SYNTHESE ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX POLYESTERS BIODEGRADABLES ET HYDROSOLUBLES A FONCTIONS CATIONIQUES OU AMPHOTERES

Benjamin Nottelet

▶ **To cite this version:**

Benjamin Nottelet. SYNTHESE ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX POLYESTERS BIODEGRADABLES ET HYDROSOLUBLES A FONCTIONS CATIONIQUES OU AMPHOTERES. Matériaux. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2005. Français. NNT : . tel-00110595

HAL Id: tel-00110595

https://theses.hal.science/tel-00110595

Submitted on 31 Oct 2006

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

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

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Chimie de matériaux

Formation Doctorale : Chimie moléculaire et élaboration du solide

Ecole Doctorale : Sciences chimiques et physiques

présentée et soutenue publiquement

par

BENJAMIN NOTTELET

Le 5 décembre 2005

Titre :

SYNTHESE ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX POLYESTERS BIODEGRADABLES ET HYDROSOLUBLES A FONCTIONS CATIONIQUES OU AMPHOTERES

JURY

M. le Dr. J. COUDANE	Univ. Montpellier I	Directeur de thèse
M. le Pr. E. FLEURY	INSA Lyon	Membre invité
M. le Pr. P. GUERIN	Univ. Paris XII	Rapporteur
M. le Pr. R. JEROME	Univ. de Liège	Rapporteur
M. le Pr. J-J. ROBIN	Univ. Montpellier II	Examinateur
M. le Dr. J-F. SASSI	R.T.C.L. RHODIA	Co-directeur de thèse
M. le Dr. M. VERT	Univ. Montpellier I	Examinateur

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE **9**

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **14**

A- Copolymères amphiphiles **15**
I. Copolymères amphiphiles non dégradables : 17
1) Copolymères amphiphiles non dégradables à blocs: 17
a) Non ioniques 17
b) Ioniques ou ionisables 19
2) Copolymères amphiphiles non dégradables greffés: 21
a) Squelettes hydrophiles ioniques / chaînes hydrophobes 22
b) Squelettes hydrophobes/ chaînes hydrophiles 23
II. Copolymères amphiphiles dégradables : 24
1) Polymères dégradables: 24
a) Polymères dégradables non polyesters 25
b) Polyesters aliphatiques 29
c) Conclusion 37
2) Copolymères amphiphiles partiellement et totalement dégradables : 37
a) Non polyesters 38
b) Polyesters non PCL 41
c) Polyesters PCL 44
III. Conclusion 50

B- Méthodes de modification chimique de PCL **50**
I. Modification en extrémité de chaîne et copolymérisation 51
II. Modification via des lactones fonctionnalisées 52
III. Modification de PCL préformée 54
IV. Conclusion 55

C- Conclusion et stratégie de synthèse **56**

CHAPITRE II : SQUELETTE PCL CARBANIONIQUE COMME AGENT NUCLEOPHILE **58**

1) Méthylation de PCL 59
2) Synthèse de PCL carboxylée 59
3) Introduction de groupes cationiques 61
4) Introduction de groupements hydroxyle et amine 62
a) Introduction de fonctions amine et alcools 62
b) Introduction de fonctions protégées 63
5) Introduction d'halogènes 66
a) Halogène en extrémité de bras espaceur 67
b) Introduction d'atomes d'iode sur le squelette : PCL iodée 69
c) Iodation d'une fonction allyle 77
6) PCL carbanionique en tant qu'agent nucléophile : conclusion 78

CHAPITRE III : MACROAMORCAGE DE POLYMERISATION ANIONIQUE A PARTIR DU MACROPOLYCARBANION PCL$^{\Theta}$ **79**

I. Dérivés vinyliques : 80
1) Acétate et pivalate de vinyle 80
2) N-Vinylpyrrolidone 82
3) 4-Vinylpyridine : 83
a) Polymérisation anionique 83
b) Dégradation et étude structurale 85
c) Quaternisation et hydrosolubilisation 85
II. Dérivés acryliques : 88
1) Dérivés acryliques : 88
a) Méthacrylate de glycidyle (GMA) 88
b) N,N-(α–Diméthylaminoéthyl)méthacrylate 90
2) Dérivés acrylamide 94
a) [(N,N'-diméthyl)aminopropyl]-méthacrylamide 94
b) N,N'-diméthylacrylamide 95
3) Macromonomères méthacrylate de PEG : 96
a) Méthacrylate-PEG (1100) 97
b) Méthacrylate-PEG (300) 99
III. Dérivés cycliques et polymérisation par ouverture de cycle : 101
1) Epoxyde et dilactame 102
2) NCA dérivé d'alanine 102
3) Lysine : 104
a) Synthèse d'un NCA de lysine 104
b) Homopolymérisation du NCA(N-Z-Lys) 105
c) Activation de P(N-Z-Lys) et greffage sur PCL 106
d) Macroamorçage du NCA(N-Z-Lys) par PCL$^{\Theta}$ 108
e) Déprotection des copolymