupart des cas, à l'obtention de vésicules. Ici, nous n'observons que des tailles correspondant à des chaînes libres. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce comportement original :

(i) le bloc PMADAME, très hydrophile à pH acide du fait de la protonation des amines tertiaires, permet la solubilisation des copolymères sous forme de chaînes libres

(ii) L'étude du système PNIPAAm-b-PGA par Liu et coll.<sup>19</sup> a montré la formation de micelles à pH acide dont le cœur est formé par les blocs PGA. Ce système est sensiblement le même que le nôtre à l'exception du bloc thermosensible qui dans notre cas est chargé. Par conséquent, il existe peut-être des interactions entre le bloc PMADAME chargé et le bloc PGA empêchant le changement

de conformation de ce dernier. Des mesures de dichroïsme circulaire pourraient nous permettre de vérifier cette hypothèse.<sup>a</sup>

Enfin, dans la gamme de pH intermédiaire (région B), nous observons une nette augmentation à la fois de l'intensité diffusée et de l'absorbance. Ici, les deux blocs sont chargés, négativement pour le PGA et positivement pour la PMADAME. Les interactions électrostatiques entre ces segments ionisés entraînent la formation de très gros agrégats dont la taille, trop importante, ne peut être mesurée par diffusion de la lumière.



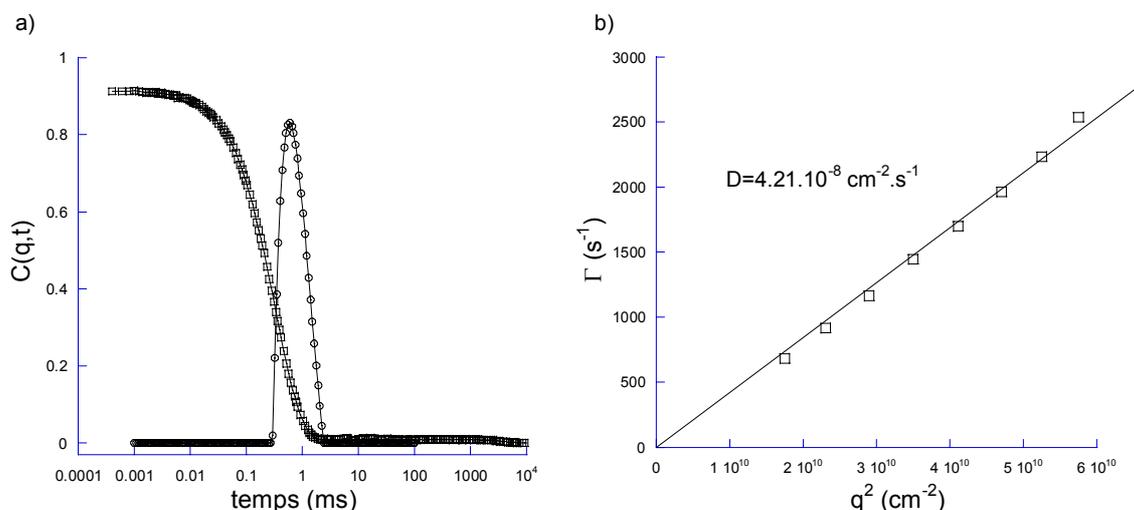
**Figure III-10 : Tailles mesurées par DLS (rond noir) et absorbance déterminée à  $\lambda=550\text{nm}$  (carré bleu) pour les solutions de copolymères a)  $\text{PMADAME}_{85}\text{-b-PGA}_{37}$ , b)  $\text{PMADAME}_{85}\text{-b-PGA}_{77}$ , c)  $\text{PMADAME}_{85}\text{-b-PGA}_{186}$  dans l'eau ( $c=0.1\%$  mas.) à  $25^\circ\text{C}$ .**

<sup>a</sup> Nous n'avons malheureusement pas pu effectuer les mesures de dichroïsme circulaire dans la mesure où le seul appareil de l'Université Bordeaux 1 mis à notre disposition était hors service durant les six derniers mois de ma thèse.

On distingue néanmoins des valeurs de pH, notamment pour les copolymères PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>77</sub> et PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>186</sub>, pour lesquels les tailles mesurées sont de l'ordre de la centaine de nanomètres. Nous nous sommes donc focalisés sur 4 situations particulières : PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>186</sub> à pH=6.2 ainsi que PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>77</sub> à pH=4, 5 et 6 en menant des études complémentaires de DLS et de TEM afin de déterminer la morphologie des agrégats formés en solution.

### B-1-1-1 Etude à pH=6.2

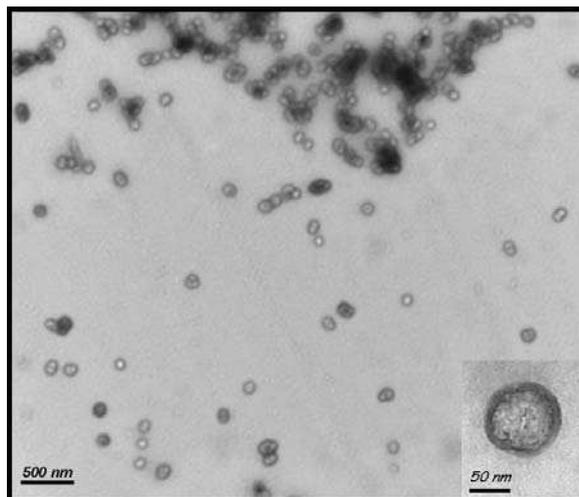
Nous avons tout d'abord étudié le copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>186</sub> dans l'eau à pH=6.2 par DLS à différents angles. La figure III-11 montre la distribution du temps de relaxation (a) ainsi que la dépendance angulaire (b) de PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>186</sub> à pH=6.2 (c=0.1% wt) à 25°C.



**Figure III-11 : a) Fonction d'auto-corrélation  $C(q,t)$  et distribution du temps de relaxation  $G(t)$  (Contin) pour  $\Theta=90^\circ$  et b) Fréquence de relaxation en fonction de  $q^2$ , pour une solution de copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>186</sub> dans l'eau à pH=6.2 (c=0.1% mas.) à 25°C.**

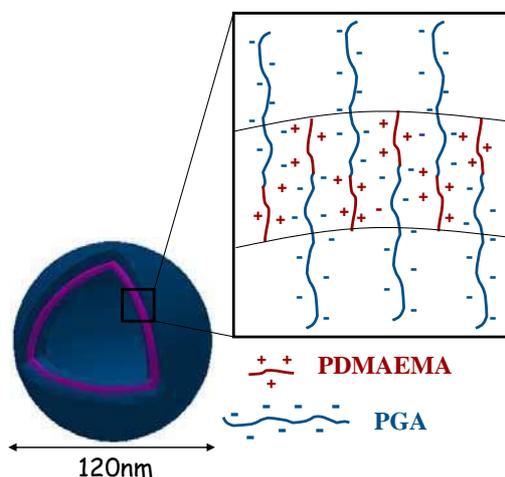
On note une distribution unique et monodisperse ( $\sigma=0.1$ ) des temps de relaxation. L'évolution linéaire de la fréquence de relaxation avec  $q^2$  traduit la présence d'un mode diffusif, indiquant que les agrégats concernés sont sphériques et homogènes en taille. La taille mesurée grâce à cette technique est  $R_H=60\text{nm}$ . Afin de mieux comprendre ce phénomène d'agrégation dans cette gamme de pH, nous avons tenté de visualiser les structures obtenues par microscopie électronique en transmission (TEM). En effet, cette technique, à travers l'observation directe des échantillons, permet de déterminer sans ambiguïté les morphologies obtenues après modification du pH.

La figure III-12 montre le cliché obtenu par TEM pour le copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>186</sub> à pH=6.2. On observe très distinctement la présence de vésicules sur la surface de la grille, dont la taille est comparable à celle mesurée par DLS.



**Figure III-12 : Cliché de microscopie électronique en transmission des agrégats de  $PMADAME_{85}$ - $b$ - $PGA_{186}$  à  $pH=6.2$ .**

Les deux blocs étant hydrophiles à ce pH, l'auto-assemblage ne peut être régi que par les interactions électrostatiques entre les blocs de charges opposées. Le PI du  $PMADAME_{85}$ - $b$ - $PGA_{186}$  est d'environ 4.5 (figure III-8), ce qui signifie qu'à  $pH = 6.2$ , les agrégats formés sont stabilisés par un excès de charges négatives. En effet, à cette valeur de pH, le bloc PMADAME est partiellement protoné alors que le long bloc PGA est presque entièrement déprotoné. Par conséquent, les interactions électrostatiques entre les charges opposées portées par les deux blocs conduisent à la formation de la membrane hydrophobe de la vésicule électrostatique, cette dernière étant stabilisée par l'excès de charges négatives du bloc PGA. Le schéma III-5 illustre cette structure vésiculaire.



**Schéma III-5 : représentation schématique des vésicules électrostatiques formées par le copolymère  $PMADAME_{85}$ - $b$ - $PGA_{186}$  à  $pH=6.2$  ( $c=0.1\%$  mas.) à  $25^{\circ}C$ .**

De telles vésicules électrostatiques ont déjà été observées pour un copolymère asymétrique  $PMAA_{49}$ - $b$ - $PMADAME_{11}$  au-delà de son PI.<sup>20</sup>

Afin de démontrer que les interactions électrostatiques sont la force motrice de l'auto-assemblage des copolymères chargés, nous avons étudié l'influence de l'ajout de sel sur les agrégats

formés. Nous avons ainsi progressivement ajouté du NaCl en mesurant l'intensité diffusée par DLS après chaque addition (figure III-13).

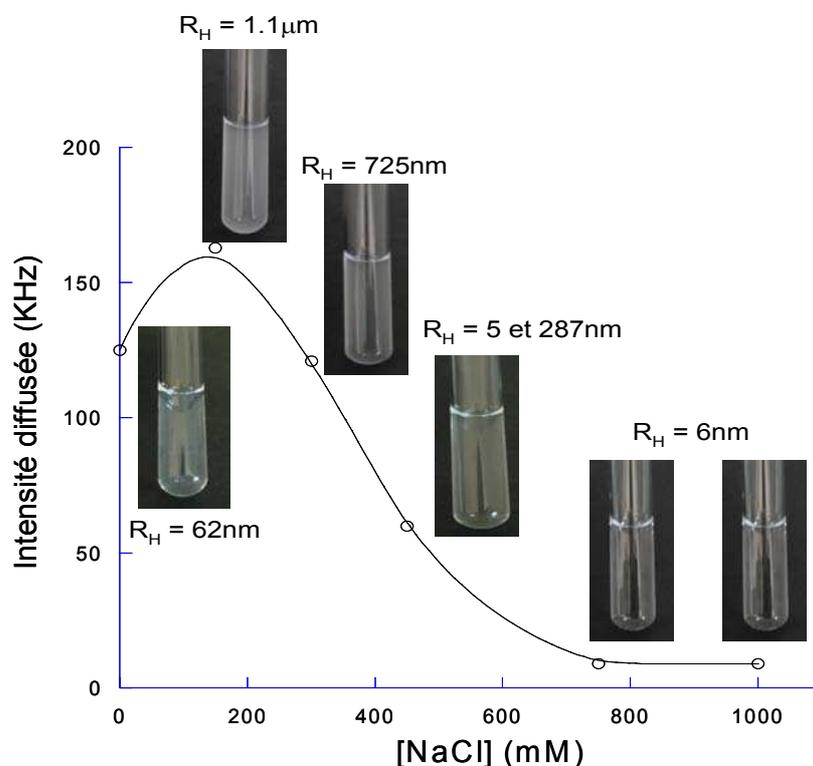


Figure III-13 : Influence de la présence de NaCl sur l'intensité diffusée par le système PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>186</sub> (c=0.1% mas.) à pH=6.2 à 25°C.

Pour de faibles concentrations en sel, on remarque que l'intensité augmente avec la turbidité de la solution. Au-delà de cette valeur limite (~200mM), l'intensité diminue progressivement jusqu'à environ 750mM où elle n'évolue plus.

Dans un premier temps, les sels vont écranter les charges négatives libres des blocs PGA formant la couronne stabilisante. Ainsi, à 150mM de NaCl, la longueur de Debye diminue et la couronne ne permet plus une stabilisation suffisante des nanoparticules. L'augmentation de l'intensité est sans doute due à l'agrégation de certaines vésicules entre elles formant des agrégats de plus grande taille. A 300mM, l'intensité diffusée diminue ainsi que la turbidité de la solution, signe que les sels parviennent à écranter les interactions électrostatiques intermoléculaires permettant la formation de la membrane des vésicules. Ces dernières commencent donc à se déstructurer, d'autant plus que l'on augmente la concentration en sel. A 450mM, la solution n'est plus que très légèrement turbide avec des agrégats mal définis traduisant la présence de quelques interactions résiduelles entre les différents blocs. Enfin, 750mM de NaCl permet un écrantage total des charges avec l'obtention d'une solution limpide impliquant la présence de chaînes libres en solution, phénomène mettant en évidence la réversibilité de la complexation.

### B-1-1-2 Etude à pH=4, pH=5, pH=6

Ces mêmes études ont également été menées sur le copolymère symétrique PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>77</sub> à différents pH : 4, 5 et 6. Les tailles obtenues par DLS pour ces trois valeurs de pH varient entre 100 et 300nm. La figure III-14 montre les courbes d'auto-corrélation ainsi que la distribution des temps de relaxation (Contin) mesurées par DLS à  $\theta=90^\circ$ . On observe dans chaque cas, une distribution des tailles étroite et monomodale laissant penser que les agrégats formés à de tels pH sont bien définis.

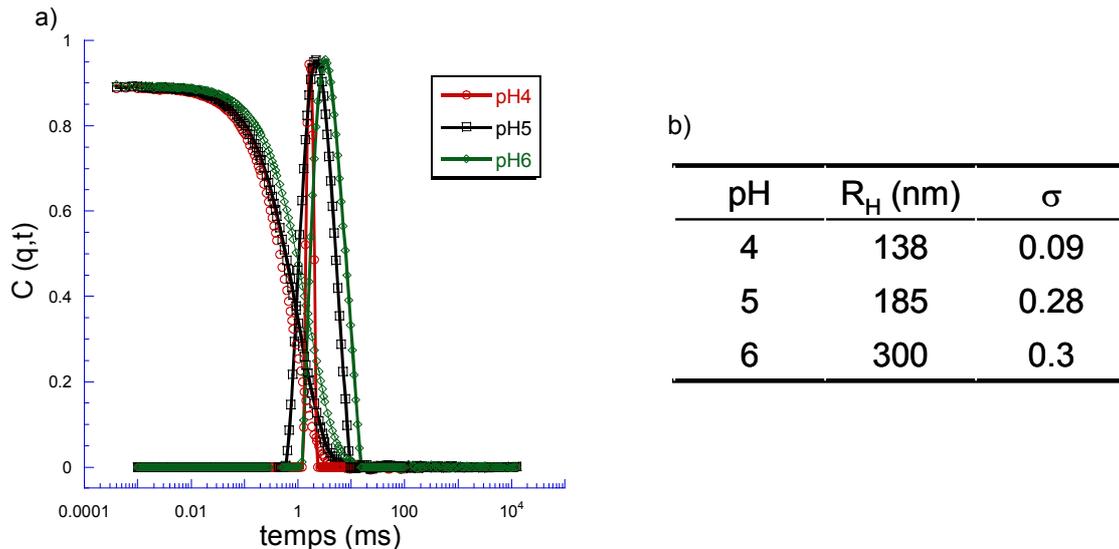


Figure III-14 :a) Fonctions d'auto-corrélation et distributions des temps de relaxation (Contin) pour les solutions du copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>77</sub> ( $c=0.1\%$  mas.) à pH4, pH=5 et pH=6. b) Caractéristiques des agrégats formés à pH=4, 5 et 6 pour le copolymère 85-b-77 (avec  $\sigma$  la polydispersité)

Nous avons également réalisé des expériences de TEM pour visualiser les structures obtenues. La figure III-15 montre les clichés obtenus par TEM pour le copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>77</sub> aux différents pH : 4, 5 et 6. La figure III-15 montre clairement la présence d'agrégats de morphologie vésiculaire pour les trois valeurs de pH. A pH = 6 tout d'abord, on observe un mélange de vésicules et d'agrégats polydisperses de grandes tailles. Lorsqu'on diminue le pH (pH = 5), les gros agrégats ont disparu laissant place uniquement à des vésicules moyennement dispersées. Enfin à pH = 4, les vésicules observées sont monodisperses en taille et très bien définies.

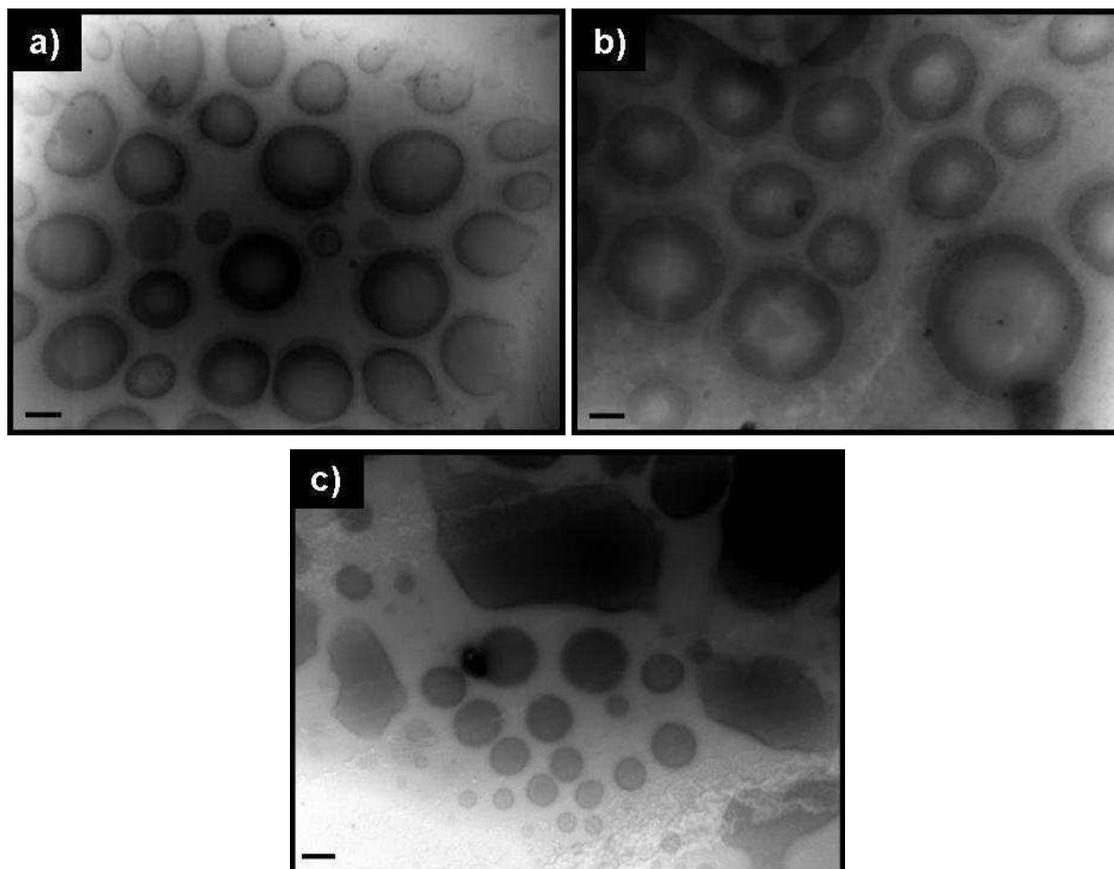


Figure III-15 : Clichés de microscopie électronique en transmission des agrégats de  $PMADAME_{85}\text{-}b\text{-}PGA_{77}$  : a)  $pH=4$ , b)  $pH=5$ , c)  $pH=6$ . Le trait représente 200nm.

Comme pour le système  $PMADAME_{85}\text{-}b\text{-}PGA_{186}$  à  $pH = 6.2$ , nous sommes donc en présence de vésicules électrostatiques dont la membrane hydrophobe est formée par les interactions électrostatiques entre les blocs PGA chargés négativement et les segments PMADAME chargés positivement. Ici, les vésicules sont stabilisées par un excès de charges positives, le PI du  $PMADAME_{85}\text{-}b\text{-}PGA_{77}$  se situant aux alentours de  $pH = 7$ . Afin de rendre compte des différences de taille des nanoparticules observées à  $pH = 4, 5$  et  $6$ , nous avons représenté sur le schéma III-6 la conformation attendue des chaînes de copolymères avec leurs charges.

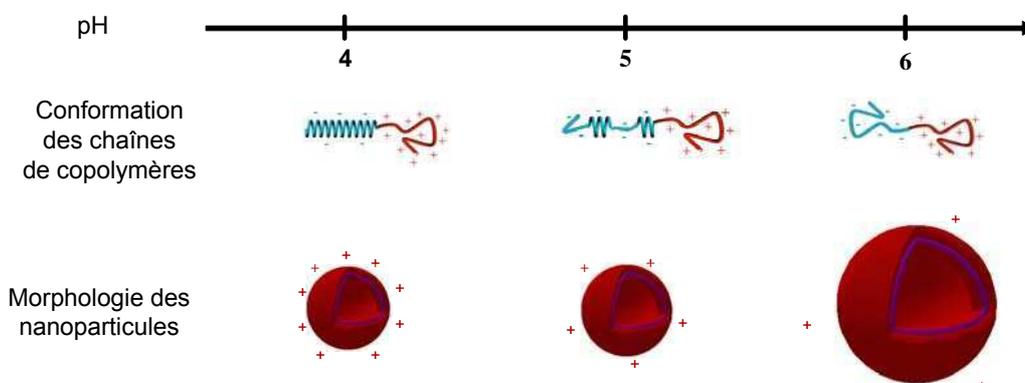


Schéma III-6 : Conformation des chaînes de copolymère  $PMADAME_{85}\text{-}b\text{-}PGA_{77}$  et la morphologie des agrégats en fonction du  $pH$ .

Les agrégats formés pour des valeurs de pH inférieures à 7 ont une charge globale positive. A pH=7, les charges positives portés par la PMADAME et les charges négatives portés par le PGA se compensent, la charge globale étant égale à 0. Au fur et à mesure que l'on diminue le pH, les deux blocs vont se protoner rendant l'excès de charges positives d'autant plus grand que le pH est faible.

Ainsi, peut-on supposer qu'à pH=6, le trop faible excès des charges positives ne permet pas une stabilisation suffisante des nanoparticules formées lors de la complexation électrostatique entre les deux blocs, expliquant la présence d'agrégats de plus grandes tailles qu'à pH = 5 ou 4. En effet, à pH = 5, et encore plus à pH = 4, l'excès de charges positives est plus important et suffisant pour atteindre plus rapidement un état d'équilibre conduisant à des tailles de nanoparticules plus petites et mieux définies.

Comme nous l'avons vu précédemment, il a déjà été montré que des systèmes asymétriques peuvent former des vésicules électrostatiques. Cependant, c'est à notre connaissance la première fois que de telles morphologies sont obtenues à partir de copolymères ampholytes symétriques. Ceci peut être expliqué par la présence du bloc PGA qui dans la gamme de pH d'intérêt (4 à 6) subit un changement de conformation de pelote statistique (pH = 6) à hélice- $\alpha$  (pH = 4).<sup>21</sup> Ainsi, la présence de ces bâtonnets permettrait une meilleure stabilisation des nanoparticules sous forme de vésicules. Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure de prouver ces hypothèses et des mesures de dichroïsme circulaire aurait été nécessaire pour confirmer ce changement de conformation.<sup>b</sup>

#### ***B-1-2 Etude en fonction de la température***

La mise en solution est la même pour les différents copolymères PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PGA<sub>37</sub>, PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PGA<sub>77</sub> et PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PGA<sub>186</sub> ainsi que pour l'homopolymère PMADAME<sub>85</sub>. Elle se fait en milieu basique (pH=11) de façon à neutraliser le bloc PMADAME et ainsi éviter les interactions électrostatiques, à une température inférieure à la LCST de la PMADAME, c'est à dire à l'ambiante (25°C). Ces conditions assurent une solubilisation des deux blocs comme en atteste la faible intensité diffusée à cette température (figure III-16). L'évolution de l'intensité diffusée en fonction de la température a été déterminée par diffusion de la lumière (montée à 2°C/min) pour les quatre composés à pH 11 (figure III-16).

---

<sup>b</sup> Pour les mêmes raisons que précédemment, nous n'avons pas pu réaliser les mesures de dichroïsme circulaire.

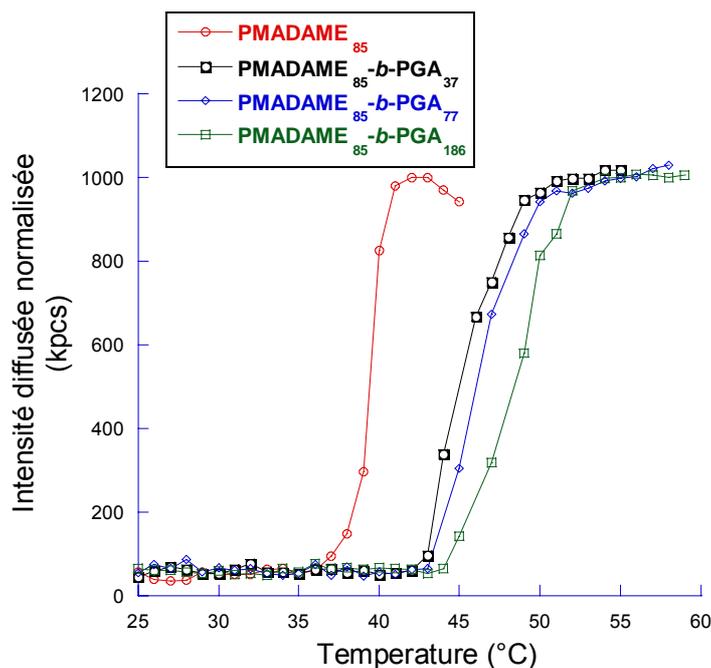


Figure III-16 : Evolution de l'intensité diffusée en fonction de la température pour les solutions de  $PMADAME_{85}$ ,  $PMADAME_{85-b-PGA_{37}}$ ,  $PMADAME_{85-b-PGA_{77}}$  et  $PMADAME_{85-b-PGA_{186}}$  ( $c=0.1\%$  mas.) à  $pH=11$ .

On peut noter, tout d'abord, que le comportement en température des trois copolymères à blocs est similaire à celui de l'homopolymère PMADAME. En effet, l'intensité diffusée augmente brusquement à partir d'une certaine température puis se stabilise. Lorsqu'on dépasse la température critique, l'énergie apportée est suffisante pour rompre les liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et les chaînes de PMADAME qui, par conséquent, précipitent induisant la formation d'agrégats. La température critique a été déterminée comme étant la température à mi-hauteur de l'intensité maximale. De plus, la présence d'un bloc hydrophile de PGA, induit une augmentation de la LCST de la PMADAME, en accord avec les données de la littérature<sup>22</sup> (cf chapitre bibliographique A-1-5-1-1-6). Ainsi, plus le bloc PGA est long et plus la LCST de la PMADAME est importante : 44°C pour  $PMADAME_{85-b-PGA_{37}}$ , 46°C pour  $PMADAME_{85-b-PGA_{77}}$  et 48°C pour  $PMADAME_{85-b-PGA_{186}}$ .

Un autre moyen pour faire varier la LCST de la PMADAME est de jouer sur la valeur du pH. Comme nous l'avons vu précédemment, ce polymère possède des amine tertiaires latérales qui, en fonction du pH, se protonent modifiant la valeur de la LCST. La figure III-17 représente les valeurs de LCST déterminées pour les différents composés par DLS en fonction du pH.

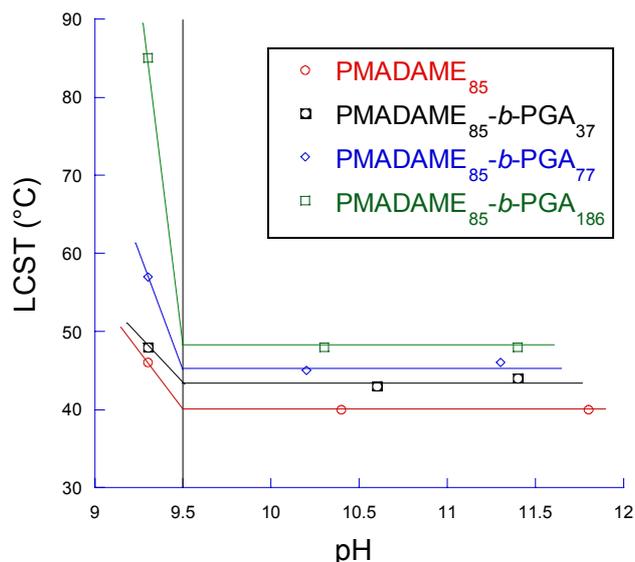


Figure III-17 : LCST déterminées par DLS de solutions aqueuses ( $c=0.1\%$  mas.) de :  $PMADAME_{85}$ ,  $PMADAME_{85}$ -b-PGA<sub>37</sub>,  $PMADAME_{85}$ -b-PGA<sub>77</sub>,  $PMADAME_{85}$ -b-PGA<sub>186</sub> en fonction du pH sans sel ajouté.

Si on s'intéresse uniquement à la variation de la LCST en fonction du pH, on peut remarquer deux zones distinctes. Pour des valeurs supérieures à 9.5, le pH n'a pas d'influence sur la LCST de la  $PMADAME_{85}$ . A des pH plus faibles, on note une nette augmentation de la LCST pour les quatre solutions. Afin de mieux comprendre ces comportements, nous avons réalisé le dosage pH-métrique de ce polymère ( $PMADAME_{85}$ ) et ainsi déterminé son degré d'ionisation en fonction du pH (Figure III-18). L'homopolymère  $PMADAME_{85}$  est chargé pour des  $pH < 9.5$  ; au-delà, il est neutre. Ainsi, la présence d'unités monomères chargées améliore la solubilité des chaînes, par conséquent, augmente la LCST et ce, même pour des degrés d'ionisation très faibles. En effet, les mesures ont été réalisées à  $pH=9.3$ , où seulement 1% des amine tertiaires sont protonées.

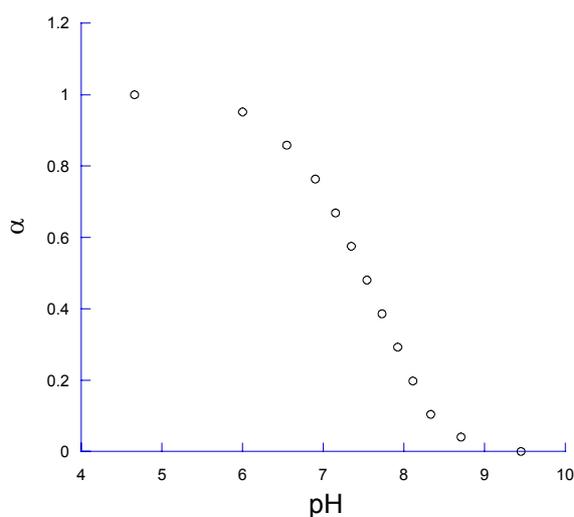
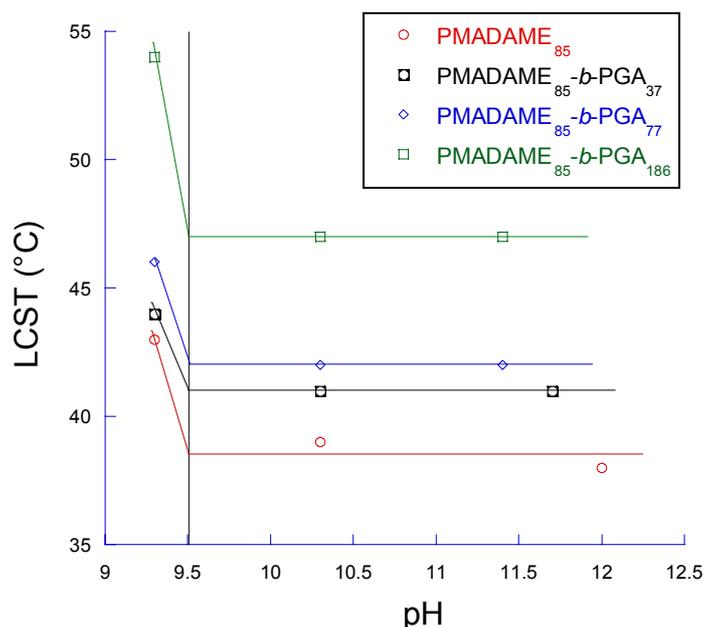


Figure III-18 : Evolution du degré d'ionisation  $\alpha$  en fonction du pH pour une solution aqueuse de  $PMADAME_{85}$  (0.5 g/L)

On remarque également que plus le bloc hydrophile (PGA) est long, plus la LCST augmente. Pour des  $\text{pH} > 9.5$ , on observe une hausse de  $8^\circ\text{C}$  entre l'homopolymère et le copolymère ayant le plus long bloc PGA ( $\text{PMADAME}_{85}\text{-}b\text{-PGA}_{186}$ ). En revanche, à  $\text{pH} = 9.3$ , la température critique augmente de près de  $40^\circ\text{C}$  entre ces deux copolymères. Il apparaît ainsi clairement que la présence du bloc PGA a plus d'influence sur la LCST dans une gamme de  $\text{pH}$  où la PMADAME est chargée ; il ne nous est toutefois pas possible d'en expliquer clairement la raison.

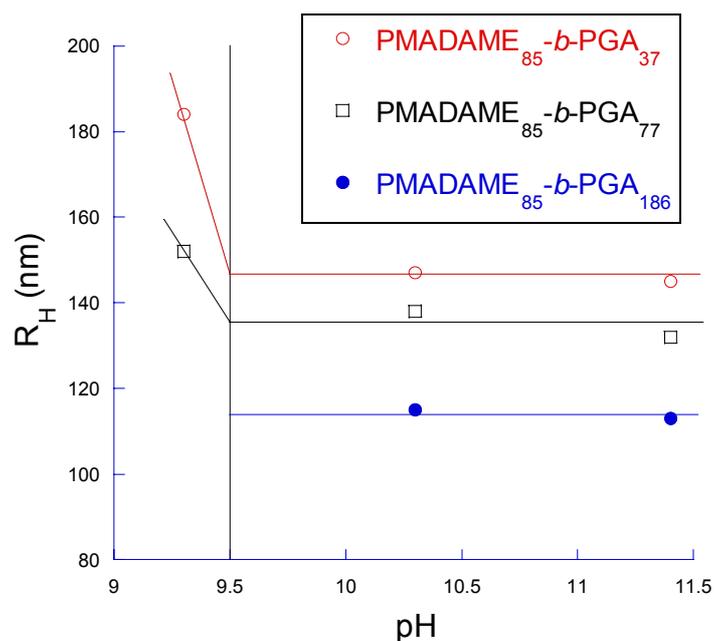
Afin d'étudier l'influence de la force ionique, autre paramètre pouvant jouer sur le LCST, nous avons réalisé les mêmes expériences en présence de  $150\text{mM}$  de NaCl (figure III-19).



**Figure III-19 : LCST déterminées par DLS de solutions aqueuses ( $c=0.1\%$  mas.) de :  $\text{PMADAME}_{85}$ ,  $\text{PMADAME}_{85}\text{-}b\text{-PGA}_{37}$ ,  $\text{PMADAME}_{85}\text{-}b\text{-PGA}_{77}$ ,  $\text{PMADAME}_{85}\text{-}b\text{-PGA}_{186}$  en fonction du  $\text{pH}$  en présence de  $150\text{mM}$  de NaCl.**

L'allure des différentes courbes obtenues est similaire à celles réalisées sans la présence de sel. Cependant, on peut noter que la valeur des températures critiques est inférieure en raison de l'écrantage des charges qui entraîne une diminution de la solubilité des chaînes et donc un abaissement de la LCST.

Des mesures par DLS des solutions de copolymères ont ensuite été réalisées à différents  $\text{pH}$  pour étudier l'influence de ce paramètre sur la taille des agrégats formés à haute température. Afin de pouvoir comparer les différents résultats, nous avons réalisé ces mesures  $10^\circ\text{C}$  au-delà de la température critique de chaque échantillon (figure III-20).



**Figure III-20 : Evolution de la taille des agrégats formés à  $T=LCST+10^{\circ}C$  pour les systèmes  $PMADAME_{85}-b-PGA_{37}$ ,  $PMADAME_{85}-b-PGA_{77}$  et  $PMADAME_{85}-b-PGA_{186}$  (0.1% mas.) en fonction du pH sans sel ajouté.**

On note que le pH n'a pas d'influence sur la taille des nanoparticules formées dans la gamme où les blocs de PMADAME ne sont pas protonés ( $pH > 9.5$ ). En revanche, on remarque une augmentation significative à  $pH=9.3$  pour les deux copolymères  $PMADAME_{85}-b-PGA_{37}$  et  $PMADAME_{85}-b-PGA_{77}$ , le dernier ( $PMADAME_{85}-b-PGA_{186}$ ) n'ayant pas pu être mesuré expérimentalement ( $LCST+10^{\circ}C = 95^{\circ}C$ ). Il semble évident que l'ionisation partielle ( $\sim 1\%$ ) des fonctions amine des segments PMADAME tend à augmenter la taille des agrégats formés. En effet, l'effet hydrophobe au sein du cœur des nanoparticules est de ce fait moins marqué et donc leur conformation à haute température est moins compacte ce qui se traduit par une taille globale des nano-objets mesurée plus importante.

Nos investigations sur ce phénomène d'agrégation à haute température ont été poursuivies en essayant de déduire la morphologie des agrégats formés. Ces expériences ont été réalisées à  $pH = 11$  pour deux raisons : (i) cela permet de s'affranchir des charges portées par la PMADAME, et par conséquent des interactions électrostatiques entre les deux blocs, ce qui rend le système plus simple à étudier ; (ii) les températures critiques déterminées pour cette valeur de pH sont les plus basses ce qui permet de travailler dans des conditions expérimentales plus accessibles.

Une méthode de choix pour mieux comprendre ce phénomène d'agrégation est la RMN  $^1H$  en température. Des mesures ont ainsi été réalisées sur le système  $PMADAME_{85}-b-PGA_{77}$  à  $pH=11$  à différentes températures (figure III-21).

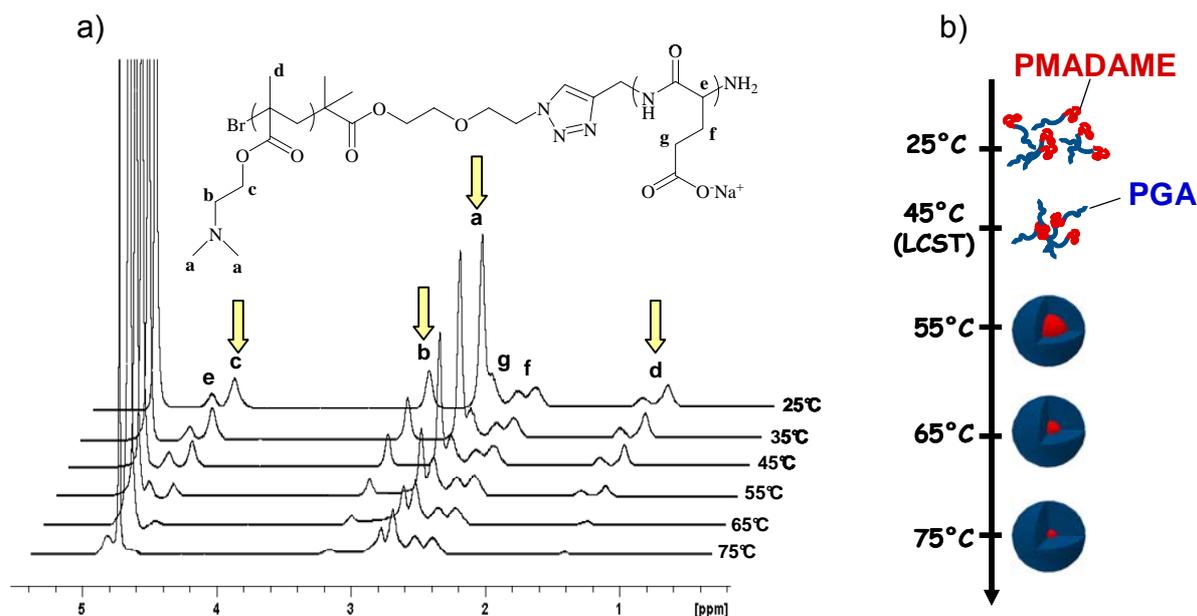


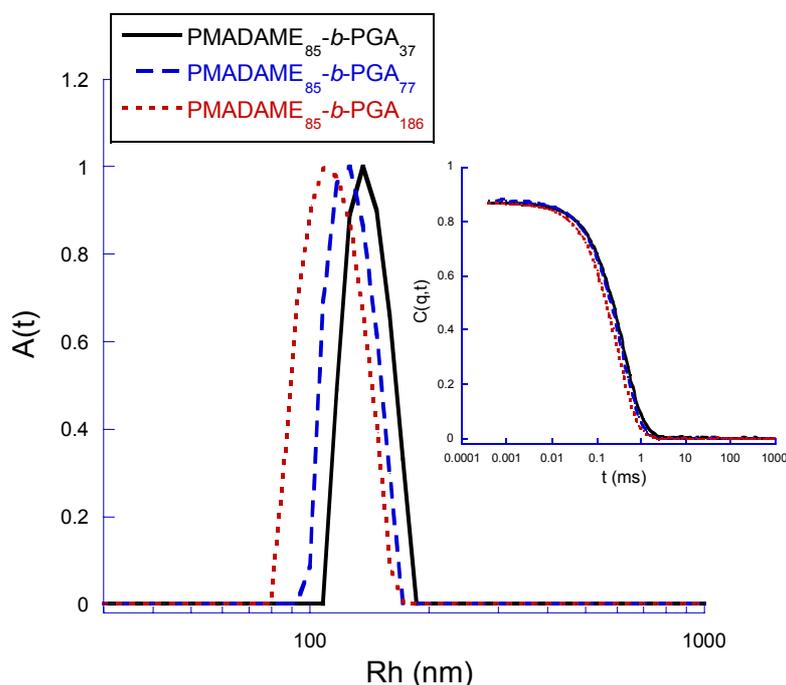
Figure III-21 : a) Spectre RMN <sup>1</sup>H en température du copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>77</sub> dans le D<sub>2</sub>O à pH=11, b) Formation des agrégats avec la température.

L'intensité des signaux correspondant aux protons du bloc PMADAME diminue ou augmente de façon réversible selon que la température de la solution est supérieure ou inférieure à la LCST. Par exemple, à 25°C, on distingue les signaux de tous les protons du système : les deux blocs formant les chaînes de copolymère sont en bon solvant. En chauffant à une température égale à la LCST de l'échantillon PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>77</sub>, c'est-à-dire 45°C, on note une légère diminution de l'intensité des protons correspondant aux blocs PMADAME. Ainsi, de petits agrégats encore très hydratés se forment, en raison des chaînes de PMADAME qui commencent à collapser. A 55°C, la diminution d'intensité de ces mêmes signaux est plus nette. En revanche, ceux correspondant aux blocs PGA sont constants, preuve ainsi que les agrégats formés sont constitués d'un cœur hydrophobe de PMADAME stabilisés par les blocs PGA formant la couronne protectrice électrostatique. Augmenter encore la température entraîne la déshydratation du cœur des nanoparticules et une quasi-disparition des signaux des blocs de PMADAME à 75°C.

Nous avons schématisé la formation de ces objets en fonction de la température dans la figure III-21b. Ce comportement d'agrégation avec la température est en parfait accord avec les résultats obtenus par SANS pour le copolymère Jeffamine-b-PGA (chapitre III-A). En effet, même si l'intensité diffusée par diffusion de la lumière montre une nette augmentation à une température égale à la LCST, l'obtention d'agrégats bien définis n'a lieu qu'à des températures supérieures à cette valeur critique. Pour ce système, il est nécessaire d'appliquer une température de 75°C, soit 30°C au-delà de la LCST, pour déceler une diminution notable des signaux caractéristiques de la PMADAME par RMN <sup>1</sup>H.

Les agrégats formés à haute température à pH=11 ont ensuite été caractérisés par diffusion dynamique de la lumière (DLS). De manière à comparer les données des différents échantillons, les

mesures ont été réalisées à  $T=LCST+10^{\circ}C$ . La figure III-22 représente les distributions en taille (Contin) des trois copolymères en solution au-delà de leur LCST.



**Figure III-22 : Distribution des tailles (Contin) à  $\theta = 90^{\circ}C$  pour les solutions de copolymères  $PMADAME_{85}-b-PGA_{37}$ ,  $PMADAME_{85}-b-PGA_{77}$  et  $PMADAME_{85}-b-PGA_{186}$  dans l'eau à  $pH=11$  ( $c=0.1\%$  mas.) à  $T=LCST+10^{\circ}C$  (l'insert représente les fonctions d'auto-corrélation obtenues dans les mêmes conditions).**

Les trois solutions montrent des distributions en tailles étroites et monomodales. Les fonctions d'auto-corrélation mettent également en évidence la présence d'une seule population avec un temps caractéristique pour chaque copolymère. On observe donc la formation d'objets très bien définis à cœur de PMADAME stabilisés par une couronne de PGA. Toutefois, il n'a pas été possible de déterminer la taille des agrégats formés par l'homopolymère PMADAME. En effet, ce dernier ne pouvant pas être stabilisé, il précipite pour former des agrégats de taille très importante. Les caractéristiques des objets formés au-delà de la LCST sont regroupées dans le tableau III-5.

	LCST ( $^{\circ}C$ ) <sup>a</sup>	$R_H$ (nm) <sup>b</sup>	$\sigma^b$
$PMADAME_{85}$	40	x	x
$PMADAME_{85}-b-PGA_{37}$	44	145	0.06
$PMADAME_{85}-b-PGA_{77}$	46	132	0.09
$PMADAME_{85}-b-PGA_{186}$	48	113	0.03

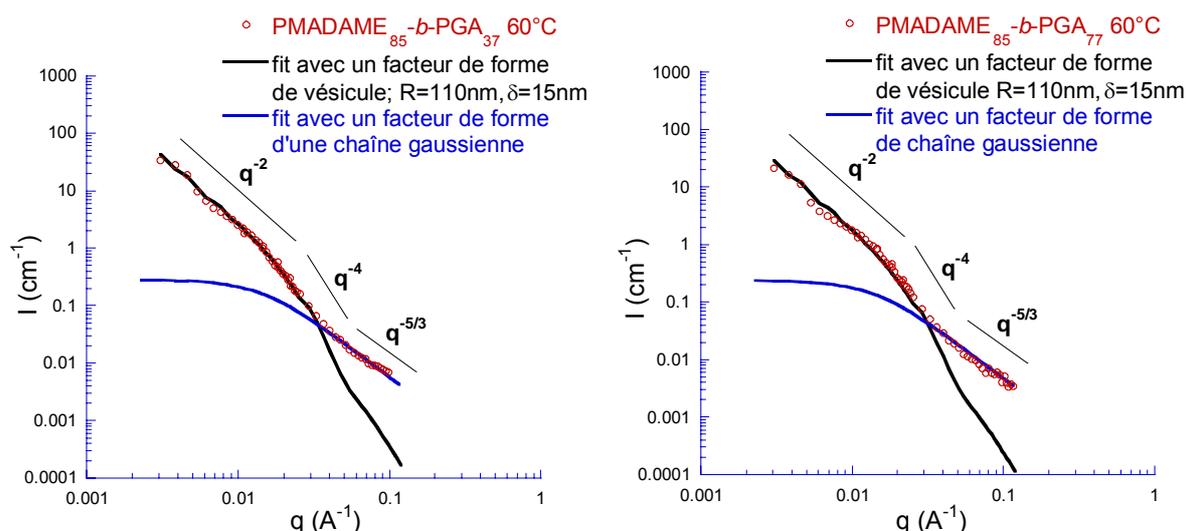
a) Mesurée par DLS ( $2^{\circ}C/min$ ), b) Mesuré par DLS à  $T=LCST+10^{\circ}C$ ,  $\theta=90^{\circ}$

**Tableau III-5 : Caractéristiques des copolymères  $PMADAME_{85}-b-PGA_{37}$ ,  $PMADAME_{85}-b-PGA_{77}$  et  $PMADAME_{85}-b-PGA_{186}$  dans l'eau à  $pH=11$  en fonction de la température (avec  $\sigma$  la polydispersité)**

La stabilité des solutions de ces copolymères à également été étudiée à ces températures. Pour des raisons pratiques, cette étude a été réalisée sur des temps relativement courts (2h). La taille des objets formés à  $T=LCST+10^{\circ}C$  n'évolue pas en fonction du temps ce qui signifie que la stabilisation par les chaînes de PGA est suffisante pour prévenir des phénomènes de coalescence entre nanoparticules.

Des mesures de diffusion de neutrons aux petits angles ont alors été réalisées pour mettre en évidence leur morphologie précise à haute température. Pour cela, les analyses ont été réalisées dans les mêmes conditions qu'en DLS, c'est-à-dire à même concentration ( $c=0.1\%$  mas.) et même pH ( $pH=11$ ). Toutefois, l'eau deutériée a été employée comme solvant de façon à améliorer le contraste et ainsi l'intensité diffusée. Pour des raisons pratiques, les mesures ont été conduites à la même température pour les trois échantillons ( $60^{\circ}C$ ), correspondant à  $T=LCST + 10^{\circ}C$  la plus haute.

La figure III-23 représente l'intensité diffusée par les deux échantillons  $PMADAME_{85}-b-PGA_{37}$  et  $PMADAME_{85}-b-PGA_{77}$  à une concentration massique de 0.1% dans le  $D_2O$  ainsi que les profils d'intensité théoriques développés avec le même modèle que pour le système Jeffamine-*b*-PGA (chapitre III-A-1).



**Figure III-23 : Intensité diffusée en SANS par les vésicules de  $PMADAME_{85}-b-PGA_{37}$  (à gauche) et  $PMADAME_{85}-b-PGA_{77}$  (à droite) à  $pH=11$  dans le  $D_2O$  à  $60^{\circ}C$  ; ajustement avec les facteurs de forme d'une vésicule et de chaînes gaussiennes**

Concernant les études menées sur les deux systèmes ayant les blocs PGA les plus courts,  $PMADAME_{85}-b-PGA_{37}$  et  $PMADAME_{85}-b-PGA_{77}$ , les courbes de diffusion sont caractérisées par trois domaines typiques de décroissance en intensité : le premier avec une enveloppe en  $I \sim q^{-2}$ , le second en  $I \sim q^{-4}$  et le troisième en  $I \sim q^{-5/3}$ . Ce comportement correspond à celui des structures sphériques creuses de type vésicules. En effet, la pente en  $q^{-2}$  est caractéristique de la présence d'une membrane plane c'est-à-dire de la membrane hydrophobe de la vésicule formée par les chaînes de PMADAME (car nous sommes au-delà de leur LCST). Pour une gamme de  $q$  plus grande ( $2 \cdot 10^{-3} < q < 4 \cdot 10^{-3} \text{\AA}^{-1}$ ), on trouve une pente en  $q^{-4}$  qui indique l'interface entre les agrégats et les molécules

de solvant. Enfin, les vésicules en solution sont stabilisées par les chaînes de PGA mises en évidence par la pente en  $q^{-5/3}$  aux grandes valeurs de  $q$  ( $q > 4 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ ) caractéristique de la présence de chaînes gaussiennes en bon solvant.

On remarque que deux facteurs de forme différents sont nécessaires pour ajuster de façon convenable les courbes expérimentales. En effet, celui de la vésicule correspond en réalité à une sphère creuse dure, c'est-à-dire sans chaînes polymères à sa surface. De ce fait, il est impossible par ce modèle de rendre compte de la présence de la couronne de PGA, caractérisée par une pente en  $q^{-5/3}$ . Il faut donc ajouter le facteur de forme d'une chaîne gaussienne de façon à ajuster également les données aux grandes valeurs de  $q$ .

Nous avons ainsi déterminé la taille des vésicules ainsi que l'épaisseur de leur membrane à savoir  $R = 110\text{nm}$  et  $\delta = 15\text{nm}$  pour les deux systèmes, mais il n'a pas été possible de déduire la longueur des chaînes de PGA en surface des vésicules en raison du chevauchement des deux facteurs de forme.

Les valeurs correspondant à la taille globale des vésicules sont sensiblement inférieures à celles déterminées par DLS (tableau III-6). Deux hypothèses peuvent être mises en avant pour expliquer ces différences : (i) tout d'abord, les tailles mesurées en DLS sont obtenues avec une certaine dispersité qui tend à surestimer ces valeurs ; (ii) en SANS, les échantillons ont été préparés dans le  $D_2O$ , tandis qu'en DLS, les expériences ont été effectuées dans  $H_2O$ . Cette substitution isotopique des solvants peut avoir des conséquences sur l'auto-assemblage des vésicules dans la mesure où les interactions ne sont pas rigoureusement les mêmes.

Les courbes de diffusion du copolymère  $PMADAME_{85}-b-PGA_{186}$ , semblent suggérer un comportement différent en solution (figure III-24). En effet, nous n'observons pas de pente en  $q^{-2}$  indiquant l'absence de la morphologie vésiculaire. La diminution de l'intensité directement en  $q^{-4}$  montre la présence d'agrégats sphériques portant à leur surface des chaînes gaussiennes de PGA mises en évidence par la pente en  $q^{-5/3}$  aux grandes valeurs de  $q$ .

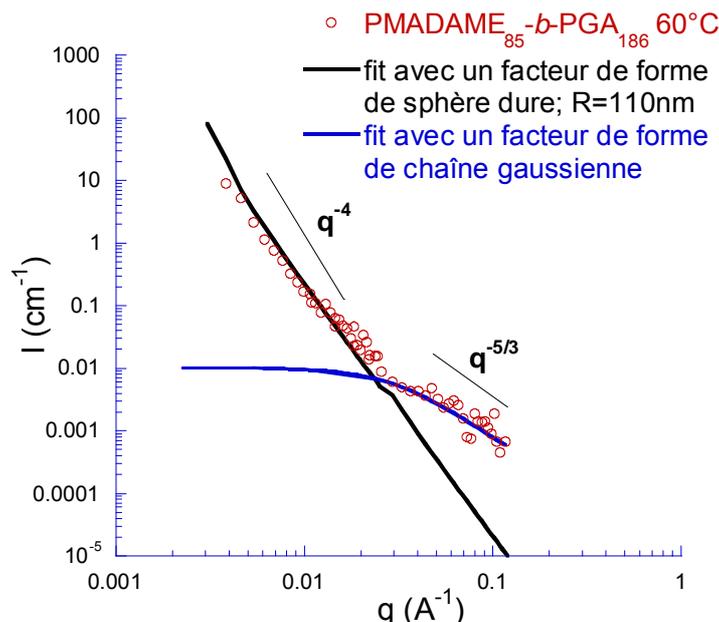


Figure III-24 : Intensité diffusée en SANS par les micelles de PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>186</sub> à pH=11 dans le D<sub>2</sub>O à 60°C ; ajustement avec les facteurs de forme d'une vésicule et de chaîne gaussienne

Les tailles des micelles observées sont trop importantes pour ajuster la courbe expérimentale dans la gamme de  $q$  accessible avec un facteur de forme de sphère dure de rayon fixé. Pour cela, nous supposons que les diamètres des agrégats obtenus par SANS sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par DLS (110nm). Nous savons que  $R_g/R_H \sim 0.77$  dans le cas d'une sphère dure et que  $R_g^2 = (3/5)R_s^2$ , par conséquent,  $R_s$  est du même ordre de grandeur que  $R_H$ . Ainsi, nous avons ajusté la courbe expérimentale avec un facteur de forme de sphère dure de rayon  $R_s=110$ nm. La taille importante de ces micelles suggère un état hydraté qui se vérifie par la présence aux grandes valeurs de  $q$  d'une pente en  $q^{-5/3}$ .

Copolymères	$f_{PGA}$ (%)	$R_H$ (lumière)	Morphologie (neutrons)
PMADAME <sub>85</sub> -b-PGA <sub>37</sub>	26	145	vésicule
PMADAME <sub>85</sub> -b-PGA <sub>77</sub>	43	132	vésicule
PMADAME <sub>85</sub> -b-PGA <sub>186</sub>	64	113	micelle

Tableau III-6 : Comparatifs des résultats déterminés par DLS et par SANS à 60°C (avec  $f$  la fraction massique en PGA).

Les morphologies des différents copolymères sont en accord avec la règle empirique développée par Eisenberg et Discher.<sup>23</sup> En effet, les systèmes comportant un long bloc hydrophile ( $f > 50\%$ , avec  $f$ , la fraction massique du bloc hydrophile) s'organisent préférentiellement sous forme de micelles sphériques et sous forme de vésicules pour ceux composés d'une fraction massique du bloc hydrophile plus faible ( $25\% < f < 45\%$ ).

### B-1-3 Conclusion

La combinaison de deux segments multistimulables confère aux copolymères hybrides à blocs peptidiques des propriétés d'assemblage dans l'eau tout à fait originales avec une multitude de morphologies adoptées, en fonction des paramètres extérieurs. Le schéma III-7 résume l'ensemble de ces morphologies en fonction du pH, de la température ainsi que de la composition des copolymères. Ce système relativement complexe a été étudié en détails grâce à différentes techniques d'analyse comme la DLS, le SANS et le TEM. Cette nouvelle famille de copolymères permet la formation de nanoparticules en solution aqueuse dont les forces motrices sont les suivantes : la complexation électrostatique à température ambiante lorsque les deux blocs sont chargés, ou l'effet hydrophobe à haute température par précipitation du bloc PMADAME.

Ainsi, à température ambiante et pour une gamme de pH comprise entre 4 et 6, nous avons observé la formation de vésicules électrostatiques dont la membrane hydrophobe est formée par les interactions entre les deux blocs chargés. Ces nanoparticules sont stabilisées par un excès de charges dont le signe varie en fonction de la composition du copolymère. Ainsi, le PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>77</sub> sera stabilisé par des charges positives alors que le PMADAME<sub>85</sub>-b-PGA<sub>186</sub> par un excès de charges négatives.

A température plus élevée et à pH basique, le bloc PMADAME est thermosensible et précipite pour former la partie hydrophobe des agrégats qui peuvent adopter différentes morphologies (micelles ou vésicules) en fonction de la taille du bloc PGA stabilisant.

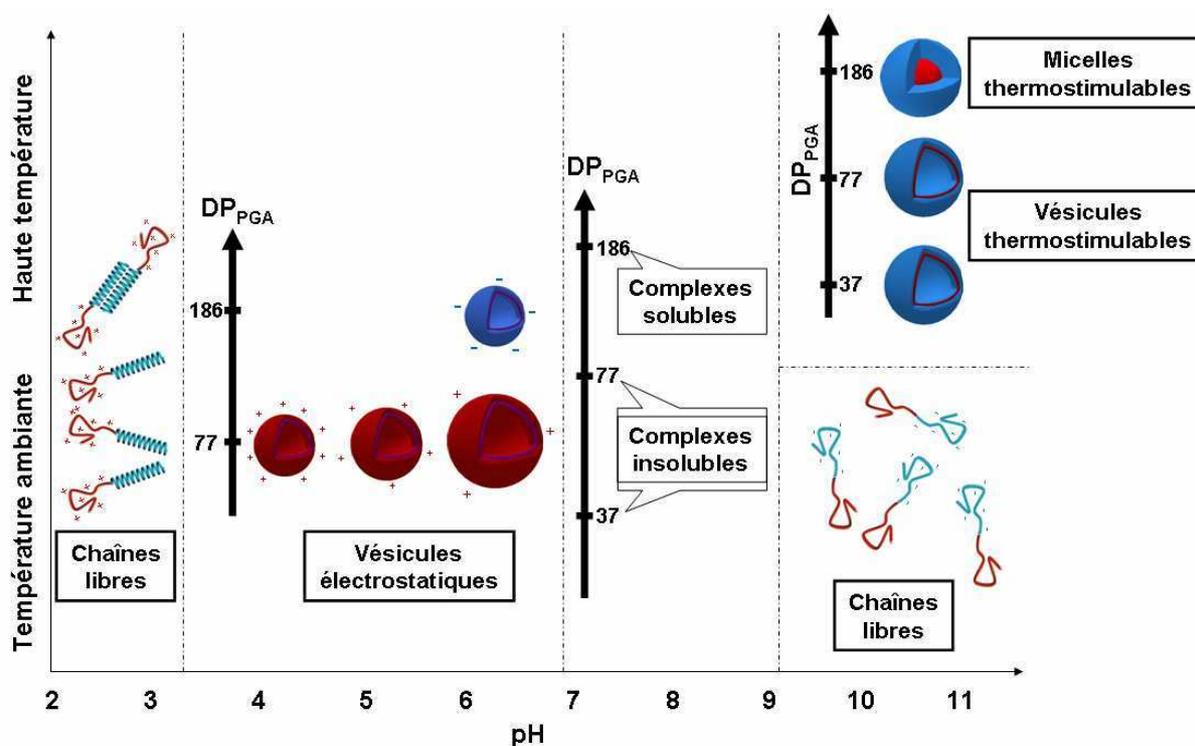


Schéma III-7 : Comportement des copolymères PMADAME-b-PGA dans l'eau en fonction de la température et du pH ( $c=0.1\%$  mas.) sans sel ajouté.

Cette richesse de comportements en solution permet d'envisager le développement de nouveaux vecteurs dans le domaine biomédical. Il est cependant nécessaire d'ajuster ces paramètres en vue d'une utilisation dans ces applications, notamment la température critique qui se situe dans notre cas à des températures supérieures à 50°C. La copolymérisation statistique avec un monomère plus hydrophobe devrait par exemple permettre de diminuer cette température critique.

Les systèmes d'encapsulation comme les vésicules électrostatiques représentent un réel intérêt dans le contrôle du relargage de principes actifs. En effet, nous avons vu que ces vésicules se déstabilisent à la fois par effet de pH ou de force ionique. Notons également que le pH varie dans les différents compartiments d'une cellule, par exemple, le pH des lysosomes se situe entre 3.5 et 5 dû à l'afflux de protons  $H^+$  alors qu'il est de 7.2 dans le cytosol. De plus, le pH extracellulaire des tumeurs est légèrement plus acide que celui des cellules du sang ou des tissus sains.<sup>24</sup> Ainsi, en tenant compte de ces observations et en jouant sur les paramètres chimiques tels que le pKa des différents blocs ou encore sur le rapport de longueur des blocs polyacides sur polybases, il serait possible de déstabiliser les vésicules électrostatiques dans les conditions désirées, par exemple aux abords de cellules cancéreuses.

Les composés thermosensibles utilisés à ce jour dans le relargage contrôlé de médicaments ne sont composés que de polymères à LCST, c'est-à-dire qui précipitent par élévation de la température. En effet, il n'existe aujourd'hui aucun système de vectorisation capable de se solubiliser, et ainsi libérer l'espèce active, lorsque la température augmente. Pour cela, de telles particules doivent être composées de polymères à UCST : l'étude de ce type de système fait l'objet de la prochaine partie.

## B-2 Propriétés du copolymère à blocs PSPE-*b*-PGA

Nous allons à présent étudier le comportement en solution du copolymère PSPE-*b*-PGA, composé de deux blocs hydrophiles stimulables dont les caractéristiques sont regroupées dans le schéma III-8. Le bloc PSPE est un polymère zwitterionique, c'est-à-dire qu'il possède à la fois des charges positives et négatives sur la même unité monomère.<sup>25,26</sup> Il est en plus sensible à la température et possède une UCST vers 15°C en fonction de sa masse molaire et de sa concentration en solution.<sup>27</sup> Le PGA est, comme nous l'avons déjà vu, un polypeptide biocompatible et biodégradable sensible au pH (pKa~4.1).

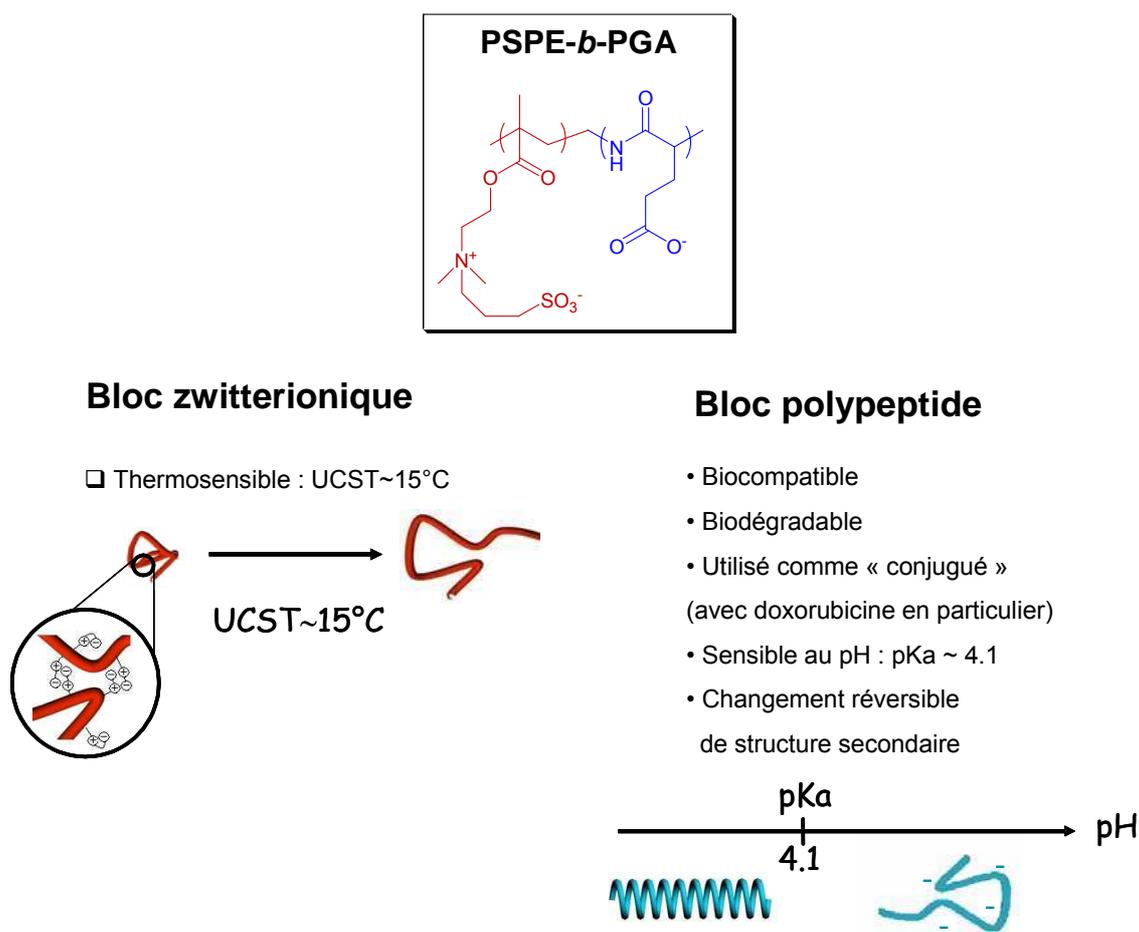


Schéma III-8 : Caractéristiques du copolymère PSPE-*b*-PGA.

L'intérêt d'utiliser de tels copolymères à blocs hybrides est de permettre l'obtention de nanoparticules dans l'eau, à température ambiante ou biologique, capable d'encapsuler et de relarguer de manière contrôlée un principe actif par action de la température. L'originalité ici est de pouvoir manipuler un bloc à UCST qui, de ce fait, permet une solubilisation des vecteurs par élévation de la température. Pour cela, l'étude sera focalisée sur le copolymère PSPE<sub>85</sub>-*b*-PGA<sub>37</sub>.

Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre les paramètres permettant de faire varier la UCST du bloc PSPE.

## B-2-1 Modulation de la UCST de l'homopolymère PSPE

Comme indiqué précédemment, la température critique du bloc PSPE dépend de sa masse molaire, de sa concentration ainsi que de celle en sel. Afin de faciliter l'étude, nos expériences ont été réalisées avec des solutions de polymère de concentration donnée  $c=0.5\%$  (massique) ne contenant pas de sels. Par ailleurs, notre objectif est d'utiliser le système PSPE-*b*-PGA dans des applications biomédicales. Pour cela, il est nécessaire d'ajuster la température critique proche de celle du corps humain. Différents paramètres ont été modulés afin de permettre une modification des interactions au sein du système régissant la valeur de cette température critique de l'homopolymère PSPE : la masse molaire, le taux de quaternisation et l'agent de quaternisation.

Les expériences visant à moduler la UCST ont donc été réalisées sur l'homopolymère PSPE.

### B-2-1-1 Influence de la masse molaire du PSPE

Nous avons déjà montré dans la partie bibliographique (chapitre I) que la UCST augmente avec la masse molaire<sup>28</sup> (figure III-25).

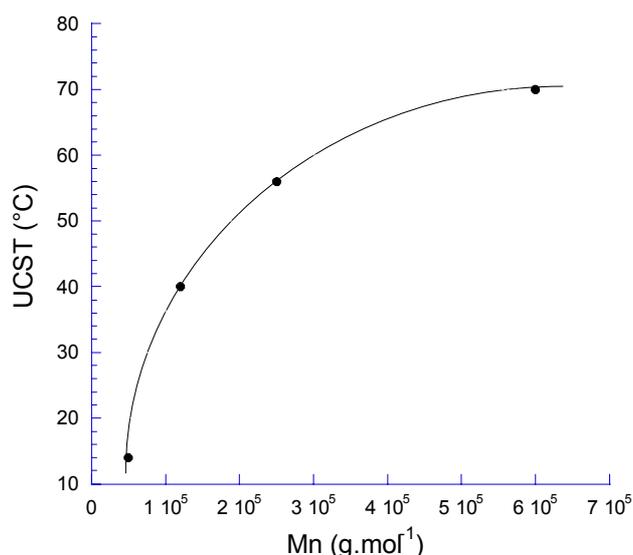


Figure III-25 : Evolution de la UCST de l'homopolymère PSPE en fonction sa masse molaire ( $c=0.5\%$  mas.)<sup>28</sup>

Comme nous pouvons le constater, il est possible d'ajuster la température critique à 40°C, cependant, la masse molaire correspondante est très élevée ( $M_n=120\,000\text{g.mol}^{-1}$ ). La synthèse de copolymères à blocs de fortes masses molaires conduit dans la plupart des cas à l'obtention de systèmes mal définis, surtout si elle fait appel à une étape de couplage. De ce fait, nous nous sommes focalisés sur des blocs plus courts ( $DP=85$ , soit  $M_n=23700\text{g.mol}^{-1}$ ). La température critique mesurée pour cette valeur de masse molaire n'étant que d'environ 15°C, nous avons fait varier d'autres paramètres pour augmenter la UCST du bloc PSPE.

### **B-2-1-2 Influence du taux de quaternisation**

Une possibilité pour modifier les interactions électrostatiques, par conséquent la UCST du bloc PSPE, est de jouer sur le taux de quaternisation. Nous avons ainsi fait varier le taux de quaternisation de 20% à 80%. Les mesures réalisées par diffusion de la lumière n'ont cependant révélé aucun point de trouble (pas de UCST), ni d'ailleurs de LCST. Pour de tels taux de quaternisation, le PSPE est soluble dans l'eau quelle que soit la température.

Le fait de réduire le nombre d'unités zwitterioniques au sein des chaînes polymères va diminuer la densité de charges opposées, et donc la valeur de la température critique (UCST). Nous n'observons pas non plus de LCST car elle devient probablement trop importante pour être mesurée (supérieure à la température d'ébullition de l'eau). En effet, la quaternisation des unités PMADAME revient à incorporer des unités hydrophiles au sein de la chaîne polymère ce qui a pour effet d'augmenter sa LCST.

### **B-2-1-3 Influence de l'agent de quaternisation**

Jusqu'à présent, la propane sultone avait été utilisée. Nous avons alors employé la butane sultone (un carbone de plus). Le fait d'accroître le nombre de carbones entre les deux charges induit, d'une part, une augmentation du moment dipolaire, par conséquent de l'hydrophilie du polymère et, d'autre part, accentue le caractère hydrophobe du PSPE. Là encore, les résultats n'ont pas été concluants : la quaternisation du PSPE par la butane sultone n'est pas quantitative probablement en raison d'une réactivité moindre par rapport à la propane sultone.<sup>29</sup> On aboutit à 70% de quaternisation des unités PMADAME, valeur trop faible pour conférer une UCST à ce polymère.

La UCST du PSPE n'a pas pu être ajustée à une température proche de celle du corps humain. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau III-7.

Paramètres	UCST	commentaires
Masse molaire	40°C	Synthèse de très fortes masses molaires
Taux de quaternisation	×	Pas de point de trouble
Agent de quaternisation	×	Pas de point de trouble

**Tableau III-7 : Influence des différents paramètres sur la valeur de la UCST**

L'étude du copolymère PMADAME-*b*-PGA en fonction de la température (chapitre III B-1-2) a montré l'influence de l'incorporation d'un bloc hydrophile (PGA) sur la valeur de la LCST du bloc thermosensible (PMADAME). Il est en effet envisageable de moduler la température critique par association du bloc thermosensible avec un autre bloc, hydrophile ou hydrophobe. Ainsi, pouvait-on espérer que l'arrangement du PSPE avec le PGA constitue un moyen de moduler la UCST du bloc vinylique.

### B-2-2 Etude en milieu aqueux du copolymère PSPE<sub>85</sub>-b-PGA<sub>37</sub>

Dans les expériences suivantes, le but a été de déterminer la UCST du copolymère PSPE<sub>85</sub>-b-PGA<sub>37</sub>. Comme déjà signalé dans la partie décrivant la synthèse de ce composé (chapitre III B-2-3-4), il n'a pas été possible de quaterniser le bloc PMADAME de manière quantitative. En effet, seulement 90% des unités ont pu être modifiées en raison probablement des interactions électrostatiques entre les deux blocs.

Si la valeur du point de trouble du PSPE totalement quaternisé est insensible au pH, il n'est pas exclu que les 10% d'unités non quaternisées puissent modifier cette valeur en fonction du pH, en raison de la protonation des amines tertiaires laissées libres. Nous avons donc synthétisé l'homopolymère PSPE<sub>85</sub> quaternisé à 90%. On note, en effet, que les unités PMADAME non quaternisées influent sur la UCST (figure III-26).

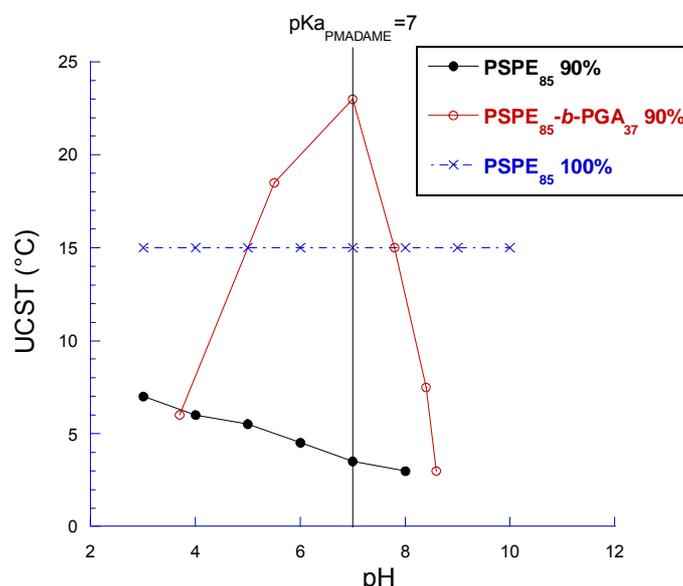


Figure III-26 : Evolution de la UCST pour des solutions aqueuses de ○) copolymère PSPE<sub>85</sub>-b-PGA<sub>37</sub>, ●) homopolymère PSPE<sub>85</sub> quaternisés à 90% et ×) homopolymère PSPE<sub>85</sub> quaternisé à 100% (c=0.5% mas.) en fonction du pH.

Les valeurs mesurées pour le PSPE<sub>85</sub> 90% sont inférieures à celles obtenues pour un polymère totalement quaternisé : maximum de 7°C à pH=3 contre 15°C pour une quaternisation quantitative. Ces résultats peuvent être comparés avec ceux de Bendejacq et coll.<sup>28</sup>, qui ont montré que 5% d'unités non quaternisées suffisent à améliorer la solubilité du PSPE. Ces unités proviennent, dans leur cas, de l'hydrolyse des fonctions esters de la PMADAME durant l'étape de quaternisation donnant naissance à des fonctions acides carboxyliques (ce que nous n'observons pas dans notre cas). Ceci provoque une asymétrie de charges avec un excès de charges négatives entraînant une meilleure solubilité des chaînes à force ionique nulle. Dans notre cas, l'excès de charges positives est dû à la quaternisation partielle des unités PMADAME ce qui tend à diminuer la UCST qui passe de 15°C à 5°C à pH=6 lorsque 10% des unités ne sont pas quaternisées.

Bendejacq et al.<sup>28</sup> n'ont cependant pas étudié l'influence du pH sur la température critique. Dans notre cas, celle-ci évolue de 7°C à pH=3, à 3°C à pH=8. Au-delà de ce pH, le point trouble disparaît. Certes, la différence n'est pas très importante (seulement 4°C) mais on révèle que le pH est un facteur influant sur la UCST de tels systèmes. Le pKa de la PMADAME se situe vers 7. En dessous de cette valeur, les amine tertiaires sont majoritairement protonées et on considère qu'elles le sont complètement vers pH~4. On peut donc supposer que les amines protonées non quaternisées donnent lieu à une complexation plus importante avec les groupements sulfates conduisant à une augmentation de la UCST à faible pH.

Intéressons nous maintenant à l'influence du bloc PGA hydrophile sur la valeur de la température critique. Cette dernière décrit une parabole avec un maximum de 23°C à pH=7 (figure III-25). Toutefois, nous ne pouvons pas à ce stade savoir si l'évolution de la UCST est liée au caractère hydrophile ou aux charges négatives du bloc PGA.

Chen et coll.<sup>30</sup> ont montré que l'incorporation d'homopolymère anionique à une solution de PSPE avait pour conséquence de diminuer la UCST de ce dernier. Les anions viennent se complexer avec les amine quaternisées des unités de PSPE laissant libres les fonctions sulfonates qui augmentent le caractère hydrophile du polymère. Ces résultats pourraient expliquer la diminution dans notre cas de la UCST à pH>7, c'est-à-dire lorsque les blocs PGA sont entièrement protonés. Cependant, nous n'avons pas d'explication rationnelle concernant l'augmentation de la UCST entre pH=3.8 et pH=7.

Par ailleurs, la taille des agrégats mesurés pour des températures inférieures à la UCST du PSPE sont très importantes (>1µm) et très polydisperses. Deux hypothèses peuvent être mises en avant pour expliquer ce phénomène : (i) le bloc PGA hydrophile est trop court pour stabiliser les nanoparticules qui, par conséquent, s'agrègent ; (ii) des interactions entre les deux blocs chargés se créent empêchant les blocs PGA de jouer pleinement leur rôle de couronne stabilisante, ce qui conduit également à la formation d'agrégats de très fortes tailles.

### ***B-2-3 Conclusion***

Différents facteurs peuvent influencer la UCST du PSPE. Même si la masse molaire semble le facteur le plus évident pour ajuster la UCST au voisinage de la température corporelle, il est difficile d'obtenir des copolymères à blocs bien définis comprenant des blocs de grandes tailles pour atteindre de telles températures critiques. Par ailleurs, ni le taux, ni l'agent de quaternisation n'ont permis d'ajuster la UCST du PSPE à 40°C. Une augmentation jusqu'à 23°C a toutefois été rendue possible en associant un bloc hydrophile chargé, le PGA au PSPE. Le comportement dans l'eau du copolymère à blocs correspondant PSPE-*b*-PGA, contenant un bloc zwitterionique et un bloc anionique, rend toutefois complexe le comportement physico-chimique en milieu aqueux de ce copolymère dans la mesure où le pH est également un facteur influant sur la UCST.

Toutes nos études ont été réalisées sur des solutions ne contenant pas de sels afin de maximiser la valeur de la UCST. Différentes études ont en effet montré que l'ajout de sel a pour

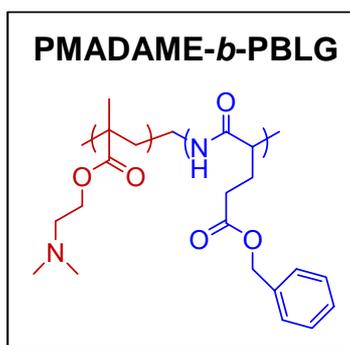
conséquence d'améliorer la solubilité des chaînes de polymère thermosensible par écrantage des interactions électrostatiques, en diminuant la UCST.

On peut donc anticiper un problème pour notre étude dont le but ultime est d'utiliser ces copolymères à blocs comme précurseurs de nanoparticules pour la vectorisation de principes actifs. En effet, la concentration moyenne en sels en milieu biologique est de 150mM. A cette valeur, la UCST chute littéralement ( $\sim 10^{\circ}\text{C}$ ) même pour des tailles de blocs importantes ( $> 1\ 000\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).<sup>28</sup>

Ces considérations peuvent expliquer pourquoi de tels systèmes n'ont pas encore été développés pour des applications dans le domaine biomédical, en raison de leur complexité. Des efforts tant dans le domaine de la conception de copolymères adaptés, que dans la compréhension théorique du comportement des systèmes à UCST, sont nécessaires.

## B-3 Propriétés du copolymère à blocs PMADAME-*b*-PBLG

Le dernier système que nous avons étudié est le copolymère amphiphile PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PBLG<sub>41</sub>, composé d'un bloc hydrophile multistimulable PMADAME<sub>85</sub>, et d'un bloc hydrophobe PBLG<sub>41</sub>. Les caractéristiques sont regroupées dans le schéma III-9.



### Bloc multistimulable

- Sensible au pH : pKa~7
- Thermosensible : LCST~39°C
- Complexant de l'ADN

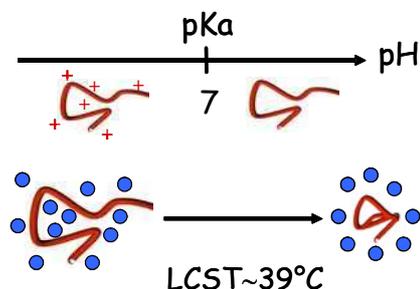


Schéma III-9 : Caractéristiques du copolymère PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PBLG<sub>41</sub>

### Bloc peptidique

- Hydrophobe
- Conformation en hélice- $\alpha$
- Utilisé dans applications biomédicales

Différentes méthodes de mise en solution ont d'abord été testées afin de déterminer la voie d'accès la plus adaptée à des vésicules bien définies.

La deuxième partie a consisté à incorporer des nanoparticules magnétiques au sein des vésicules de copolymères à blocs. En effet, ces dernières sont de plus en plus utilisées notamment dans le domaine biomédical où elles servent d'agents de contraste en IRM (imagerie par résonance magnétique), de ciblage ou bien pour des applications d'hyperthermie.<sup>31,32</sup> Afin de combiner des propriétés de réponse magnétique des particules avec celles de ciblage et de relargage de tels vecteurs issus de copolymères à blocs, il s'agit d'incorporer les particules magnétiques soit dans le cœur hydrophile,<sup>33</sup> soit dans la membrane hydrophobe<sup>34,35</sup> des polymersomes. C'est cette deuxième stratégie que nous avons choisie dans le cadre de ce travail.

### B-3-1 Mise en solution

Comme mentionné dans le chapitre bibliographique, les copolymères amphiphiles s'auto-assemblent spontanément lorsqu'ils sont introduits dans un solvant sélectif de l'un des blocs ; dans notre cas le solvant est l'eau. Les agrégats micellaires possèdent un cœur constitué par le bloc hydrophobe PBLG stabilisé par une couronne gonflée par l'eau à base de PMADAME. Parmi les différentes procédures concernant la mise en solution des copolymères à blocs amphiphiles dans l'eau, nous en avons utilisé trois : (i) la dissolution directe, (ii) la méthode de l'émulsification et (iii) la méthode du « co-solvant » ou dissolution indirecte.

#### B-3-1-1 Mise en solution par dissolution directe

Cette technique consiste simplement à additionner le copolymère dans l'eau distillée et n'est réalisable que lorsque le copolymère possède une balance hydrophile/hydrophobe suffisamment importante.<sup>36</sup> Le copolymère est donc dissout dans l'eau distillée (pH = 6.5) et agité pendant 48h. La solution obtenue est homogène et turbide preuve de l'auto-assemblage des copolymères à blocs. Les premières mesures ont été réalisées par DLS à 90° et ont révélé la présence d'agrégats ( $R_H = 107$  nm) avec une large distribution ( $\sigma = 0.43$ ) (figure III-27).

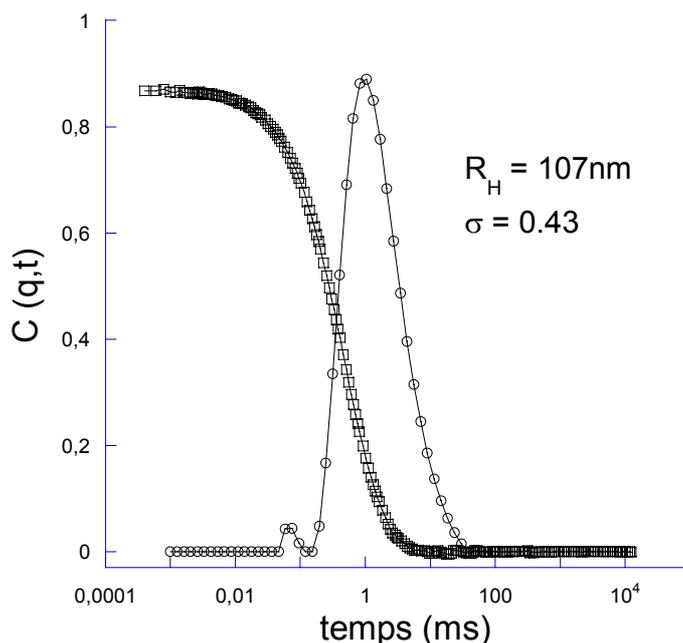
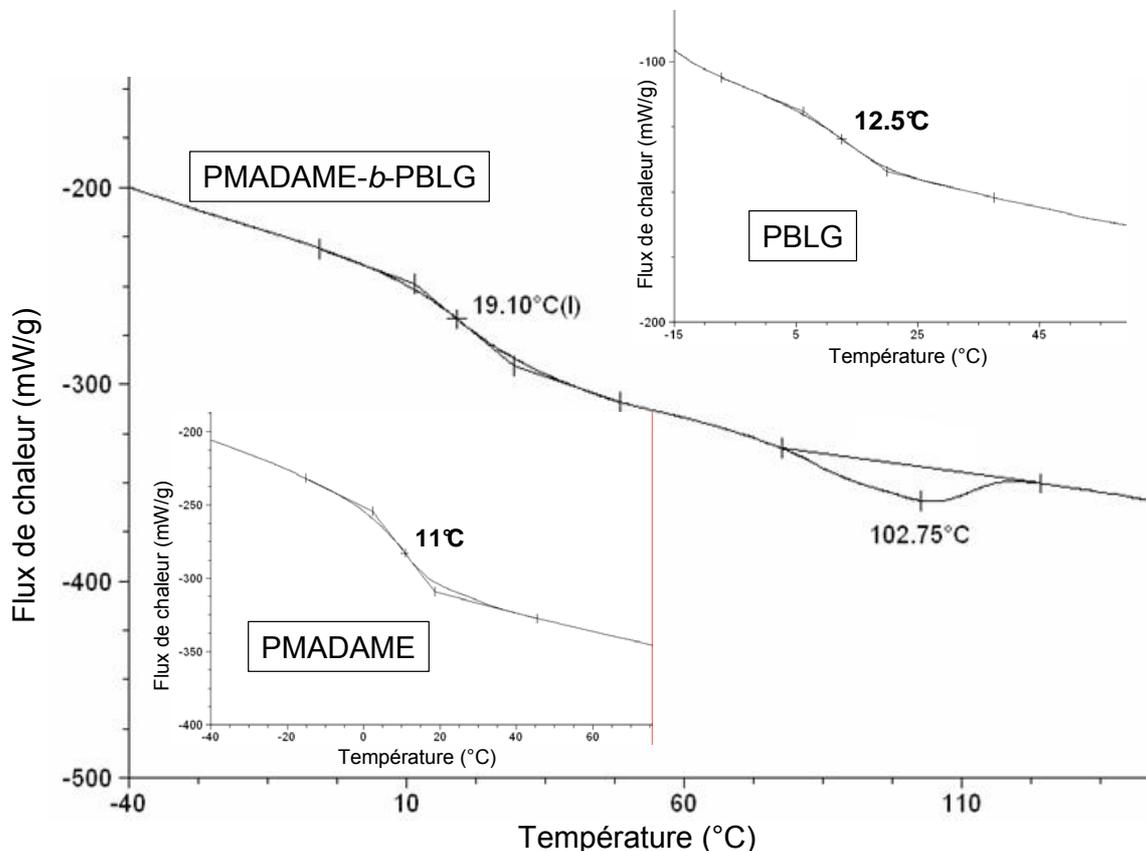


Figure III-27 : Fonctions d'auto-corrélation et distribution du temps de relaxation (Contin) pour une solution du copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PBLG<sub>41</sub> (c=0.1% mas.) préparée par dissolution directe à pH = 6.5.

Pour expliquer ce résultat, il faut d'abord appréhender le comportement de tels systèmes dans l'eau. Les blocs de PBLG hydrophobes, adoptent en milieu aqueux une conformation en hélice- $\alpha$  et se comportent donc comme des bâtonnets rigides ayant une grande tendance à s'agréger. Afin de conférer plus de mobilité à ces blocs rigides, la solution a été chauffée, le PBLG étant connu pour subir une transition cristal/cristal liquide vers 100°C qui correspond au changement irréversible de

conformation hélicoïdale du bloc peptidique, d'une hélice de type 7/2 à une hélice de type 18/5. Ce phénomène a déjà été observé dans le cas des homoPBLG<sup>37,38</sup> et des copolymères linéaires<sup>39,40</sup> à base de PBLG. Notre échantillon a donc été analysé par analyse enthalpique différentielle (DSC) afin de vérifier la présence de cette transition (figure III-28).

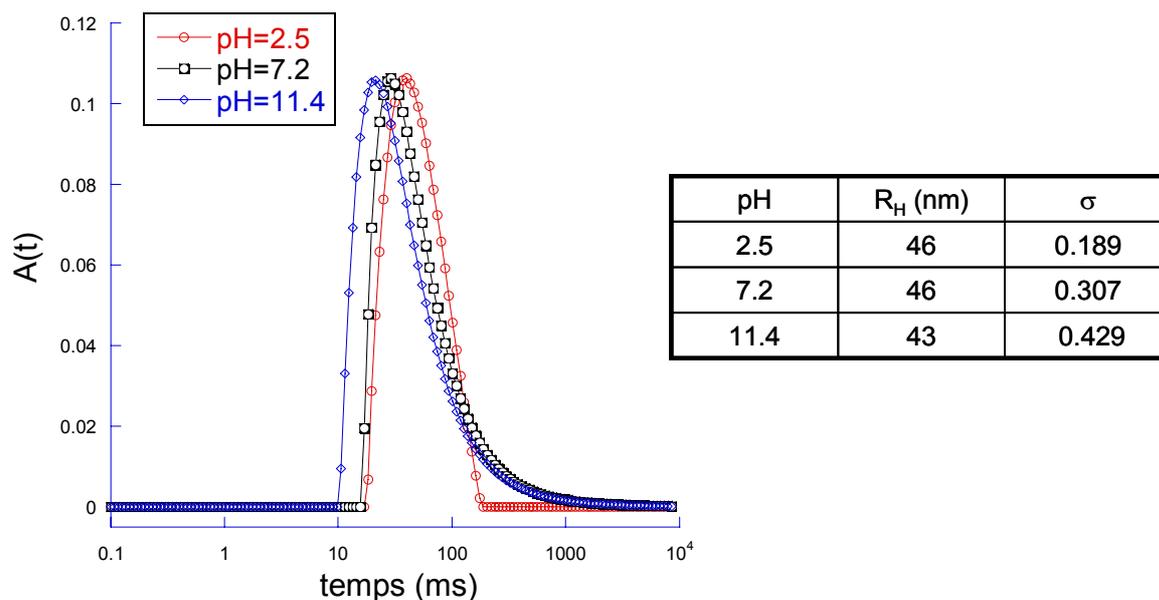


**Figure III-28 : Analyse DSC pour le copolymère à blocs PMADAME<sub>85</sub>-b-PBLG<sub>41</sub> ainsi que les homopolymères PMADAME et PBLG.**

On peut tout d'abord remarquer la présence d'une seule température de transition vitreuse (T<sub>g</sub>) car les deux polymères constituant le copolymère à blocs présentent des T<sub>g</sub> très proches, 11°C pour le PMADAME et 12.5°C pour le PBLG. La température de transition cristal/cristal liquide apparaît en effet à 102°C. Aussi, la solution a été chauffée sous reflux à 105°C dans de l'eau distillée (pH~6.5) de façon à rendre les blocs de PBLG dans un état cristal liquide et, de ce fait, plus mobiles. Ici, la solution est transparente montrant que les nano-objets en solution ont des tailles inférieures à celles obtenues précédemment.

Les études menées en DLS à 25°C montrent la présence de particules effectivement plus petites (R<sub>H</sub> = 58nm) que celles obtenues par dissolution directe à 25°C (R<sub>H</sub> = 107nm) mais là encore avec une polydispersité élevée ( $\sigma = 0.44$ ). Ceci peut s'expliquer par le fait que la grande rigidité des blocs PBLG ne permet pas d'obtenir des échanges inter-micellaires suffisamment importants nécessaires pour atteindre un état d'équilibre thermodynamique.

Par la suite, le copolymère à blocs a été solubilisé dans de l'eau à pH acide (2.5) de façon à rendre la PMADAME entièrement protonée donc plus hydrophile. Dans ce cas, la solution obtenue est transparente. Les mêmes études par DLS montrent la présence d'une population étroite et monomodale ( $R_H = 46\text{nm}$ ,  $\sigma = 0.19$ ) (figure III-29); la couronne de PMADAME entièrement protonée est donc plus à même à stabiliser les agrégats micellaires formés. Afin d'étudier le pouvoir stabilisant de la couronne hydrophile, le pH de la solution a été modifié après avoir formé les particules. On remarque, en premier lieu, que les tailles moyennes des nano-objets diminuent lorsqu'on augmente le pH, contrairement à la distribution de tailles qui, elle, s'élargit (figure III-29).



**Figure III-29 : Distributions des temps de relaxation (Contin) pour les solutions du copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PBLG<sub>41</sub> ( $c=0.1\%$  mas.) solubilisé à pH = 2.5 suivi d'une augmentation progressive du pH à 7.2 et 11.4 ; b) Caractéristiques des agrégats formés à pH = 2.5, 7.2 et 11.4.**

En fait, la couronne hydrophile entièrement chargée à pH = 2.5 est progressivement déprotonée au fur et à mesure que le pH augmente par l'ajout d'une solution de NaOH. Ainsi, les blocs PMADAME adoptent une conformation de moins en moins étirée, ce qui se traduit par une légère diminution du  $R_H$  des nanoparticules.

En augmentant le pH, la stabilisation jusqu'alors électrostatique des nanoparticules n'est plus que stérique, donc moins efficace. Certes, les blocs PMADAME demeurent hydrophiles car les températures sont inférieures à la LCST, mais ils stabilisent d'autant mieux les nanoparticules quand ces blocs sont chargés. Cela se traduit par un élargissement de la distribution des tailles des agrégats micellaires qui n'est plus symétrique en raison de l'apparition d'une traînée dans le domaine des grandes tailles. Ces résultats tendent à montrer la coagulation de certaines particules entre elles formant des agrégats de plus gros diamètre (schéma III-10). Cependant, ces gros objets restent minoritaires car la taille moyenne des particules à pH = 11.4 est plus faible qu'à pH = 2.5.

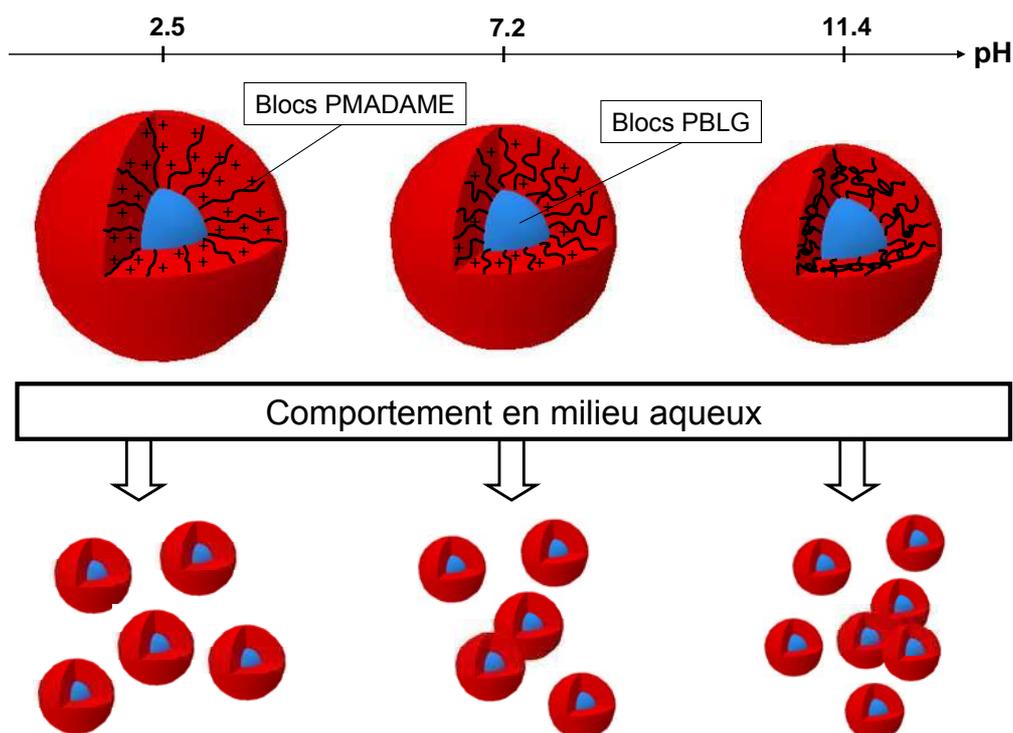
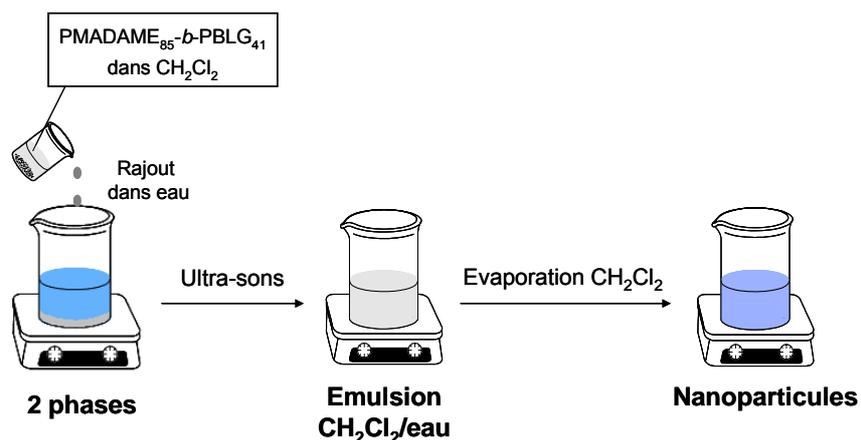


Schéma III-10 : Comportement en milieu aqueux des copolymères à blocs  $PMADAME_{85}\text{-}b\text{-}PBLG_{41}$  en fonction du pH par dissolution directe.

Cette technique, bien que permettant d'obtenir des nanoparticules bien définies, nécessite malgré tout une solubilisation en milieu acide. Le fait d'augmenter le pH par la suite entraîne un élargissement dans la distribution des tailles de ces nano-objets. Pour faire face à ce problème, nous nous sommes tournés vers des techniques permettant l'obtention d'agrégats micellaires sans avoir à changer le pH de la solution.

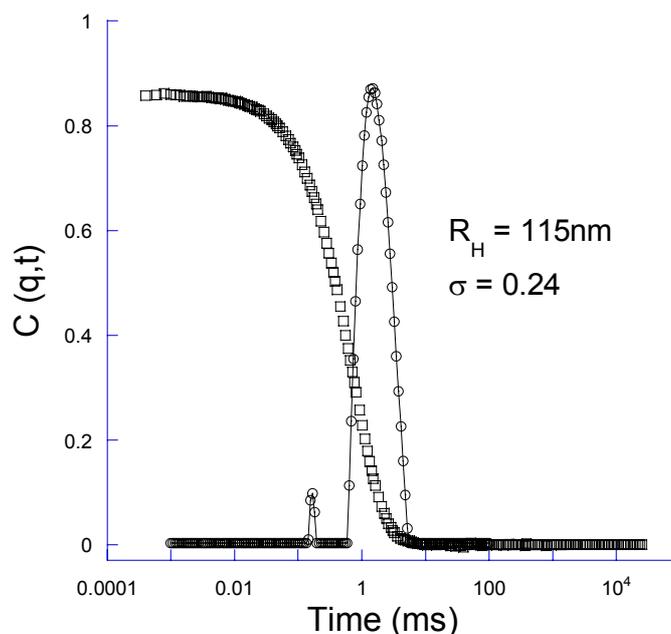
### B-3-1-2 Mise en solution par la méthode de l'émulsification

Cette technique est normalement utilisée pour obtenir des vésicules lipidiques mais Feijen et coll. l'ont adaptée pour la formation de polymersomes biodégradables à base de PLA ou PCL.<sup>41</sup> Dans notre étude, les copolymères à blocs sont solubilisés dans un solvant non miscible à l'eau, en l'occurrence le dichlorométhane. Après avoir rajouté cette solution organique dans de l'eau, le mélange est homogénéisé pendant 5 minutes sous l'action d'ultra-sons ; on obtient ainsi une dispersion blanchâtre, les microgouttelettes de dichlorométhane étant stabilisées par les copolymères amphiphiles se plaçant à l'interface eau/dichlorométhane (schéma III-11). Les blocs PMADAME forment la couronne hydrophile stabilisante tandis que les segments PBLG sont confinés à l'intérieur des gouttelettes dans la partie organique.



**Schéma III-11 : Illustration de la méthode de l'émulsification pour la préparation de nanoparticules.**

Une fois le solvant organique extrait par évaporation, la solution est analysée par DLS à  $90^\circ$  (figure III-30). Nous obtenons une population monomodale et plutôt bien définie ( $\sigma = 0.24$ ) avec des tailles pouvant raisonnablement correspondre à celles de polymersomes ( $R_H = 115\text{nm}$ ).



**Figure III-30 : Fonction d'auto-corrélation et distribution du temps de relaxation (Contin) pour une solution du copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PBLG<sub>41</sub> ( $c=0.1\%$  mas.) préparée par la méthode de l'émulsification**

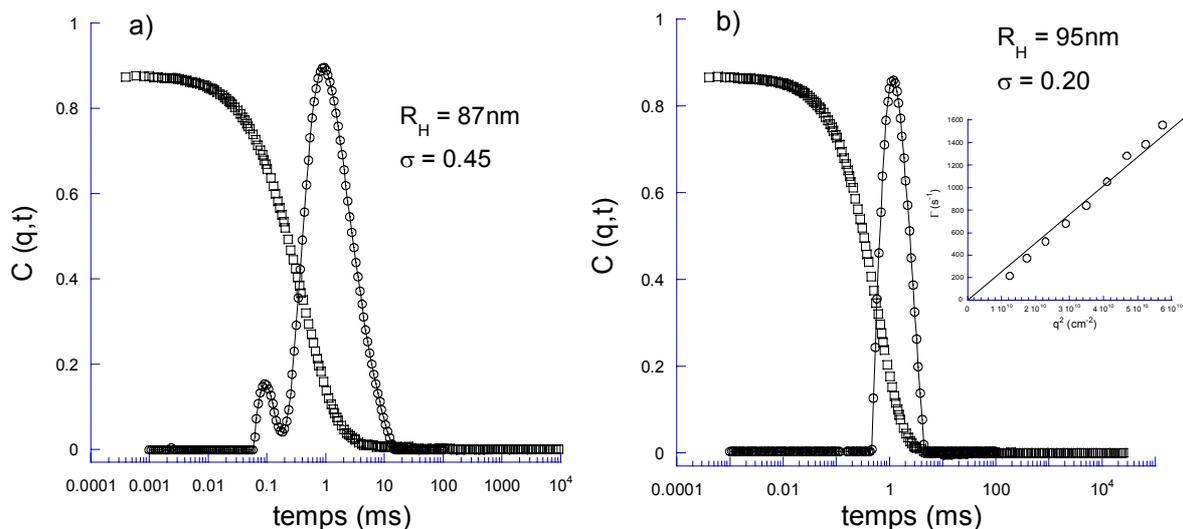
Toutefois, n'ayant pas réalisé d'autres analyses pour confirmer la morphologie de ces nanoparticules (TEM, SANS), nous nous sommes focalisés sur la méthode de la dissolution indirecte ou méthode du « co-solvant ».

### **B-3-1-3 Mise en solution par dissolution indirecte ou méthode du « co-solvant »**

Cette technique, connue également sous le nom de nanoprécipitation, consiste en l'ajout d'une solution aqueuse à une solution de copolymères dans un solvant organique ou inversement. Le solvant organique est cette fois miscible à l'eau (THF, DMSO, DMF, ...). Les chaînes de copolymères vont ainsi s'organiser en nanoparticules dont la morphologie va dépendre de divers paramètres : quantité d'eau utilisée, vitesse et sens d'ajout de l'eau, solvant organique, concentration initiale en copolymère... Dans notre étude, quel que soit le solvant organique utilisé pour solubiliser les copolymères PMADAME-*b*-PBLG, nous avons travaillé avec les mêmes ratio volumiques solvant organique/eau = 0.1. La solution organique de copolymères à blocs (10mg/mL) est ajoutée à une solution aqueuse avec une vitesse contrôlée par pousse-seringue (6mL/h).

Nous avons tout d'abord effectué la nanoprécipitation à partir d'une solution des copolymères à blocs PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PBLG<sub>41</sub> dans le THF. La solution organique a été ajoutée à la phase aqueuse à l'aide d'un pousse seringue de façon à garder un débit constant. La solution se trouble au fur et à mesure de l'ajout montrant l'auto-organisation des chaînes de copolymères sous forme de nanoparticules dont les tailles ont été mesurées par DLS après évaporation du THF. On observe une double population avec une large dispersité ( $\sigma = 0.45$ ) qui peut s'expliquer par l'état de solubilité des blocs PBLG dans le THF (figure III-31 a). En effet, il est bien connu que le PBLG, bien que soluble à l'échelle macroscopique, forme des agrégats dans le THF.<sup>42</sup> De ce fait, il semble difficile d'obtenir des agrégats micellaires bien définis à partir d'une solution agrégée de copolymères.

Pour cela, nous avons réalisé les mêmes expériences en utilisant le DMSO dans lequel les segments de PBLG adoptent des conformations de chaînes libres. Du fait du point d'ébullition élevé de ce solvant (~190°C), nous avons choisi la dialyse comme méthode de purification de la solution. Il s'avère que le choix du solvant organique est un paramètre primordial quant à la définition des particules formées. En effet, en utilisant le DMSO comme solvant de nanoprécipitation, on obtient une solution légèrement turbide (figure III-34) présentant une population étroite et monomodale :  $\sigma = 0.20$  et  $R_H = 95\text{nm}$  (figure III-31 b). Nous avons mesuré les fréquences de relaxation pour différents angles et comme le montre la figure III-31 b), leur évolution linéaire avec  $q^2$  indique la présence d'objets sphériques en solution.



**Figure III-31 : Fonctions d'auto-corrélation et distributions des temps de relaxation (Contin) pour des solutions du copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PBLG<sub>41</sub> (c=0.1% mas.) préparée par la méthode de la dissolution indirecte dans : (a) le THF, (b) le DMSO.**

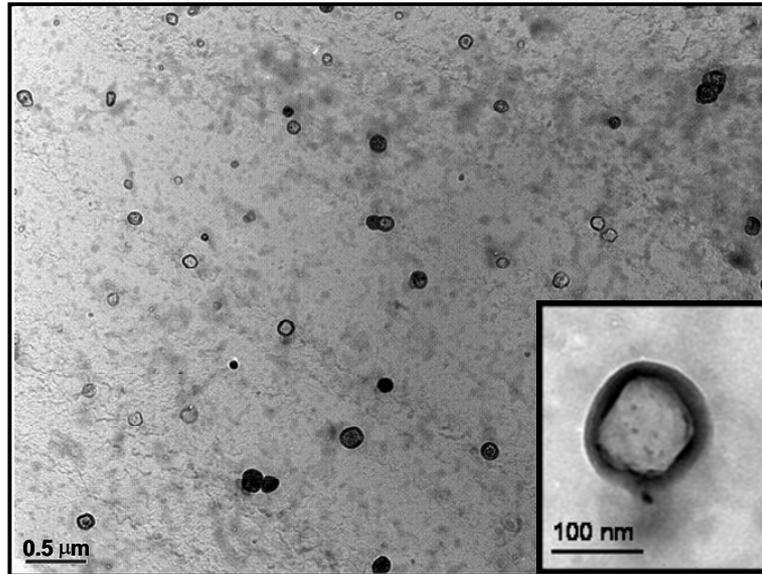
Afin de confirmer la morphologie de ces nanoparticules, nous avons utilisé deux méthodes d'analyses complémentaires : TEM et SANS.

Grâce aux études menées par microscopie électronique en transmission (TEM), nous avons pu observer la présence de particules sphériques et creuses (figure III-32). Les dépôts ont été réalisés grâce à la méthode du « spray » à partir de solutions aqueuses de copolymères (c=1mg/mL) à pH ~ 6.5. Le diamètre moyen observé pour ces vésicules est de 120nm et inférieur à celui obtenu par DLS (190nm). En effet, pour un système micellaire possédant une distribution en taille donnée, les analyses menées par TEM donnent généralement des tailles inférieures à celles mesurées par DLS. A cela, nous pouvons avancer deux explications : (i) tout d'abord, en DLS, nous mesurons un rayon hydrodynamique c'est-à-dire que nous prenons en compte la couronne d'hydratation dans la valeur de la taille, ce qui n'est évidemment pas le cas en TEM où les échantillons sont étudiés à l'état de film non hydraté ; (ii) aussi, les tailles obtenues se réfèrent à une distribution en nombre pour les études de TEM et en intensité pour celles de DLS. Comme l'intensité diffusée est proportionnelle à la taille des particules, les tailles mesurées par DLS sont normalement supérieures à celles observées par TEM.

Concernant leur morphologie, il est clair que nous sommes en présence de vésicules dont la membrane hydrophobe est formée par les blocs de PBLG dans leur conformation en hélice- $\alpha$ , les segments de PMADAME formant la couronne stabilisant les nanoparticules de manière électrostatique.

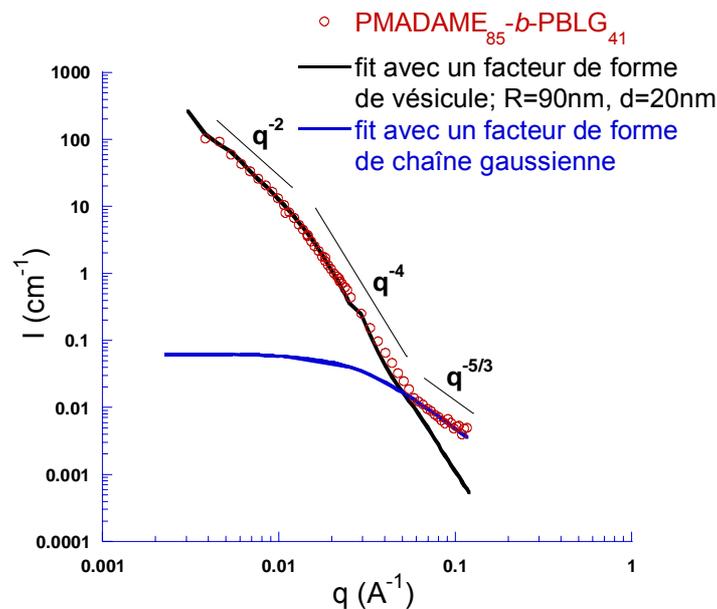
Les mesures par SANS ont été menées dans un mélange deutérié D<sub>2</sub>O/DMSO-d<sub>6</sub> (car une purification du système par dialyse aurait demandé l'utilisation d'une quantité trop importante de D<sub>2</sub>O) de façon à améliorer le contraste et ainsi l'intensité diffusée. La figure III-33 représente l'intensité diffusée par le copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PBLG<sub>41</sub> de concentration massique 0.1% ainsi que les

profils d'intensité théoriques développés par le même programme que pour les systèmes PMADAME-*b*-PGA.



**Figure III-32** Clichés de TEM à deux grossissements différents des vésicules de PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PBLG<sub>41</sub>

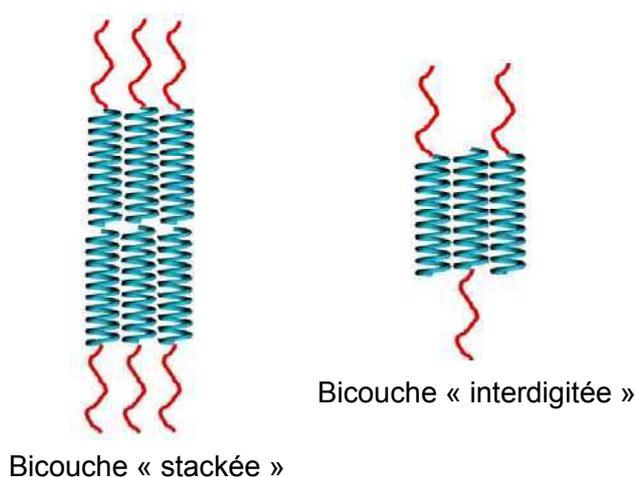
Les courbes de diffusion sont caractérisées par trois domaines de décroissance en intensité en  $I \sim q^{-2}$ ,  $I \sim q^{-4}$  et  $I \sim q^{-5/3}$  correspondant à des structures sphériques creuses comme des vésicules. La contribution des chaînes de PMADAME à la surface des vésicules n'étant pas négligeable, deux facteurs de forme différents ont été nécessaires pour ajuster de façon convenable les courbes expérimentales : (i) celui de la sphère creuse dure, (ii) et celui de la chaîne gaussienne pour tenir compte de la contribution des chaînes de PMADAME à l'interface.



**Figure III-33** : Intensité diffusée en SANS par les vésicules de PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PBLG<sub>41</sub> dans un mélange D<sub>2</sub>O/DMSO-*d*<sub>6</sub> (90/10) à 25°C ; ajustement avec les facteurs de forme d'une vésicule et d'une chaîne gaussienne

Nous avons pu déterminer la taille des vésicules ainsi que l'épaisseur de leur membrane à savoir  $R = 90\text{nm}$  et  $\delta = 20\text{nm}$  mais encore une fois, il nous a été impossible de déduire la longueur des chaînes de PMADAME en surface des vésicules en raison du chevauchement des deux facteurs de forme différents. Pour les mêmes raisons que précédemment (copolymères PMADAME-*b*-PGA), les valeurs correspondant à la taille globale des vésicules sont sensiblement inférieures à celles déterminées par DLS. Un point important à noter est que l'épaisseur de la membrane mesurée par SANS est due à la contribution d'une part de la membrane hydrophobe de PBLG mais également à celle de la couronne hydrophile formée par les chaînes de PMADAME. Cela signifie que pour avoir une idée précise de l'épaisseur de la membrane hydrophobe, nous devons soustraire la contribution des chaînes de PMADAME.

On peut imaginer deux cas possibles concernant le positionnement des blocs de PBLG dans la membrane hydrophobe des vésicules : le cas de la bicouche « stackée » ou « interdigitée » (schéma III-12). Cependant, le modèle de la bicouche « interdigitée » semble le plus approprié pour modéliser nos vésicules car cette conformation permet de laisser une aire interfaciale plus importante aux blocs PMADAME, limitant ainsi leur étirement, phénomène entropique défavorable. La membrane purement hydrophobe a donc une épaisseur d'environ 6nm.



**Schéma III-12 : Représentation schématique de la membrane hydrophobe des vésicules de PMADAME-*b*-PBLG selon le modèle de la bicouche « stackée » (à gauche) et « interdigitée » (à droite).**

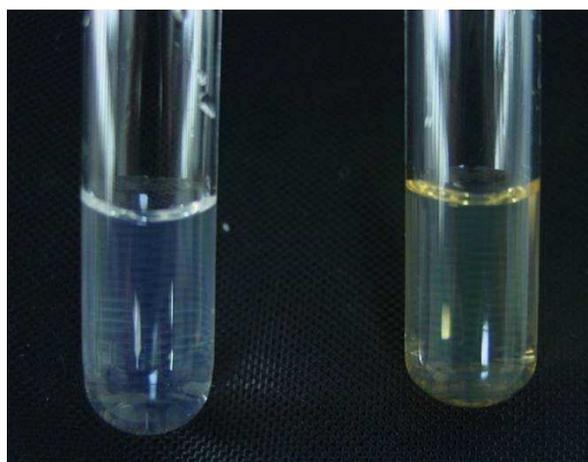
Nous voyons ici l'intérêt de la conformation en hélice- $\alpha$  des polypeptides quant à l'obtention de nanoparticules à morphologie vésiculaire. Comme nous l'avons longuement montré dans la partie bibliographique, ces blocs, de part leur rigidité, favorisent la formation de phases lamellaires, qui en solution donnent dans la plupart des cas des vésicules.<sup>43,44,45,46,47</sup>

### ***B-3-2 Incorporation de particules magnétiques dans la membrane hydrophobe des vésicules.***

Le but de notre étude est maintenant d'incorporer au sein même de la membrane des vésicules, des nanoparticules magnétiques hydrophobes. La préparation de ces particules a été réalisée par Olivier Sandre, chargé de recherches au CNRS à l'université Paris 6 (Li2C). Ces nanoparticules de maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) sont stabilisées avec un tensioactif hydrophobe de type di-ester phosphorique appelé Beycostat NE commercialisé par la société CECA.<sup>34</sup> Ces particules sont dispersées dans une solution de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et sont nommées S2- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

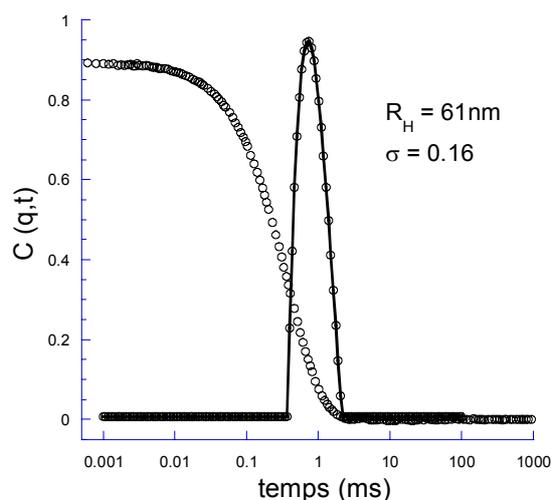
Leur diamètre magnétique a été déterminé à partir de la courbe d'aimantation magnétique  $M(H)$  :  $d_0^{\text{mag}} = 6.3\text{nm}$  et la polydispersité grâce à une distribution en Log-normal  $\sigma = 0.22$ . Leur taille a également été vérifiée par DLS ; ici, les valeurs obtenues sont supérieures ( $R_H = 18\text{nm}$ ,  $\sigma = 0.4$ ) à celles obtenues précédemment dans la mesure où cette technique prend en compte également la couronne de tensioactifs. Pour cette raison, nous avons choisi  $d_0 = 6.3\text{nm}$  comme taille caractéristique des particules magnétiques.

Concernant leur encapsulation dans la membrane hydrophobe des vésicules de PMADAME-*b*-PBLG, nous avons choisi d'ajouter la quantité nécessaire de S2- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  dans la solution organique de copolymères dans le DMSO. Après quelques minutes d'agitation à l'air libre pour extraire les traces de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , la solution est ajoutée goutte à goutte à l'aide d'un pousse seringue dans de l'eau distillée sous vive agitation. Nous avons travaillé avec un rapport massique copolymère/particules magnétiques = 10. Après ajout complet de la solution organique, le mélange est dialysé contre de l'eau distillée pour extraire le DMSO et on récupère une solution homogène de couleur orangée. (Figure III-34).



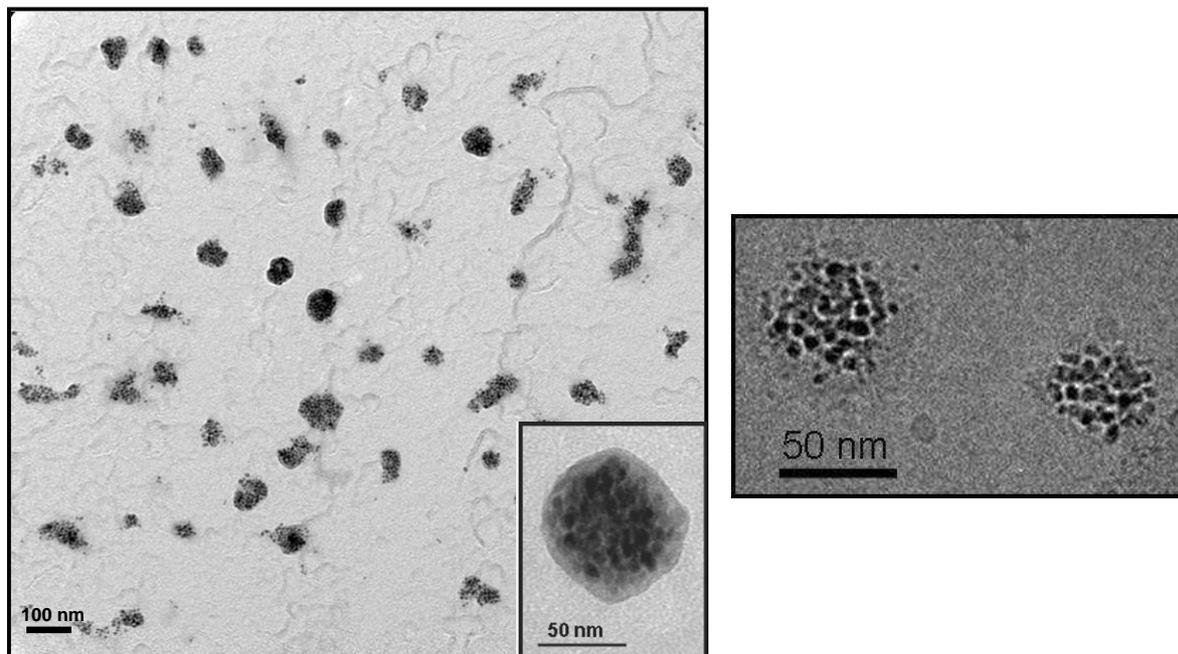
***Figure III-34 : photos représentant : à gauche, une solution de vésicules de copolymères à blocs PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PBLG<sub>41</sub> obtenues par nanopréciipitation et, à droite, une solution de micelles sphériques magnétiques obtenues à partir des copolymères PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PBLG<sub>41</sub> en présence de particules magnétiques hydrophobes également par nanopréciipitation.***

Cette solution est analysée par DLS à  $90^\circ$  et on observe la présence d'une population étroite et monomodale de  $R_H = 61\text{nm}$  et  $\sigma = 0.16$  (figure III-35).



**Figure III-35 : Fonction d'auto-corrélation et distribution du temps de relaxation (Contin) pour une solution du copolymère PMADAME<sub>85</sub>-b-PBLG<sub>41</sub> (c=0.1% mas.) en présence de 0.1eq de particules magnétiques.**

Si on compare ces tailles à celles observées précédemment, c'est-à-dire sans l'utilisation de particules magnétiques ( $R_H = 95\text{nm}$ ), on remarque qu'elles sont plus faibles ce qui semble pour le moment difficile à expliquer. Afin de mieux comprendre cette différence, nous avons imagé ces particules par TEM (figure III-36). Nous sommes en présence de particules individuelles correctement dispersées, ce qui confirme les résultats obtenus par DLS, mais il semble que la morphologie vésiculaire ait été modifiée du fait de la présence des particules magnétiques.



**Figure III-36 : Clichés TEM (à gauche) et cryo-TEM (à droite) de micelles magnétiques à partir des copolymères à blocs PMADAME<sub>85</sub>-b-PBLG<sub>41</sub> et des particules magnétiques Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.1 eq).**

En effet, les sphères creuses obtenues précédemment semblent maintenant homogènes et remplies en leur centre ; nous serions donc en présence de sphères pleines. Toutefois, il semble difficile de conclure uniquement en tenant compte de cette observation car il peut être difficile d'appréhender les différences visuelles entre une vésicule et une micelle contenant des particules magnétiques en leur coeur hydrophobe.

Des études par SANS ont donc été nécessaires pour confirmer un éventuel changement de morphologie. Pour ce faire, nous avons préparé des solutions dans l'eau légère, les particules de maghémite ayant une densité de longueur de diffusion trop proche de celle de l'eau lourde ( $\rho_{D_2O} = 6.38 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$ ,  $\rho_{H_2O} = -5.59 \times 10^{-9} \text{ cm}^{-2}$  et  $\rho_{Fe_2O_3} = 6.96 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$ ). Un deuxième paramètre important est que nous avons du concentrer les solutions afin d'augmenter l'intensité et obtenir des spectres avec de meilleures statistiques. Deux possibilités s'offrent à nous : (i) augmenter la quantité de copolymères et de particules magnétiques durant la nanoprécipitation ou (ii) concentrer la solution après la formation des nanoparticules. Nous avons opté pour la seconde solution car les nanoparticules formées sont bien définies dans cette gamme de concentration. Les solutions ont donc été concentrées par la suite par centrifugation, extraction d'une partie du solvant et redispersion. Cette technique s'est avérée très reproductible et très efficace dans la mesure où les tailles observées après centrifugation sont du même ordre de grandeur qu'avant avec une polydispersité comparable.

Les analyses ont montré la présence d'un facteur de forme correspondant à une sphère pleine. En effet, nous n'observons pas de pente en  $q^{-2}$  caractéristique de phases lamellaires. Nous avons pu ajuster la courbe expérimentale à l'aide d'une courbe théorique ayant comme facteur de forme celui d'une sphère dure de  $R = 18\text{nm}$  et  $\sigma = 0.3$  (figure III-37 a). Il est donc clair que l'incorporation de particules magnétiques sphériques dans la solution de copolymères à blocs PMADAME-*b*-PBLG tend à changer la morphologie de ces dernières pour donner des objets de type micelles sphériques. Nous tenterons d'expliquer ce phénomène par la suite.

Tout d'abord, intéressons nous à la gamme des grands  $q$  où nous pouvons remarquer sur la figure III-37a une augmentation de l'intensité qui pourrait correspondre à un pic de structure provenant du confinement des particules magnétiques à l'intérieur des micelles.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une solution en augmentant la quantité de S2-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à 0.2eq par rapport à la quantité de copolymère. La figure III-37b montre l'intensité diffusée par SANS de cette solution. Nous pouvons tout d'abord remarquer que l'allure de la courbe est la même que précédemment (figure III-37a) donc le fait d'augmenter la quantité de particules magnétiques n'a pas d'influence sur la morphologie des agrégats micellaires. En revanche, on peut observer ici un pic de structure provenant du compactage des particules magnétiques confinées dans le coeur hydrophobe des micelles. Pour tenter de les quantifier, nous avons considéré que le rayon obtenu par SANS correspond uniquement au rayon du coeur hydrophobe de PBLG. En effet, le contraste du Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dans l'eau légère est plus important que celui du PMADAME. On considère donc que les chaînes de PMADAME sont « invisibles » en SANS ce qui se vérifie par la différence des tailles obtenues par DLS ( $R_H = 61\text{nm}$ ) qui sont plus importantes que celles obtenues par SANS ( $R = 18\text{nm}$ ).

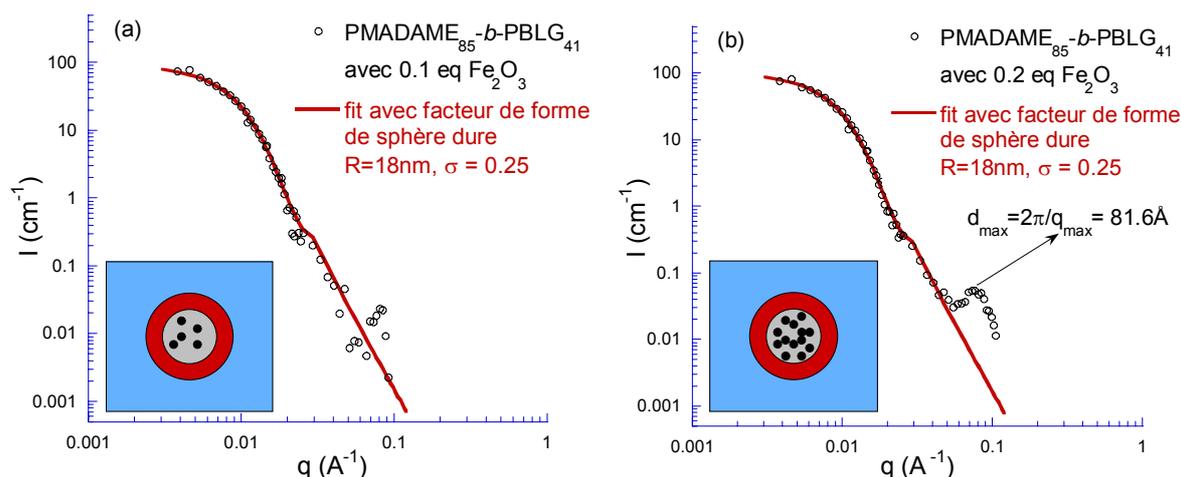


Figure III-37 : Intensité diffusée en SANS dans de l'eau légère à 25°C par les micelles de PMADAME<sub>85</sub>-b-PBLG<sub>41</sub> contenant (a) 0.1eq et (b) 0.2eq de S2-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; ajustement avec un facteur de forme d'une sphère dure.

Grâce à cette hypothèse, il nous est possible de déterminer la fraction volumique des particules magnétiques dans le cœur de PBLG,  $\Phi = 31\%$ , grâce à la relation :

$$\Phi_{ferro}^{local} = \frac{\pi}{6} \left( \frac{d_0}{d_{max}} \right)^3$$

Cette formule exprime simplement que les particules sont « à touche-touche ». La distance de répétition centre à centre est donnée par le pic de corrélation en SANS (figure III-37b) :  $d_{max} = 2\pi/q_{max}$ . La fraction volumique est calculée comme le rapport entre le volume d'une particule,  $\pi d_0^3/6$ , et celui de la maille ( $d_{max}^3$ ).

Cette forte densité de particules encapsulées est confirmée par les clichés de TEM et cryo-TEM (figure III-36). A partir de là, nous avons pu également déterminer le nombre de particules magnétiques par micelles, qui s'élève à 45, grâce à la relation suivante :

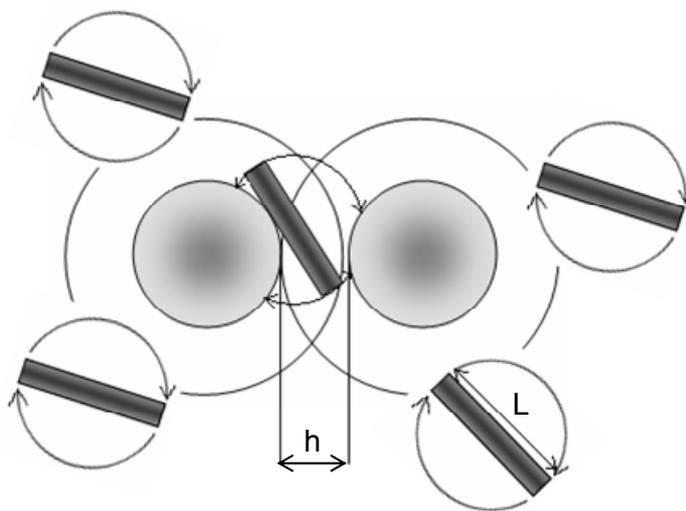
$$N_{part} = \Phi_{ferro}^{local} \left( \frac{R_c}{R_p} \right)^3$$

Avec  $R_c$  le rayon du cœur des micelles déterminé par SANS et  $R_p$  le rayon des particules magnétiques.

Tentons à présent d'expliquer le changement de morphologie des copolymères à blocs PMADAME-*b*-PBLG lors de l'ajout des particules magnétiques. La méthode utilisée pour obtenir ces nanoparticules est la nanoprécipitation, c'est-à-dire que l'on rajoute une solution organique (dans le DMSO) de copolymères et de particules magnétiques dans de l'eau sous vive agitation. Considérons une goutte de cette solution organique pénétrant dans la phase aqueuse. Le DMSO va donc diffuser dans le milieu, se traduisant par une concentration des gouttes organiques. A partir d'une certaine

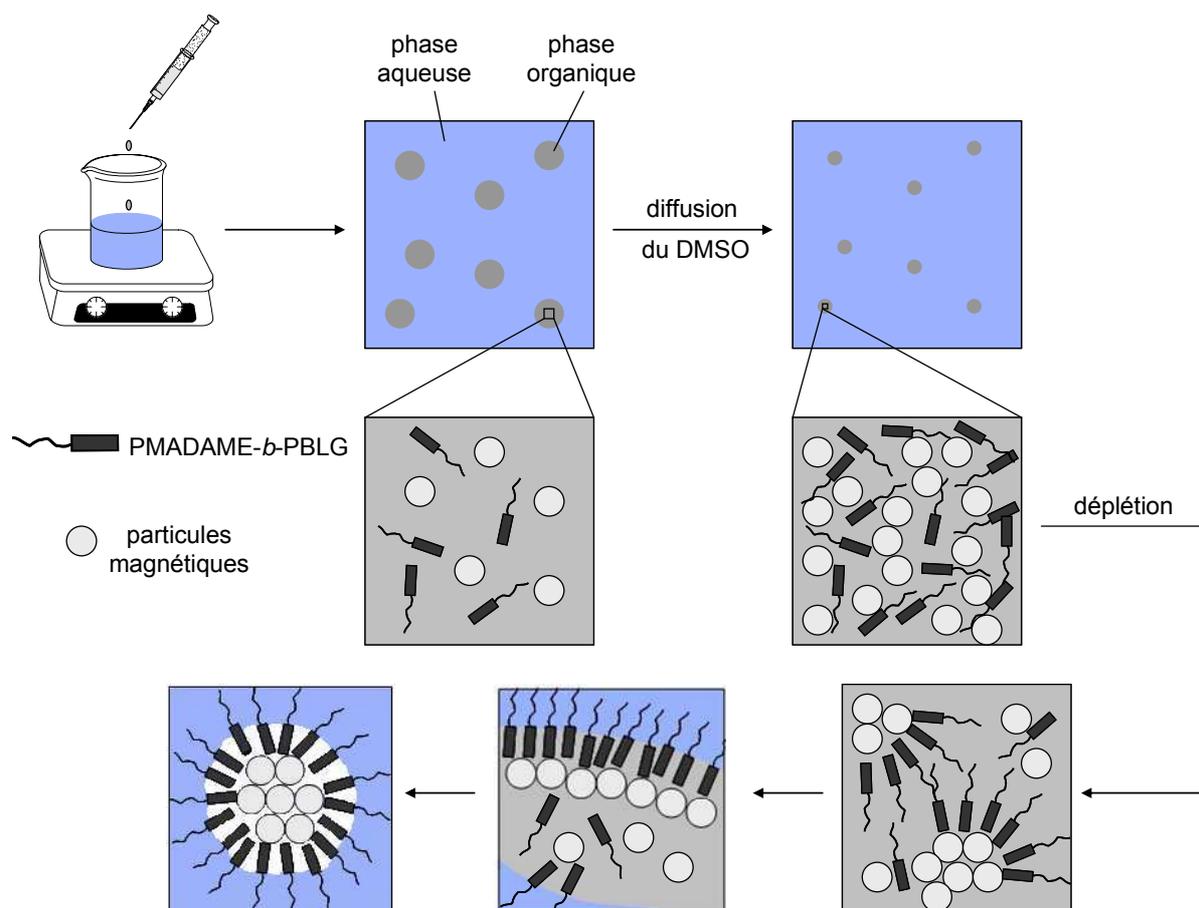
concentration, les forces de déplétion entrent en jeu, c'est-à-dire que les particules magnétiques ont une influence sur l'organisation des blocs de PBLG par analogie avec les différentes études réalisées sur les mélanges de bâtonnets et de sphères dures<sup>48,49,50</sup> (dans notre système, les segments de PBLG représentent les bâtonnets et les particules magnétiques, les sphères dures). En effet, il a été montré qu'à partir d'une certaine concentration, le mélange de bâtonnet et de sphères dures pouvait induire la formation de nouvelles phases d'organisation dans une solution de cristal-liquide, résultant de leur séparation de phase.<sup>48</sup>

Quand un bâtonnet de longueur  $L$  pénètre entre deux sphères proches d'une distance  $h$  inférieure à  $L$ , sa mobilité est réduite (schéma III-13). Cette perte d'entropie est défavorable et est compensée par un phénomène de déplétion qui permet l'expulsion du bâtonnet hors du gap situé entre les deux sphères, lui conférant une plus grande liberté conformationnelle. Le fait d'augmenter la concentration en bâtonnets crée une pression osmotique qui va contraindre les sphères dures à se rapprocher, tout en expulsant les bâtonnets de leur environnement proche.



**Schéma III-13 : Mise en évidence de la liberté réduite d'un bâtonnet présent entre deux sphères dures.**

Grâce à ce phénomène, Adams a pu mettre en évidence la formation de nouvelles phases cristal-liquides comme par exemple des phases lamellaires mixtes.<sup>48</sup> Nous pensons donc que les forces de déplétion sont à l'origine du changement de structure de nos nanoparticules. En effet, lors de la nanoprécipitation, une goutte entrant dans l'eau va tout d'abord être divisée sous l'action de l'agitation mécanique. Dans le même temps, le DMSO va diffuser à travers la phase aqueuse. Au sein même d'une microgouttelette de copolymères et de particules magnétiques, la concentration de ces derniers est de plus en plus importante au fur et à mesure que le DMSO diffuse. Ainsi, les forces de déplétion augmentent, forçant les sphères à se ségréger des blocs rigides de PBLG. Le fait d'utiliser des copolymères amphiphiles permet de stabiliser l'interface entre la phase inorganique hydrophobe de nanoparticules et l'eau, le PBLG se présentant à l'interface avec les nanoparticules magnétiques hydrophobes, et le bloc PMADAME interagissant avec la phase aqueuse. Le schéma III-14 représente schématiquement le mécanisme permettant la formation des micelles magnétiques sphériques.



**Schéma III-14 : Voie possible conduisant à la formation de micelles magnétiques sphériques à partir des copolymères à blocs amphiphiles PMADAME-*b*-PBLG.**

A ce jour, il n'existe que peu d'exemples de vésicules comportant des nanoparticules magnétiques dans leur membrane hydrophobe. Lecommandoux<sup>34</sup> et Förster<sup>35</sup> y sont en effet parvenus mais en utilisant un polymère hydrophobe très flexible (polybutadiène et polyisoprène respectivement) possédant une  $T_g$  très inférieure à la température ambiante. Dans ce cas, les forces de déplétion ne sont pas aussi importantes que dans le cas d'un bâtonnet, et donc, ne provoquent pas un changement de conformation des vésicules après incorporation des particules magnétiques.

### **B-3-3 Conclusion**

Les copolymères à blocs amphiphiles PMADAME-*b*-PBLG ont la faculté de pouvoir s'auto-assembler dans l'eau pour former des nanoparticules dont les caractéristiques varient en fonction de la méthode choisie pour leur mise en solution. Il s'avère que la nanoprécipitation est la technique la plus adaptée pour l'obtention d'agrégats micellaires bien définis. Dans ce cas, les copolymères à blocs s'auto-assemblent pour donner des vésicules en milieu aqueux dont la membrane hydrophobe est formée par les segments de PBLG dans leur conformation en hélice- $\alpha$ , et la couronne hydrophile stabilisante par les chaînes de PMADAME partiellement protonées.

L'introduction de particules magnétiques hydrophobes durant l'étape de nanoprécipitation induit un changement de conformation des nanoparticules formées en micelles sphériques. Nous

pensons que ce phénomène est dû à l'attraction des sphères entre elles par des forces de déplétion sous l'action des segments rigides de PBLG. Nous sommes donc parvenus à préparer des particules de copolymères renfermant en leur cœur des particules magnétiques, pouvant servir d'agent de contraste, de ciblage ou encore pour des expériences d'hyperthermie.

Les perspectives sont donc multiples. Tout d'abord, le fait d'incorporer des nanoparticules magnétiques dans des nano-objets permet de rendre ces derniers « visibles » grâce notamment à des techniques d'imagerie telle que l'IRM. On pourrait dans un premier temps effectuer ces premières analyses sur nos micelles magnétiques à base de PMADAME-*b*-PBLG. La deuxième expérience intéressante à réaliser sur ces nanoparticules serait d'étudier leur capacité d'aimantation en vue de pouvoir les « guider à distance » grâce à l'utilisation d'un aimant. Une application directe serait de pouvoir injecter, *in vivo*, ces nanoparticules magnétiques, contenant également des principes actifs et de pouvoir les amener jusqu'à la zone à traiter par aimantation. Ainsi, différentes voies de relargage sont possibles

- (i) la première consiste en l'application d'un champ de radiofréquence qui induit un échauffement local, dû à la dissipation thermique produit par la mise en rotation des nanoparticules magnétiques, détruisant les cellules malades
- (ii) cet échauffement peut également provoquer la précipitation de la couronne thermosensible (dans notre cas la PMADAME) et ainsi favoriser le relargage des principes actifs

## Références bibliographiques

- <sup>1</sup> Shusharina, P.; Linse, P.; Khokhlov, A. R. *Macromolecules* **2000**, *33*, 8488.
- <sup>2</sup> Chécot, F.; Brûlet, A.; Oberdisse, J.; Gnanou, Y.; Mondain-Monval, O.; Lecommandoux, S. *Langmuir* **2005**, *21*, 4308.
- <sup>3</sup> Pedersen, J. S. *J. Phys. IV* **1993**, *3*, 491.
- <sup>4</sup> Oberdisse, J.; Couve, C.; Appell, J.; Berret, J. F.; Ligoure, C.; Porte, G. *Langmuir* **1996**, *12*, 1212.
- <sup>5</sup> Porod, G. *Kolloid Z.* **1951**, *124*, 82.
- <sup>6</sup> Goldmints, I.; von Gottberg, F. K.; Smith, K. A.; Hatton, T. A. *Langmuir* **1997**, *13*, 3659.
- <sup>7</sup> Goldmints, I.; Yu, G.; Booth, C.; Smith, K. A.; Hatton, T. A. *Langmuir* **1999**, *15*, 1651.
- <sup>8</sup> (a) Pedersen, J. S.; Laso, M.; Schurtenberger, P. *Phys. Rev. E* **1996**, *54*, 5917. (b) Pedersen, J. S.; Svanborg, C.; Almdal, K.; Hamley, S. W.; N., Y. R. *Macromolecules* **2003**, *36*, 416.
- <sup>9</sup> Pedersen, J. S. *J. Appl. Crystallogr.* **2000**, *33*, 637.
- <sup>10</sup> Debye, P. *J. Phys. Colloid Chem.* **1947**, *51*, 18.
- <sup>11</sup> Virtanen, J.; Tenhu, H. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5970.
- <sup>12</sup> Lozinsky, V. I.; Simenel, I. A.; Kulakova, V. K.; Kurskaya, E. A.; Babushkina, T. A.; Klimova, T. P. *Macromolecules* **2003**, *36*, 7308.
- <sup>13</sup> Rungsardthong, U.; Ehtezazi, T.; Bailey, L.; Armes, S. P.; Garnett, M. C.; Stolnik, S. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 683.
- <sup>14</sup> Markland, P.; Amidon, G. L.; Yang, V. C. *Int. J. Pharm.* **1999**, *178*, 183.
- <sup>15</sup> Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4177.
- <sup>16</sup> Bekturov, E. A.; Kudaibergenov, S. E.; Rafikov, S. R. *Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1990**, *C30*, 233.
- <sup>17</sup> Merle, Y. J. *Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3092.
- <sup>18</sup> Patrickios, C. S.; Hertler, W. R.; Abbot, N. L.; Hatton, T. A. *Macromolecules* **1994**, *27*, 930.
- <sup>19</sup> Rao, J.; Luo, Z.; Ge, Z.; Liu, H.; Liu, S. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3871.
- <sup>20</sup> Gohy, J. F.; Creutz, S.; Garcia, M.; Mahltig, B.; Stamm, M.; Jérôme, R. *Macromolecules* **2000**, *33*, 6378.
- <sup>21</sup> Babin, J. Synthèse et auto-assemblage de copolymères amphiphiles en étoile de type "miktoarm". Bordeaux 1, 2005.
- <sup>22</sup> Zhang, X.; Li, J.; Li, W.; Zhang, A. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3557.
- <sup>23</sup> Discher, D. E.; Eisenberg, A. *Science* **2002**, *297*, 967.
- <sup>24</sup> Engin, E.; Leeper, D. B.; Cater, J. R.; Thistlethwaite, A. J.; Tupchong, L.; McFarlane, J. D. *Int. J. Hyperthermia* **1995**, *11*, 211.
- <sup>25</sup> Singh, P. K.; Singh, V. K.; Singh, M. *e-polymers* **2007**, *30*, 1.
- <sup>26</sup> Kudaibergenov, S.; Jaeger, W.; Laschewsky, A. *Adv. Polym. sci.* **2006**, *201*, 157.
- <sup>27</sup> Schulz, D. N.; Peiffer, D. G.; Agarwal, P. K.; Larabee, J.; Kaladas, J. J.; Soni, L.; Handwerker, B.; Garner, R. T. *Polymer* **1986**, *27*, 1734.

- <sup>28</sup> Mary, P.; Bendejacq, D. D.; Labeau, M. P.; Dupuis, P. J. *Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7767.
- <sup>29</sup> Butun, V.; Bennett, C. E.; Vamvakaki, M.; Lowe, A. B.; Billingham, N. C.; Armes, S. P. *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 1693.
- <sup>30</sup> Chen, L.; Honma, Y.; Mizutani, T.; Liaw, D. J.; Gong, J. P.; Osada, Y. *Polymer* **2000**, *41*, 141.
- <sup>31</sup> Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E. *J. Mat. Chem.* **2004**, *14*, 2161.
- <sup>32</sup> Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064.
- <sup>33</sup> Martina, M. S.; Fortin, J. P.; Menager, C.; Clement, O.; Barratt, G.; Grabielle-Madelmont, C.; Gazeau, F.; Cabuil, V.; Lesieur, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10676.
- <sup>34</sup> Lecommandoux, S.; Sandre, O.; Chécot, F.; Rodriguez-Hernandez, J.; Perzynski, R. *Adv. Mat.* **2005**, *17*, 712.
- <sup>35</sup> Krack, M.; Hohenberg, H.; Kornowski, A.; Lindner, P.; Weller, H.; Förster, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7315.
- <sup>36</sup> Allen, C.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. *Colloids and Surf. B: Biointerfaces* **1999**, *16*, 3.
- <sup>37</sup> Block, H., *Poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate) and other glutamic acid containing polymers*. Gordon et Breach Science Publishers: New York, 1983.
- <sup>38</sup> Wanatabe, J.; Uematsu, I. *Polymer* **1984**, *25*, 1711.
- <sup>39</sup> Klok, H. A.; Langenwalter, J. F.; Lecommandoux, S. *Macromolecules* **2000**, *33*, 7819.
- <sup>40</sup> Lecommandoux, S.; Achard, M.-F.; Langenwalter, J. F.; Klok, H. A. *Macromolecules* **2001**, *34*, 9100.
- <sup>41</sup> Meng, F.; Hiemstra, C.; Engbers, G. H. M.; Feijen, J. *Macromolecules* **2003**, *36*, 3004.
- <sup>42</sup> Sanda, F.; Gao, G.; Masuda, T. *Macromol. Bioscience* **2004**, *4*, 570.
- <sup>43</sup> Schlaad, H. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *202*, 53.
- <sup>44</sup> Rodriguez-Hernandez, J.; Lecommandoux, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2026.
- <sup>45</sup> Holowka, E. P.; Pochan, D. J.; Deming, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12423.
- <sup>46</sup> Bellomo, E. G.; Wyrsta, M. D.; Pakstis, L.; Pochan, D. J.; Deming, T. J. *Nat Mater* **2004**, *3*, 244.
- <sup>47</sup> Lazzari, M.; Liu, G.; Lecommandoux, S., *Block copolymers in Nanoscience*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: Darmstadt, **2006**.
- <sup>48</sup> Adams, M.; Dogic, Z.; Keller, S. L.; Fraden, S. *Nature* **1998**, *393*, 349.
- <sup>49</sup> Koenderink, G. H.; Vliegenthart, G. A.; Kluijtmans, S. G. J. M.; van Blaaderen, A.; Philipse, A. P.; Lekkerkerker, H. N. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 4693.
- <sup>50</sup> Oversteegen, S. M.; Wijnhoven, J. G. E. J.; Vonk, C.; Lekkerkerker, H. N. W. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18158.

# Chapitre IV

## Partie expérimentale



<b>Technique expérimentale .....</b>	<b>193</b>
<b>A- Introduction aux phénomènes de diffusion.....</b>	<b>193</b>
<b>B- La diffusion de la lumière.....</b>	<b>196</b>
B-1 La diffusion dynamique de la lumière (DLS). .....	196
<b>C- La diffusion des neutrons aux petits angles (SANS).....</b>	<b>198</b>
<b>Partie expérimentale .....</b>	<b>202</b>
<b>A- Réactifs .....</b>	<b>202</b>
<b>B- Synthèse des copolymères à blocs Jeffamine-b-PGA. ....</b>	<b>202</b>
B-1 Formation des blocs PBLG (1).....	202
B-2 Déprotection (2) .....	202
<b>C- Synthèse des copolymères à blocs PMADAME-b-PBLG et PBLG-b-PTFALys .....</b>	<b>203</b>
C-1 Synthèse des amorceurs .....	203
C-1-1 Synthèse du 2-(2-azidoéthoxy)éthanol.....	203
C-1-2 Synthèse du bromoisobutyrate de 2-(2-azidoéthoxy)éthyle (3) .....	203
C-1-3 Synthèse du bromoisobutyrate de propargyl (4). .....	203
C-1-4 Synthèse du 1-azido-3-aminopropane (5).....	204
C-2 Synthèse des polymères $\alpha$ - $\omega$ -fonctionnels .....	204
C-2-1 Synthèse des homopolymères PMADAME-CCH et PMADAME-N <sub>3</sub> (6) et (7) .....	204
C-2-2 Synthèse des homopolymères PBLG-CCH, PBLG-N <sub>3</sub> , PTFALys-CCH et PTFALys-N <sub>3</sub> (8), (9), (10), (11).....	204
C-3 Synthèse des copolymères à blocs par « chimie click » .....	205
C-3-1 Synthèse des copolymères à blocs PMADAME-b-PBLG (12) et (13).....	205
C-3-2 Synthèse des copolymères à blocs PBLG-b-PTFALys (14) et (15).....	205
<b>D- Synthèse des copolymères à blocs modifiés à partir de PMADAME-b-PBLG .....</b>	<b>206</b>
D-1 Synthèse des copolymères à blocs PMADAME-b-PGA (16).....	206
D-2 Synthèse des copolymères à blocs PSPE-b-PGA (17).....	206
<b>E- Caractérisation moléculaires des amorceurs, polymères et copolymères à blocs. ....</b>	<b>206</b>
E-1 Chromatographie d'exclusion stérique (CES). .....	206
E-2 Résonance magnétique nucléaire (RMN). .....	206
E-3 Spectroscopie IRTF .....	207

E-4 Analyses Enthalpique Différentielle (DSC).....	207
<b>F- Propriétés physico-chimiques des copolymères auto-assemblés.....</b>	<b>207</b>
F-1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	207
F-2 Microscopie électronique en transmission (TEM).....	207
F-3 Diffusion des neutrons aux petits angles (SANS).....	207
F-4 Spectroscopie UV/Vis.....	208
F-5 Mesure de mobilité électrophorétique .....	208
F-6 Dosages conductimétrique et pH-métrique .....	208

## Technique expérimentale

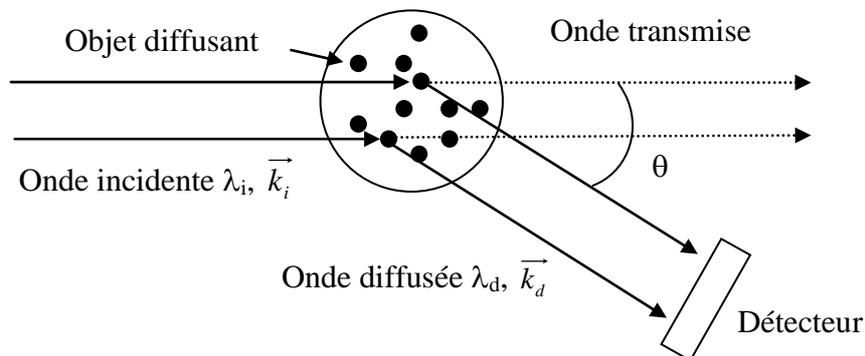
### A- Introduction aux phénomènes de diffusion

Les techniques expérimentales basées sur les phénomènes de diffusion du rayonnement permettent d'obtenir des informations sur la structure de la matière. Elles sont particulièrement utilisées en science des polymères pour la caractérisation des macromolécules de masse molaire élevée. La diffusion est l'une des conséquences des interactions entre la matière et le rayonnement. En effet, lorsqu'un milieu diffusant est traversé par un rayonnement incident, chaque élément de volume renvoie dans toutes les directions de l'espace une partie du faisceau incident. Dans un milieu homogène, ces ondes se recombinaient pour reconstruire le rayon incident. Ce n'est pas le cas dans un milieu inhomogène où l'intensité du faisceau diffusé dépend de la géométrie des éléments diffusants et des interactions entre ces éléments.

On distingue trois techniques principales de diffusion selon le rayonnement incident : la diffusion de la lumière, la diffusion des rayons X et la diffusion des neutrons. Les rayonnements électromagnétiques (lumière, rayons X) sont diffusés par les électrons présents dans le matériau alors que les neutrons sont diffusés par les noyaux des différents atomes constituant l'échantillon. Ces techniques diffèrent également par la longueur d'onde  $\lambda_i$  du faisceau incident :

- Diffusion de la lumière :  $4000 \text{ \AA} < \lambda_i < 7000 \text{ \AA}$
- Diffusion des neutrons :  $1 \text{ \AA} < \lambda_i < 20 \text{ \AA}$
- Diffusion des rayons X :  $0,2 \text{ \AA} < \lambda_i < 2 \text{ \AA}$

Une expérience typique de diffusion du rayonnement, consiste à envoyer un faisceau incident monochromatique de longueur d'onde  $\lambda_i$  et de vecteur d'onde  $\vec{k}_i$  sur l'échantillon à étudier et à analyser le rayonnement diffusé ( $\lambda_d$  et  $\vec{k}_d$ ) en fonction de l'angle d'observation  $\theta$ , comme le montre le Schéma III-1.



**Schéma IV-1 : principe d'une expérience de diffusion du rayonnement.**

Les modules des vecteurs d'onde incident  $\vec{k}_i$  et diffusé  $\vec{k}_d$  sont définis par les relations suivantes :

$$\left| \vec{k}_i \right| = \frac{2\pi n}{\lambda_i} \quad \left| \vec{k}_d \right| = \frac{2\pi n}{\lambda_d} \quad (\text{Equation IV-1})$$

avec  $\lambda_i$  et  $\lambda_d$ , respectivement, les longueurs d'onde incidente et diffusée dans le vide et  $n$  l'indice de réfraction du milieu. L'intensité diffusée dans une direction donnée est définie par le vecteur d'onde de transfert  $\vec{q}$  appelé également vecteur de diffusion :

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_d \quad (\text{Equation IV-2})$$

Dans le cas d'une diffusion élastique (c'est-à-dire sans transfert d'énergie), les longueurs d'onde incidente et diffusée sont égales, et les modules des vecteurs d'onde sont égaux :

$$\left| \vec{k}_i \right| = \left| \vec{k}_d \right| \quad (\text{Equation IV-3})$$

Ainsi, nous pouvons écrire la norme de  $\vec{q}$  en fonction de l'angle de diffusion  $\theta$  qui détermine la direction d'observation :

$$\left| \vec{q} \right| = \frac{4\pi n}{\lambda_i} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{Equation IV-4})$$

Cette relation montre que le vecteur d'onde de transfert  $\vec{q}$  est inversement proportionnel à  $\lambda_i$ . Or, nous venons de voir, que les longueurs d'onde incidentes diffèrent selon les techniques utilisées. Les domaines de  $q$  accessibles dépendent donc du type de rayonnement :

- Diffusion de la lumière :  $5 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}^{-1} < q < 3 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$
- Diffusion des neutrons et rayon X :  $2 \cdot 10^{-4} \text{ \AA}^{-1} < q < 5 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$

Les trois techniques de diffusion sont donc complémentaires et leur combinaison donne accès à un domaine de vecteur d'onde de transfert  $q$  assez large pour permettre de caractériser des échantillons polymères à différentes échelles spatiales. Le contraste est un paramètre essentiel à prendre en compte lors d'expériences de diffusion du rayonnement. En effet, tout comme en photographie où cette notion est essentielle pour obtenir une image nette, le contraste en diffusion va permettre de différencier l'intensité diffusée par l'échantillon de celle diffusée par l'environnement (par exemple le solvant). Le contraste trouve des origines différentes selon les techniques de diffusion (Tableau III-1).

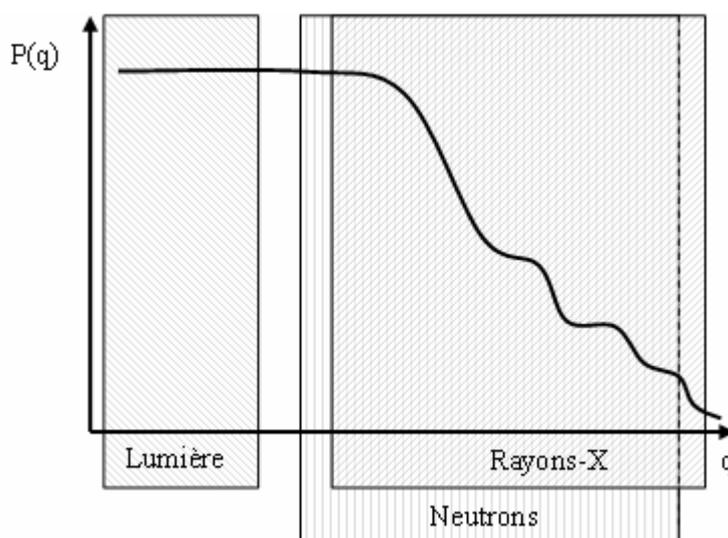
Technique de diffusion	Origine du Contraste
Lumière	Différence d'indice de réfraction
Rayon X	Différence de densité électronique
Neutrons	Différence de longueur de diffusion cohérente entre les atomes

**Tableau IV-1 : Origine du contraste en fonction des techniques de diffusion.**

L'intensité diffusée mesurée lors d'expérience de diffusion peut être simplifiée à l'expression suivante :

$$I_{théo}(q) = \text{Contraste} \times P(q) \times S(q) \quad (\text{Equation IV-5})$$

avec  $P(q)$  le facteur de forme des particules et  $S(q)$  le facteur de structure. Dans le cas de systèmes dilués, ce qui correspond à notre cas dans ce chapitre, le facteur de structure est égal à 1 et l'intensité diffusée est fonction uniquement du facteur de forme. Prenons le cas d'une solution diluée de micelles de copolymère étudiée à différents domaines de  $q$ . Son facteur de forme ( $\approx$ intensité diffusée) en fonction de  $q$  est présenté schématiquement sur le Schéma III-2 ainsi que les domaines d'exploitations des trois techniques de diffusion : lumière, rayons-X, neutrons.



**Schéma IV-2 : Représentation schématique du facteur de forme de micelles en solution diluée et domaines d'exploitations des techniques de diffusion : lumière, neutrons, rayons-X.**

L'inverse du module du vecteur d'onde,  $q^{-1}$ , peut être assimilé à l'échelle d'observation du système.

Aux faibles valeurs de  $q$ , l'échelle d'observation est large, le pouvoir séparateur est faible et les micelles sont pratiquement des points (Schéma IV-3a). Le nombre et la masse molaire des agrégats sont les grandeurs caractéristiques pouvant être extraites dans de telles conditions essentiellement par diffusion de la lumière.

Aux valeurs de  $q$  plus importantes, les micelles ne sont plus ponctuelles et leurs dimensions globales deviennent mesurables (Schéma IV-3b). Les grandeurs alors mesurées sont les rayons de giration ( $R_g$ ) et hydrodynamique ( $R_H$ ) par diffusion de la lumière, des rayons X, et des neutrons.

Aux grandes valeurs de  $q$ , la structure interne des micelles est maintenant observable (Schéma IV-3c) et les grandeurs accessibles expérimentalement sont le rayon du cœur ( $R_c$ ) et l'épaisseur de la couronne  $L$  (diffusion des neutrons et rayons X).

Finalement, aux très grandes valeurs de  $q$ , la conformation interne des chaînes polymères constituant les micelles peut être observée (Schéma IV-3d). Les distances caractéristiques mesurables sont de l'ordre de quelques unités monomères (diffusion des neutrons et rayons X).

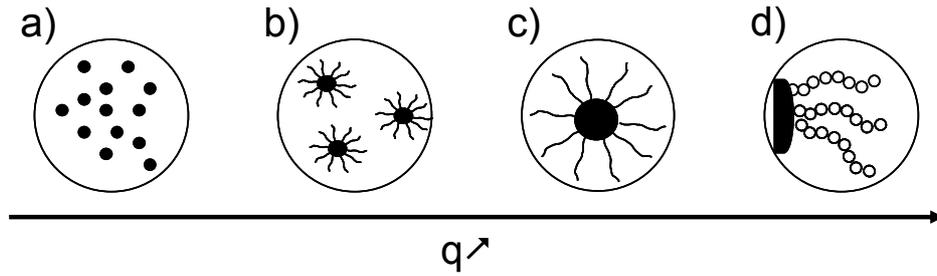


Schéma IV-3 : Corrélation entre  $q$  et l'échelle d'observation

## B- La diffusion de la lumière.

Le phénomène de diffusion de la lumière provient de l'interaction du champ électrique de l'onde lumineuse incidente avec les éléments constituant le matériau illuminé. Cette interaction induit localement une polarisation oscillante. Il se crée alors une multitude de sources lumineuses au sein du matériau qui vont réémettre avec une longueur d'onde proche de celle de l'éclairement incident. La diffusion de la lumière est une technique très utilisée pour étudier la dynamique et la structure des solutions macromoléculaires et colloïdales.

Selon le traitement de l'intensité diffusée, on distingue deux types d'expériences : la diffusion élastique ou statique de la lumière (SLS) et la diffusion quasi-élastique ou dynamique (DLS). Nous nous limiterons dans cette partie à l'étude de la DLS.

### B-1 La diffusion dynamique de la lumière (DLS).

On s'intéresse ici à la fluctuation dans le temps de la lumière diffusée par la matière. Le mouvement perpétuel des particules provoque des fluctuations statistiques d'intensité  $I(q)$  en fonction du temps. De telles fluctuations nous donnent des informations très importantes sur la dynamique des particules diffusantes, et sont directement dépendantes des propriétés de ces dernières, à savoir leur forme, leur taille... Cependant, en diffusion dynamique de la lumière, les informations dynamiques ne sont pas mesurées directement. C'est la fonction d'auto-corrélation temporelle normée de l'intensité diffusée  $g^2(q,t)$ , pour un angle d'observation donné, qui est accessible.

$$g^2(q,t) = \frac{\langle I(q,0)I(q,t) \rangle}{\langle I(q,0) \rangle^2} \quad (\text{Equation IV-6})$$

Cette fonction d'auto-corrélation indique la manière dont sont dépendantes les valeurs de l'intensité diffusée à deux instants différents. Généralement,  $g^2(q,t)$  décroît lorsque  $t$  augmente. En effet, après un temps suffisamment long, la marche au hasard des particules induit une perte de mémoire du système et la corrélation avec l'instant zéro devient inexistante. Si le champ électrique obéit à une distribution gaussienne, on peut relier par la relation de Siegert les fonctions d'auto-corrélation temporelles normées du champ électrique diffusé,  $g^1(q,t)$ , et de l'intensité diffusée,  $g^2(q,t)$  :

$$g^2(q,t) = 1 + |g^1(q,t)|^2 \quad (\text{Equation IV-7})$$

Cette fonction  $g^1(q,t)$  est l'inverse de la transformée de Laplace du spectre des temps de relaxation.

En conséquence, connaissant  $g^2(q,t)$ , le ou les temps de relaxation peuvent être déterminés pour une valeur du vecteur d'onde de transfert  $q$ . Il existe plusieurs méthodes pour analyser les fonctions d'auto-corrélations.

La plus simple pour le cas de particules monodisperses consiste à décrire la fonction d'auto-corrélation par une simple exponentielle :

$$g^1(q,t) = Ae^{-\Gamma t} \quad (\text{Equation IV-8})$$

avec  $\Gamma$  la fréquence de relaxation de la fonction d'auto-corrélation temporelle normée des fluctuations de concentrations.

Une autre méthode, couramment utilisée lorsqu'un seul temps caractéristique est présent, consiste à traiter l'écart à une mono-exponentielle en termes de cumulants<sup>1</sup>. On développe la fonction d'auto-corrélation en puissance de  $t$  en s'arrêtant généralement au terme quadratique.

$$\ln(g^1(q,t))_{t \rightarrow 0} \approx \Gamma_0 - \Gamma_1 t + \Gamma_2 \frac{t^2}{2!} + \dots \quad (\text{Equation IV-9})$$

Les coefficients  $\Gamma_n$  sont appelés cumulants. Pour une solution idéale monodisperse, le développement s'arrête au terme linéaire du premier cumulant  $\Gamma_1$ . Pour une solution « polydisperse », le premier cumulant  $\Gamma_1$  donne la valeur moyenne de la fréquence de relaxation tandis que le deuxième cumulant  $\Gamma_2$  donne l'écart type de la distribution des fréquences de relaxation. Le degré de dispersité est obtenu par le rapport  $\Gamma_2/\Gamma_1^2$ .

Finalement, une approche plus complète pour déterminer les différents temps de relaxation est la méthode CONTIN développée par Provencher<sup>2</sup>. Elle présente l'avantage de ne pas imposer initialement de contrainte sur la forme analytique de la solution éventuelle et permet d'évaluer la distribution des tailles hydrodynamiques. Ainsi, si le profil du spectre de diffusion de la lumière est décrit par une multi-lorentzienne, alors  $g^1(q,t)$  peut se mettre sous la forme :

$$g^1(q,t) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma \quad (\text{Equation IV-10})$$

$G(\Gamma)$  représente la distribution des constantes de décroissance normalisées et  $\Gamma$  l'amplitude de la décroissance. Cette méthode est très bien appropriée dans le cas où l'on a un seul ou plusieurs types de particules de tailles très différentes. Dans le cas contraire, elle peut donner lieu à des difficultés (recouvrements de pics, épaulements). L'utilisation pour cette étude des deux dernières méthodes a permis d'obtenir des résultats très comparables.

La mesure de la fréquence de relaxation  $\Gamma$  n'est cependant pas une information dynamique en soi. Il faut la relier à un coefficient de diffusion d'objets. Ainsi pour un phénomène purement diffusif et à une concentration donnée en particules, chaque temps de relaxation  $\tau$  ( $1/\Gamma$ ) est associé à un coefficient de diffusion apparent  $D$  par la relation de Fick :

$$D = \frac{1}{\pi q^2} = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (\text{Equation IV-11})$$

La valeur du coefficient d'autodiffusion  $D_0$  est obtenue en prenant en compte la dépendance de  $D$  vis-à-vis de la concentration ( $c$ ) et du vecteur d'onde ( $q$ ) selon l'expression :

$$D = D_0(1 + Ac + \dots)(1 + Bq^2 + \dots) \quad (\text{Equation IV-12})$$

où  $A$  et  $B$  sont des paramètres caractéristiques propres au système étudié. Le coefficient  $D_0$  est donc mesuré par extrapolation à angle nul puis à concentration nulle. C'est à partir de ce dernier que l'on peut calculer le rayon hydrodynamique réel des objets diffusants (assimilés à des sphères) en régime dilué en utilisant la relation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D_0} \quad (\text{Equation IV-13})$$

avec  $k_B T$  le facteur d'énergie de Boltzman et  $\eta_0$  la viscosité du solvant.

### ***C- La diffusion des neutrons aux petits angles (SANS).***

La diffusion des neutrons aux petits angles constitue une sonde très fine d'analyse de la matière solide ou liquide. Elle permet notamment d'observer la forme, la taille, la structure interne et l'organisation de particules dispersées dans un milieu homogène, comme par exemple les polymères, les colloïdes, et les micelles en solution. Les objets doivent avoir des tailles caractéristiques comprises entre 5 et 500 Å pour pouvoir être étudiés grâce à cette technique.

Une expérience de diffusion de neutrons consiste à envoyer sur un échantillon un faisceau de neutrons, de longueur d'onde  $\lambda$ , de faible divergence angulaire, puis à mesurer la variation de l'intensité diffusée en fonction de vecteur d'onde  $\vec{q}$ . Cette intensité brute enregistrée par le détecteur, ne correspond pas uniquement à l'intensité diffusée par les objets, mais également à la contribution d'un certain nombre de termes de diffusion parasites (solvant, cellule, bruit de fond ...). L'intensité détectée s'écrit de la manière générale :

$$I_D(q) = C(\lambda)Te\sigma(q) + B_D + TB(\theta)C(\lambda) \quad (\text{Equation IV-14})$$

où  $T$  et  $e$  sont la transmission et l'épaisseur de l'échantillon,  $\sigma(q)$  est la section efficace différentielle de diffusion par unité de volume (c'est le paramètre contenant les caractéristiques de l'échantillon),  $B_D$  est le bruit de fond du détecteur,  $B(\theta)$  la diffusion parasite par les cellules de mesure et  $C(\lambda)$  un paramètre du spectromètre s'exprimant par :

$$C(\lambda) = I_0 A \Delta\Omega \varepsilon \quad (\text{Equation IV-14})$$

avec  $I_0$  le flux de neutron incident,  $A$  la surface de l'échantillon analysée,  $\Delta\Omega$  l'angle solide du détecteur et  $\varepsilon$  l'efficacité du détecteur. Afin d'extraire l'intensité diffusée par les particules en unité absolue ( $I(q)$ ), il est donc nécessaire d'effectuer plusieurs mesures de références et d'appliquer la relation suivante :

$$I(q) = \frac{\frac{I_D(q)}{Te} - \frac{I_{tem}(q)}{T_{tem}e_{tem}}}{\frac{I_{eau}(q)}{T_{eau}e_{eau}} - \frac{I_{cv}(q)}{T_{cv}e_{cv}}} \left( \frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{eau} \quad (\text{Equation IV-15})$$

$(d\sigma/d\Omega)_{eau}$  est la section efficace à la longueur d'onde considérée d'un échantillon référence d'eau légère.  $I_D$ ,  $I_{tem}$ ,  $I_{eau}$  et  $I_{cv}$  sont les intensités diffusées, respectivement, par l'échantillon, le témoin (solvant), l'eau légère et la cellule vide.  $T$ ,  $T_{tem}$ ,  $T_{eau}$ ,  $T_{cv}$  et  $e$ ,  $e_{tem}$ ,  $e_{eau}$ ,  $e_{cv}$  sont, respectivement, les transmissions et les épaisseurs correspondantes. L'équation III-20 est résolue à l'aide du logiciel de traitement de donnée développé au LLB (PAsidur).

Lorsque les traitements des données brutes sont achevés, on obtient un signal en intensité absolue uniquement constitué de diffusion cohérente. C'est cette diffusion qui va nous permettre d'obtenir des informations sur la forme et l'organisation des objets dans la solution. L'expression générale de l'intensité diffusée par des objets de forme quelconque en régime concentré dans un milieu continu fait intervenir un facteur de forme (qui décrit la taille et la géométrie des objets) et un facteur de structure qui décrit les corrélations entre objets dans le système.

L'expression de l'intensité diffusée peut être réécrite sous la forme :

$$I_{théo}(q) = \Phi(\Delta\rho)^2 V_p P(q) S(q) \quad (\text{Equation IV-16})$$

où  $P(q)$  est le facteur de forme de la particule,  $S(q)$  correspond aux interférences causées par les interactions entre objets diffusants et est dénommé facteur de structure et  $\Delta\rho$  est le facteur de contraste qui correspond à la différence entre la densité de longueur de diffusion de l'objet étudié et celle du reste de l'échantillon (en général le solvant). Dans le cas de particules sans interaction, le facteur de structure est égal à 1 sur tout le domaine de  $q$  et l'expression de l'intensité diffusée se simplifie :

$$I_{théo}(q) = \Phi(\Delta\rho)^2 V_p P(q) \quad (\text{Equation IV-17})$$

Le facteur de forme  $P(q)$  joue donc un rôle très important puisqu'il contient l'essentiel des informations sur la géométrie des particules diffusantes.

Différents facteurs de forme typiques existent suivant le type d'objet considéré. Nous donnons ici ceux utilisés dans l'étude de nos différents systèmes.

### **La sphère dure de rayon moyen R**

$$P(q) = \left[ \frac{3 [\sin(qR_s) - qR_s \cos(qR_s)]}{(qR_s)^3} \right]^2 \quad (\text{Equation IV-18})$$

L'intensité théorique diffusée est donc liée aux rayons des sphères par la relation :

$$I_{théo}(q) = 9\Phi(\Delta\rho)^2 V_s \left[ \frac{[\sin(qR_s) - qR_s \cos(qR_s)]}{(qR_s)^3} \right]^2 \quad (\text{Equation IV-19})$$

**La sphère creuse ou vésicule de rayon moyen R et d'épaisseur  $\delta$**

La densité de longueur de diffusion dans la coque vaut  $\rho_1$  entre  $R_i = R - \delta/2$  et  $R_e = R + \delta/2$ , et  $\rho_2$  partout ailleurs ( $R_i$  et  $R_e$  sont les rayons internes et externes de la coquille). Nous posons  $\Delta\rho = \rho_1 - \rho_2$  et obtenons pour le facteur de forme et l'intensité diffusée (avec un profil dit "créneau"):

$$P_{\text{créneau}}^{\text{ves}}(q) = \frac{16\pi^2}{q^6} \left[ \frac{\sin(qR_e) - qR_e \cos(qR_e) - \sin(qR_i) + qR_i \cos(qR_i)}{V(R_e) - V(R_i)} \right]^2 \quad (\text{Equation IV-20})$$

avec  $V(R_x) = \frac{4}{3}\pi R_x^3$ ,  $[V(R_e) - V(R_i)]^2 = V_{\text{ves}}^2$

où  $V_{\text{ves}}$  est le volume diffusant de la vésicule et

$$I(q) = \Phi(\Delta\rho)^2 V_{\text{ves}} P_{\text{créneau}}^{\text{ves}}(q) = \frac{N}{V} (\Delta\rho)^2 V_{\text{ves}}^2 P_{\text{créneau}}^{\text{ves}}(q) \quad (\text{Equation IV-21})$$

**La chaîne gaussienne**

Une chaîne gaussienne correspond à une chaîne qui effectue une marche aléatoire dont le déplacement carré moyen  $\langle r^2 \rangle$  est proportionnel au nombre N de pas de longueur a. La distance entre les extrémités est nulle en moyenne mais sa distribution suit une loi gaussienne. Ainsi le facteur de forme d'une chaîne gaussienne s'écrit :

$$P(q) = \frac{2(e^{-X} - 1 + X)}{X^2} \quad \text{avec } X = q^2 Rg^2 \quad (\text{équation IV-22})$$

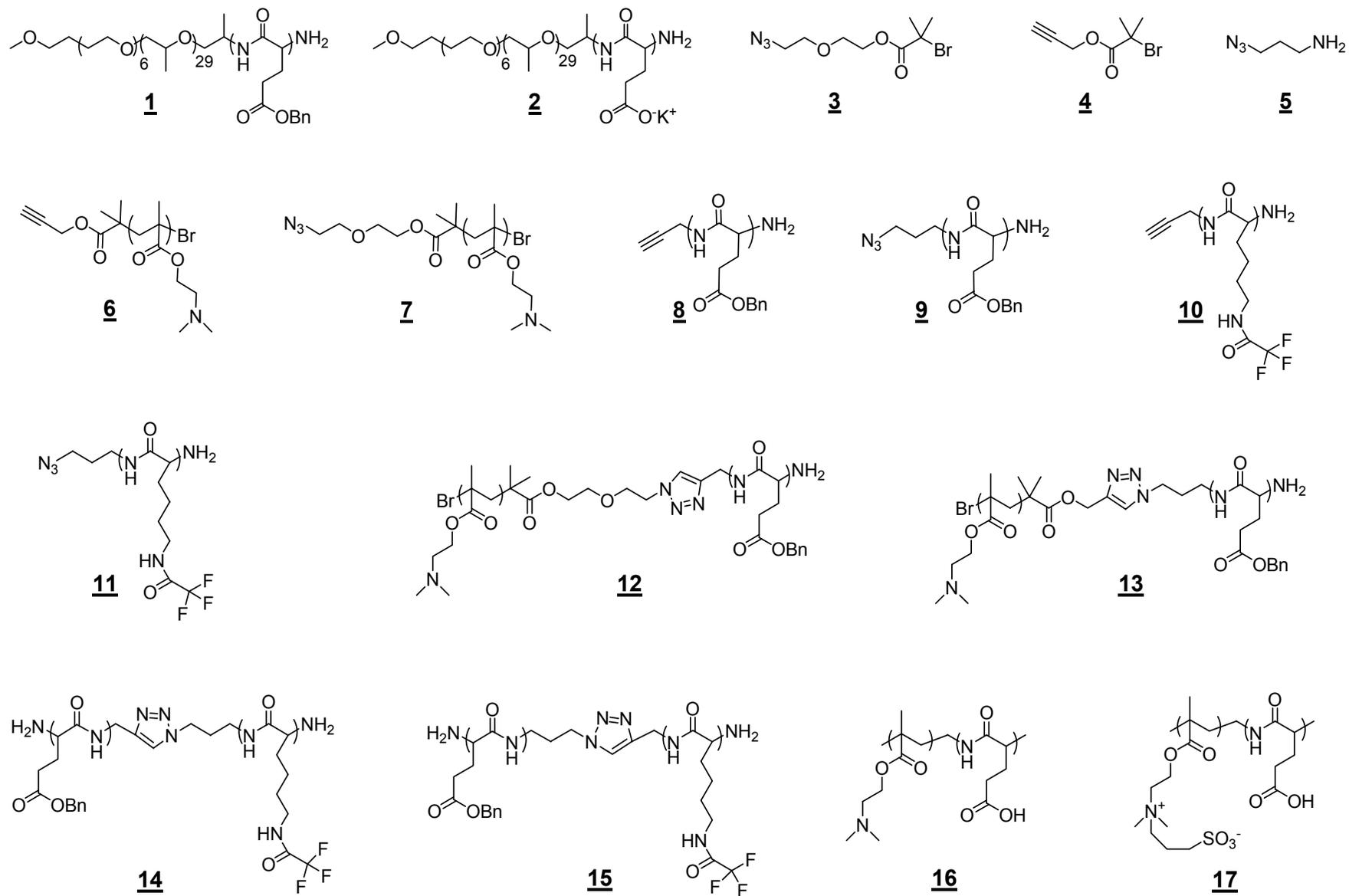


Figure IV-1 : Structures chimiques des différents composés synthétisés dans cette étude

## Partie expérimentale

### **A- Réactifs**

Le diméthylformamide (DMF) (Scharlau, 99.9%) a été séché sur tamis moléculaire (3 and 4 Å) et cryodistillé avant d'être utilisé. Le 3-chlorure de propylammonium (98%), l'azoture de sodium (99%), la propargylamine (+98%), le N,N,N',N'',N'''-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA) (99%), le N-carboxyanhydride de L-Lysine-trifluoroacétique (TFALys NCA) et le N-carboxyanhydride de glutamate de benzyle (Glu Bz NCA) (+96%) sont utilisés sans purification particulière. La Jeffamine M-2005 fonctionnalisée par une amine primaire (XTJ-507) (Huntsman, +95%), aussi noté P(EO<sub>6-r</sub>-PO<sub>29</sub>)-NH<sub>2</sub>, a été séchée à 40°C sous vide dynamique toute une nuit. Le CuBr a été purifié en suivant une procédure standard.<sup>3</sup> Tous les réactifs proviennent d'Aldrich mis à part le DMF (Scharlau), le N-carboxyanhydride de L-Lysine-trifluoroacétique et le N-carboxyanhydride de glutamate de benzyle (Glu Bz NCA) (Isochem) et la Jeffamine (Huntsman).

### **B- Synthèse des copolymères à blocs Jeffamine-b-PGA.**

#### **B-1 Formation des blocs PBLG (1)**

Dans une boîte à gants, on introduit du Glu Bz NCA (4g, 15.2mmol) dans un Schlenk flammé sous vide que l'on solubilise dans du DMF anhydre (0.1 g/mL). Dans un autre Schlenk, du P(EO<sub>6-r</sub>-PO<sub>29</sub>)-NH<sub>2</sub> (0.5mmol) est séché durant toute la nuit à 40°C sous vide dynamique, solubilisé dans du DMF anhydre (0.1g/mL) puis ajouté dans le premier Schlenk sous flux d'azote via une canule. La solution est agitée 24h à 25°C

Concernant l'amorçage du Glu Bz NCA par la Jeffamine protonée, aussi notée P(EO<sub>6-r</sub>-PO<sub>29</sub>)-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, il est réalisé dans les mêmes conditions que précédemment. Cependant, la Jeffamine a été préalablement protonée. Pour cela, elle est solubilisée dans du THF, puis la quantité nécessaire d'acide chlorhydrique (1M) est ajoutée. Après 30 minutes de réaction et d'évaporation du solvant, le P(EO<sub>6-r</sub>-PO<sub>29</sub>)-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> est séché sous vide durant une nuit à 40°C. Une fois le transfert effectué, la solution est agitée à 40°C pendant 72h. Le produit final est récupéré par précipitation dans l'éther éthylique et séché sous vide dynamique.

#### **B-2 Déprotection (2)**

La déprotection des groupements benzyliques du poly(L-glutamate de γ-benzyle) a été réalisée suivant une procédure déjà décrite dans la littérature<sup>4</sup>. Les copolymères Jeffamine-b-PBLG (1) sont solubilisés dans du THF (25mg/mL). 1.5 équivalents de KOH par fonctions benzyliques à hydrolyser sont ajoutés et la solution est agitée pendant 15 à température ambiante. Le solvant est

évaporé sous vide et le copolymère est précipité par l'addition d'une grande quantité d'éther éthylique. La solution est ensuite centrifugée et le solvant est enlevé par décantation. Cette dernière procédure est répétée trois fois. La poudre est enfin séchée sous vide dynamique pendant 24h.

## **C- Synthèse des copolymères à blocs PMADAME-b-PBLG et PBLG-b-PTFALys**

### **C-1 Synthèse des amorceurs**

#### **C-1-1 Synthèse du 2-(2-azidoéthoxy)éthanol**

On rajoute  $\text{NaN}_3$  (4.5 g, 69 mmol),  $\text{Bu}_4\text{NI}$  (2.5 g, 6 mmol), et dicyclohexano-18-crown-6 (10 mg) à une solution de 2-(2-chloroéthoxy)éthanol (5 mL, 47 mmol) dans le 2-butanone (25 mL). Cette solution est ensuite agitée sous reflux pendant 24h. L'analyse par spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  du surnageant montre la disparition du signal à  $\delta$  42.7 ppm et l'apparition d'un nouveau à  $\delta$  50.0 ppm. Le mélange est filtré et le précipité est lavé à l'acétone. Après concentration du filtrat, le composé est distillé à 90°C. Rendement : 4.74 g (77%); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.70 (t, 2 H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.65 (t, 2H,  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.56 (t, 2H,  $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.37 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ) et 2.56 (s, 1H, OH); RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  72.47 ( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.97 ( $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 61.67 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 50.71 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ).

#### **C-1-2 Synthèse du bromoisobutyrate de 2-(2-azidoéthoxy)éthyle (3)**

Le 2-(2-azidoéthoxy)éthanol (2 g, 15.2 mmol) et le acide 2-isobromobutyrique (5.09 g, 30.5 mmol) sont dissous dans du dichlorométhane (30 mL). Le mélange réactionnel est refroidi à l'aide d'un bain de glace et une solution de dicyclohexyl carbodiimide (6.28 g, 30.5 mmol) dans le dichlorométhane (15 mL) est ajouté lentement sous agitation. Puis, une solution de 4-diméthylaminopyridine (0.74 g) dans le dichlorométhane (10 mL) est ajouté sur une période de 10min. Le mélange est agité à 0°C pendant 1h puis à température ambiante pendant 24h. Le précipité d'urée est filtré deux fois sur coton et lavé eu dichlorométhane. Une extraction de la solution est ensuite réalisée en utilisant une solution de  $\text{NaHCO}_3$  (5%) suivi d'une étape de séchage sur  $\text{MgSO}_4$ . Les composés volatils sont enlevés sous pression réduite et le produit résiduel est purifié sur une colonne de gel de silice (heptane:acétate d'éthyle 18:2). Le produit transparent obtenu est ensuite séché sous vide toute une nuit. Rendement : 3.03 g (83%). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.30 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 3.73 (t, 2H,  $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.67 (t, 2H,  $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.35 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ) et 1.92 (s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.60 (C=O), 70.15 ( $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 68.78 ( $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 65.02 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 55.79 (CBr), 50.73 ( $\text{CH}_2\text{N}_3$ ) et 30.73 ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ).

#### **C-1-3 Synthèse du bromoisobutyrate de propargyl (4).**

Ce composé a été synthétisé grâce à une procédure publiée Matyjaszewski et coll.<sup>5</sup> L'alcool propargylique (1.5 g, 26.8 mmol) et l'acide 2-bromoisobutyrique (4.47 g, 26.8 mmol) sont dissous dans du dichlorométhane (20 mL). Le mélange réactionnel est refroidi dans un bain de glace et une solution

de DCC (5.53 g, 26.8 mmol) dans le dichlorométhane (10 mL) est lentement ajouté sous agitation. Une solution de DMAP (0.18 g) dans le dichlorométhane (10 mL) est ensuite ajoutée pendant une période de 10 min. Le mélange est agité à 0°C pendant une heure puis à température ambiante pendant 24h. Le précipité d'urée est filtré et lavé avec du dichlorométhane (50 mL). Le solvant est enlevé à l'aide d'un évaporateur rotatif et le produit obtenu est distillé sous vide. Rendement : 4.56 g (83%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 4.73 (d, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.50 (t, 1H, C≡CH), et 1.91 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) 170.90 (C=O), 76.94 (C≡CH), 75.55 (C≡CH), 54.94 (CBr), 53.43 (CH<sub>2</sub>O) et 30.65 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C).

### **C-1-4 Synthèse du 1-azido-3-aminopropane (5)**

Ce composé a été synthétisé grâce à une procédure déjà publiée dans la littérature.<sup>6</sup> Une solution aqueuse (30 mL) de 3-chlorure de propylammonium (4 g, 30.8 mmol) et de NaN<sub>3</sub> (6 g, 92.3mmol, 3eq) est chauffée à 80°C pendant 15 h. Après avoir enlevé une grande partie de l'eau par distillation sous vide, le mélange réactionnel est refroidi dans un bain de glace. De l'éther éthylique (50mL) et des pastilles de KOH (4g) sont ajoutés en conservant la température inférieure à 10°C. Après séparation de la phase organique, une extraction de la phase aqueuse est réalisée dans l'éther éthylique (2\*20mL). Les différentes phases organiques sont collectées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis concentrées pour donner un liquide visqueux que l'on purifie par distillation. Rendement : 2.3g (75%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 3.4 (t, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.65 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 1.99 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) et 1.64 (q, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) 48.58 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 38.79 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) et 32.23 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

## **C-2 Synthèse des polymères α-ω-fonctionnels**

### **C-2-1 Synthèse des homopolymères PMADAME-CCH et PMADAME-N<sub>3</sub> (6) et (7)**

Les deux polymères sont obtenus grâce à la méthode procédure. Concernant la synthèse du polymère PMADAME-N<sub>3</sub> (7): le monomère 2-(méthacrylate de diméthylamino ethyle) (10 mL, 58.2 mmol), l'amorceur bromoisobutyrate de 2-(2-azidoethoxy)éthyle (3) (814 mg, 2.9 mmol) et le ligand HMTETA (1.63 mL, 5.81 mmol, 2eq) sont ajoutés dans un Schlenk flammé sous vide et solubilisés dans 10 mL de THF anhydre. Le mélange est agité pendant environ 5 min, dégazé grâce à trois cycles de congélation-vide-décongélation, puis ajouté dans un autre Schlenk contenant du CuBr (417 mg, 2.9 mmol, 2eq) à l'aide d'une canule. Le Schlenk est placé dans un bain d'huile à 60°C pendant 15 min. La réaction est arrêtée par l'ajout de THF et la solution est passée à travers une colonne d'alumine basique afin d'enlever le catalyseur de cuivre. Après concentration, la solution est précipitée dans du pentane et le polymère est séché sous vide dynamique toute une nuit.

### **C-2-2 Synthèse des homopolymères PBLG-CCH, PBLG-N<sub>3</sub>, PTFALys-CCH et PTFALys-N<sub>3</sub> (8), (9), (10), (11)**

Les quatre polymères sont obtenus grâce à la méthode procédure. Concernant la synthèse du polymère PBLG-N<sub>3</sub> (9) : le monomère BLGlu-NCA (1.5 g, 5.70 mmol) est pesé et introduit dans un

Schlenk dans une boîte à gants sous atmosphère d'argon puis solubilisé dans 15 mL de DMF anhydre. La solution est agitée pendant 10min et l'amorceur 1-azido-3-aminopropane (**5**) (11.1  $\mu$ l, 0.114 mmol) est ajouté à l'aide d'une micro-seringue sous courant d'azote. Le mélange est agité pendant 40h à 25°C. Le polymère est récupéré par précipitation dans l'éther éthylique à partir d'une solution préalablement concentrée dans le DMF, filtré et séché sous vide dynamique pendant 24h.

### **C-3 Synthèse des copolymères à blocs par « chimie click »**

#### **C-3-1 Synthèse des copolymères à blocs PMADAME-*b*-PBLG (**12**) et (**13**)**

Les couplages par "chimie click" entre PMADAME-CCH et PBLG-N<sub>3</sub> d'une part et PMADAME-N<sub>3</sub> et PBLG-CCH d'autre part ont été réalisés dans le DMF en utilisant le même protocole. Typiquement, le PBLG-CCH (**8**) (0.19 g, 18.3  $\mu$ mol), le PMADAME-N<sub>3</sub> (**7**) (0.1 g, 22.1  $\mu$ mol, 1.2eq) et la PMDETA (7.6  $\mu$ l, 36.6  $\mu$ mol, 2eq) sont introduits dans un Schlenk puis solubilisés dans 5mL de DMF anhydre. Le mélange est agité pendant 10 min, dégazé grâce à trois cycles de congélation-vide-décongélation, puis ajouté dans un autre Schlenk contenant du CuBr (5.2 mg, 36.2  $\mu$ mol, 2eq) à l'aide d'une seringue purgée à l'azote. Le Schlenk est agité 25°C pendant 24h. La solution est passée à travers une colonne d'alumine neutre pour enlever le catalyseur, concentrée, puis précipitée dans de l'éther éthylique pour se débarrasser de l'excès de PMADAME-N<sub>3</sub>. Le produit final est séché sous vide dynamique durant une nuit.

#### **C-3-2 Synthèse des copolymères à blocs PBLG-*b*-PTFALys (**14**) et (**15**)**

Les couplages par "chimie click" entre PBLG-CCH et PTFALys-N<sub>3</sub> d'une part et PBLG-N<sub>3</sub> et PTFALys-CCH d'autre part ont été réalisés dans le DMF en utilisant le même protocole. Typiquement, le PTFALys-N<sub>3</sub> (**11**) (143 mg, 7.45  $\mu$ mol), le PBLG-CCH (**8**) (102 mg, 11.09  $\mu$ mol, 1.5eq) et la PMDETA (6.15  $\mu$ l, 29.69  $\mu$ mol, 4eq) sont introduits dans un Schlenk et solubilisés dans 3 mL de DMF anhydre. Le mélange est agité pendant 10 min, dégazé grâce à trois cycles de congélation-vide-décongélation, puis ajouté dans un autre Schlenk contenant du CuBr (2.13 mg, 14.85  $\mu$ mol, 2eq) à l'aide d'une seringue purgée à l'azote. Le Schlenk est placé dans un bain d'huile à 50°C pendant 36 h. Le copolymère à block est récupéré tout d'abord par précipitation dans l'eau, puis filtré pour enlever les sels de cuivre. La poudre est ensuite solubilisée dans le THF, précipitée dans le chloroforme pour se débarrasser de l'excès de PBLG-CCH. La suspension est ensuite centrifugée pendant 30min à 11000tr/min à 10°C et le produit final est séché sous vide dynamique pendant 24h.

## ***D- Synthèse des copolymères à blocs modifiés à partir de PMADAME-*b*-PBLG***

### ***D-1 Synthèse des copolymères à blocs PMADAME-*b*-PGA (16)***

Les copolymères à blocs PMADAME-*b*-PGA sont obtenus par déprotection des groupements benzyliques des blocs PBLG des copolymères PMADAME-*b*-PBLG (13). Dans une solution de PMADAME-*b*-PBLG dans le THF (25 mg/mL) sont ajoutés 1.5 equiv de KOH par fonctions benzyliques à estérifier. Le mélange est agité pendant 15h à température ambiante. Après avoir extrait une grande partie du solvant sous vide, la solution résiduelle est dialysée pendant 3 jours dans un boudin ayant une membrane de cut-off 3500g/mol en changeant régulièrement l'eau distillée. Le copolymère est obtenu après lyophilisation de cette solution aqueuse.

### ***D-2 Synthèse des copolymères à blocs PSPE-*b*-PGA (17)***

Les copolymères à blocs PSPE-*b*-PGA sont obtenus par quaternisation des amines tertiaires des unités MADAME des copolymères PMADAME-*b*-PGA (16). Typiquement, on rajoute dans une solution aqueuse (5mL) de PMADAME<sub>85</sub>-*b*-PGA<sub>37</sub> (0.2g, 0.938 mmol) 1ml de solution aqueuse de 1,3-propane sultone (0.126mg, 1.030 mmol, 1.1eq). Le mélange est agité 48h à 25°C. La solution est ensuite précipitée dans du THF et centrifugée. Le solvant est extrait et le copolymère est séché sous vide dynamique pendant 24h.

## ***E- Caractérisation moléculaires des amorceurs, polymères et copolymères à blocs.***

### ***E-1 Chromatographie d'exclusion stérique (CES).***

Les masses molaires ainsi que les indices de dispersité de tous les échantillons ont été déterminé par chromatographie d'exclusion stérique (CES) dans le DMF + LiBr (1g/L) à 60°C (0.8 mL/min), à l'aide d'un appareil Waters (Alliance GPCV2000). Le système d'analyse est équipé de trois colonnes TSK (7,8×30 cm, 5 µm, G2000, G3000, et G4000 HHR avec une taille de pore respectivement de 250, 1500, et 10 000 Å) et un détecteur par réfractométrie différentielle (Jasco, RI-1530). Le dispositif est calibré à l'aide de standard de polystyrène linéaire.

### ***E-2 Résonance magnétique nucléaire (RMN).***

L'analyse des échantillons par résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) a été réalisée généralement à 400 MHz sur un appareil BRUKER AC400 et à température ambiante. Les solvants utilisés dépendent de la solubilité des composés à analyser.

### ***E-3 Spectroscopie IRTF***

Les spectres infrarouge ont été obtenus avec un spectromètre BRUKER Tensor 27 présentant une résolution inférieure à  $0.5 \text{ cm}^{-1}$  et un domaine spectral compris entre  $7500 \text{ cm}^{-1}$  et  $370 \text{ cm}^{-1}$ . Les différents échantillons ont été analysés qualitativement après évaporation d'une goutte de solution à  $0,5 \text{ mg/ml}$  sur une cellule ATR. Les spectres obtenus ont, dans tous les cas, été corrigés par un « blanc ».

### ***E-4 Analyses Enthalpique Différentielle (DSC).***

Les thermogrammes d'analyse enthalpique différentielle ont été obtenus avec un appareil de mesure DSC Q100 de TA instrument, sous courant continue d'hélium. Les mesures ont été effectuées en imposant des variations continues de températures de  $-50^\circ\text{C}$  à  $150^\circ\text{C}$  et une vitesse de montée en température de  $10^\circ\text{C/min}$ .

## ***F- Propriétés physico-chimiques des copolymères auto-assemblés.***

### ***F-1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)***

Les mesures de diffusion de la lumière dynamique ont été effectuées avec le goniomètre ALV5000 Laser de ALV. La source du rayonnement est un laser hélium-néon ( $35\text{mW}$ ) dont la longueur d'onde est égale à  $632,8 \text{ nm}$ . Il est équipé d'un corrélateur ALV-5000/EPP Multiple Tau Digital possédant un temps d'échantillonnage initial de  $125 \text{ ns}$ . Les températures de mesures peuvent être régulées grâce à un bain thermostaté. Les mesures ont été effectuées à différents angles ( $50^\circ \leq \theta \leq 130^\circ$ ) et sur une période de 60 à 300 secondes par angle. Les fonctions de corrélation ont été traitées soit par la méthode CONTIN soit par la méthode des cumulants. Le programme utilisé pour faire ces traitements est le logiciel d'acquisition et de contrôle de ALV : ALV-5000E.

### ***F-2 Microscopie électronique en transmission (TEM)***

Les clichés de microscopie électronique en transmission ont été obtenus sur un microscope Hitachi H7650 opérant à  $80\text{kV}$  équipé d'une caméra GATAN Orius 11 mégapixels. Les échantillons ont été préparés par la « méthode du spray » : cette technique consiste à pulvériser sous pression d'azote une solution aqueuse de copolymères à blocs à  $1\text{mg/mL}$  sur une grille adaptée (400 mesh, grille en cuivre recouverte de carbone). La grille est ensuite laissée à l'air libre à température ambiante pour sécher.

### ***F-3 Diffusion des neutrons aux petits angles (SANS)***

Les expériences de SANS ont été réalisées au Laboratoire Léon Brillouin (CEA) à Saclay sur le spectromètre PACE, avec la collaboration d'Annie Brûlet. Ce spectromètre est caractérisé par :

Un sélecteur mécanique de longueur d'onde ( $2\text{\AA} < \lambda < 40\text{\AA}$  ;  $\Delta\lambda/\lambda = 10\%$ ).

La taille du faisceau de neutrons sur l'échantillon :  $0,7 \times 0,7 \text{ cm}^2$ .

Un détecteur multicanal au  $\text{BF}_3$  formé de 30 anneaux concentriques de 1 cm épaisseur ( $3 \text{ cm} < r < 30 \text{ cm}$ ) qui peut être déplacé à une distance de l'échantillon variant entre 1 et 5 mètres.

Trois configurations différentes ont été utilisées de manière à obtenir une gamme de vecteur de diffusion  $q$  la plus large possible :

Petits  $q$  :  $\lambda = 17\text{\AA}$ , distance = 4,57m ;  $(3.2 \cdot 10^{-3} \text{\AA}^{-1} < q < 2.6 \cdot 10^{-2} \text{\AA}^{-1})$

Moyens  $q$  :  $\lambda = 6\text{\AA}$ , distance = 2,87m ;  $(4.6 \cdot 10^{-2} \text{\AA}^{-1} < q < 3.7 \cdot 10^{-1} \text{\AA}^{-1})$

grands  $q$  :  $\lambda = 6\text{\AA}$ , distance = 1,06m ;  $(1.1 \cdot 10^{-2} \text{\AA}^{-1} < q < 1.10^{-1} \text{\AA}^{-1})$

Les échantillons sont placés dans des cellules de quartz (Hellma), de géométrie rectangulaire et d'épaisseur 1mm, 2mm ou 5mm. Les mesures sont réalisées à différentes températures. Après acquisition, les spectres ont été traités grâce au programme PASIDUR (LLB) de façon à être normalisés et exprimés en unités absolues ( $\text{cm}^{-1}$ ). Afin d'éliminer les termes de diffusion autres que celui de l'échantillon, il est nécessaire d'effectuer plusieurs mesures de références pour chaque configuration :

- Mesure avec une cellule vide.
- Mesure avec une cellule remplie d'eau légère ( $\text{H}_2\text{O}$ ).
- Mesure avec une cellule remplie de solvant ( $\text{D}_2\text{O}$ ).
- Mesure de transmission de chaque échantillon.

### ***F-4 Spectroscopie UV/Vis***

Les mesures d'absorbance des solutions aqueuses de copolymères à blocs PMADAME-*b*-PGA ont été réalisées avec un spectromètre SpectraMAX Molecular Devices à une longueur d'onde fixe  $\lambda = 550\text{nm}$ . Le pH des solutions (0.5 mg/mL) est ajusté environ 10min avant de faire la mesure. Les solutions sont placées dans des microplaques dont les puits ont un volume maximum de  $300\mu\text{L}$ .

### ***F-5 Mesure de mobilité électrophorétique***

Le point isoélectrique (PI) de chaque polyampholyte a été déterminé sur des solutions de 0.5mg/mL en fonction du pH à  $25^\circ\text{C}$  à l'aide d'un Malvern zetasizer DTS 3000. Le pH des solutions a été ajusté préalablement par l'ajout de HCl ou de NaOH.

### ***F-6 Dosages conductimétrique et pH-métrie***

Ces dosages ont été effectués sur les copolymères à blocs PMADAME-*b*-PGA. Les mesures de pH ont été réalisées en utilisant un pH-mètre pH730 Inolab WTW series couplé à une électrode de mesure Schott Intrusment et les mesures conductimétriques, avec un conductimètre Profilab LF597 WTW couplé à une électrode de mesure TetraCon 325 WTW. Ces dosages ont été réalisés sur des solutions de 0.5mg/mL avec NaCl (150mM) pour le suivi pH-métrie ou sans pour le suivi conductimétrique. En premier lieu, de la soude (NaOH) en excès est ajoutée à chaque solution et les

courbes de dosages sont obtenues par ajout d'HCl à  $c = 0.1\text{M}$  (incréments de  $100\mu\text{L}$  dans  $10\text{mL}$  d'une solution de copolymères). La gamme de pH étudiée s'étend de 11 à 2.

---

## Références bibliographiques

<sup>1</sup> Koppel, D. E. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 4814.

<sup>2</sup> Provencher, S. W. *Comput. Phys. Commun.* **1982**, *27*, 213.

<sup>3</sup> Bailar, J. C.; Emeleus, H. J.; Nyholm, R.; Trotman-Dickenson, A. F., *Comprehensive Inorganic Chemistry*". Pergamon Press, Elmsford: NY, 1973; Vol. 3, p 60.

<sup>4</sup> Checot, F.; Brulet, A.; Oberdisse, J.; Gnanou, Y.; Mondain-Monval, O.; Lecommandoux, S. *Langmuir* **2005**, *21*, 4308.

<sup>5</sup> Tsarevsky, N. V.; Sumerlin, B. S.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2005**, *38*, 3558.

<sup>6</sup> Carboni, B.; Benalil, A.; Vaultier, M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3736.



# CONCLUSION GENERALE



L'objectif de ce travail de thèse était de concevoir des copolymères à blocs multistimulables en vue d'obtenir des nano-objets adaptatifs en milieu aqueux, capables d'encapsuler des molécules actives et de les relarguer de manière contrôlée en jouant sur différents paramètres extérieurs (pH, T, force ionique...).

La partie bibliographique a permis de posséder une vue d'ensemble sur les différents copolymères à blocs stimulables et multistimulables développés à ce jour. Nous nous sommes en particulier intéressés aux systèmes à base de polypeptides, connus pour changer de structure secondaire en fonction de divers paramètres tels que la température, le pH ou la force ionique et qui demeurent très intéressants pour des applications biomédicales. L'idée de notre étude a été de combiner ces deux propriétés.

L'étape de synthèse des copolymères à blocs est bien sûr primordiale dans la mesure où le contrôle de la taille des blocs permet d'obtenir des nano-objets de taille et de morphologie désirées après auto-assemblage dans l'eau. Nous nous sommes focalisés sur plusieurs composés « hybrides » pour lesquels nous avons mis au point des stratégies de synthèse différentes.

Une nouvelle stratégie de synthèse originale et flexible basée sur le couplage par « chimie click » d'homopolymères fonctionnalisés a permis d'obtenir des copolymères hybrides vinyliques/peptidiques ou bien des composés entièrement peptidiques, à savoir respectivement **PMADAME-*b*-PBLG** et **PBLG-*b*-PTFALys**. Le copolymère à blocs **Jeffamine-*b*-PBLG** a été obtenu par polymérisation séquencée à partir d'un macroamorceur fonctionnalisé en bout de chaîne.

Le but de ce projet étant d'étudier le comportement en milieu aqueux de ces différents systèmes, des étapes supplémentaires de modification chimique ont été nécessaires pour obtenir des copolymères à double blocs hydrophiles multistimulables. La déprotection des blocs PBLG en milieu basique a donné naissance à deux nouveaux copolymères à blocs : **Jeffamine-*b*-PGA** et **PMADAME-*b*-PGA** tandis que la quaternisation des blocs PMADAME à l'aide de propane sultone a permis d'obtenir le système **PSPE-*b*-PGA**.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur le comportement en solution aqueuse de ces copolymères et, en particulier, sur l'étude des structures formées par auto-assemblage. Toutes les morphologies ont pu être parfaitement caractérisées grâce à l'utilisation de techniques complémentaires de diffusion du rayonnement (SANS et DLS) et de microscopie (TEM).

Tout d'abord, les études ont été réalisées sur les copolymères à blocs multistimulables, **Jeffamine-*b*-PGA** et **PMADAME-*b*-PGA** en fonction de deux paramètres principaux : le pH et la température.

Les copolymères **Jeffamine-*b*-PGA** s'auto-assemblent pour former des micelles sphériques au-delà de la LCST du bloc **Jeffamine**. Ce dernier forme le cœur des micelles et peut être potentiellement utilisable pour contenir des molécules hydrophobes dont l'affinité peut être contrôlée

en fonction de la température. En effet, nous avons mis en évidence, par des mesures de SANS, la déshydratation progressive du cœur des micelles en fonction de l'augmentation de température.

L'étude des copolymères PMADAME-*b*-PGA dans l'eau a montré la richesse de ce système. En effet, en fonction des conditions de pH et de température, les chaînes de copolymères peuvent adopter différentes conformations telles que des chaînes libres, des vésicules ou micelles thermosensibles par précipitation des blocs PMADAME au-delà de leur LCST, ou encore des vésicules électrostatiques anioniques ou cationiques formées par la complexation entre les charges opposées portées par les différents blocs. Rarement un seul et même système a donné lieu à autant de morphologies différentes ce qui en fait un modèle très intéressant pour des applications telles que l'encapsulation de principes actifs. Bien sûr, il est malgré tout nécessaire d'adapter certains paramètres telle que la température critique de formation des objets thermosensibles qui, dans notre cas, est encore trop élevée pour imaginer pouvoir utiliser ces systèmes pour des applications biomédicales. Voyons cette étude plutôt comme un développement de nouveaux concepts, à savoir la formation de nano-objets adaptatifs dans l'eau capables d'adopter différentes conformations en jouant sur la température ou le pH à partir d'un même système. Notons également que tous ces changements de morphologies sont entièrement réversibles.

Nous nous sommes également intéressés aux systèmes multistimulables susceptibles de pouvoir passer de l'état de nanoparticules à celui de chaînes libres en augmentant la température. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur l'incorporation d'un bloc à UCST, le PSPE, mais les résultats obtenus n'ont pas été convaincants dans la mesure où nous n'avons pas été en mesure d'élever la température critique au-delà de 20°C. Le développement de tels systèmes représente un challenge énorme car le mode de libération de principes actifs par élévation de température provoqué par une dissolution des nanoparticules représente une voie idéale pour le traitement de certaines maladies. Cependant, aucune équipe à ce jour n'est parvenue à résoudre ce problème.

Dans la dernière partie concernant l'étude en solution, nous nous sommes focalisés sur un système plus simple à analyser, PMADAME-*b*-PBLG. Le fait de conserver le bloc peptidique sous sa forme protégée le rend hydrophobe et permet ainsi de s'abstenir des effets de complexations électrostatiques. La technique de mise en solution par nanoprécipitation nous a permis d'obtenir des vésicules stables et bien définies en solution aqueuse. L'objectif final était double : (i) incorporer des particules magnétiques hydrophobes dans la membrane des vésicules de façon à utiliser ces nanoparticules comme agent de contraste, de ciblage ou pour des applications d'hyperthermie, (ii) introduire des principes actifs dans le cœur hydrophile des vésicules. Les premières expériences réalisées visant à incorporer les particules magnétiques ont montré un changement de morphologie de vésicule en micelle sphérique, dû à des effets de déplétion. Les systèmes, dont la taille est contrôlée en dessous de 100nm, présentent des caractéristiques intéressantes pour le diagnostic et la thérapie par l'hyperthermie.

Les résultats que nous avons obtenus sont intéressants et très originaux et constituent une base solide pour la suite de ces travaux où les perspectives sont nombreuses.

Du point de vue de la synthèse, nous avons développé une nouvelle stratégie originale et flexible basée sur la « chimie click ». Cela permet d'imaginer la possibilité de développer des copolymères à blocs aux propriétés nouvelles qui pourraient être difficiles, voire impossibles à obtenir par des voies de synthèse plus « conventionnelles ».

Les copolymères à blocs multistimulables PMADAME-*b*-PGA présentent des propriétés d'auto-assemblage en milieu aqueux très intéressantes avec la possibilité de pouvoir former soit des vésicules électrostatiques en fonction du pH, soit des micelles ou vésicules en fonction de la température. Afin d'évaluer leur capacité à encapsuler et à relarguer de manière contrôlée des principes actifs afin de pouvoir les utiliser dans des applications biologiques, il serait tout d'abord intéressant d'adapter les températures et pH critiques à des valeurs physiologiques. Une méthode de choix pour optimiser ce paramètre est la copolymérisation.

Enfin, il reste également à étudier les micelles sphériques de PMADAME-*b*-PBLG/particules magnétiques en détails. Tout d'abord, il serait intéressant de réaliser des mesures par IRM de façon à évaluer la capacité de ces particules à être détectées en vue d'injection dans le corps humain. Aussi, on pourrait incorporer des principes actifs, par exemple des médicaments anticancéreux (doxorubicine), au sein du cœur hydrophobe des micelles magnétiques et étudier leur relargage avec ou sans champ magnétique par effet hyperthermique.

L'idée aujourd'hui est de pouvoir combiner le diagnostic et la thérapie (« théranostique ») grâce à l'utilisation de ce genre de micelles magnétiques. Par exemple, l'ajout de ligands en périphérie des nanoparticules permet une reconnaissance par les récepteurs des cellules malades. Cela se traduit par une accumulation des nanoparticules à proximité de la zone à traiter, que l'on peut observer par IRM. Cette technique permet donc de ne commencer la thérapie qu'une fois la zone à traiter atteinte et ainsi d'épargner la destruction de cellules saines.

Notons pour conclure, qu'une étude préliminaire de relargage de la doxorubicine, encapsulée dans le cœur hydrophobe des micelles magnétiques, a été réalisée et a montré des résultats encourageants.

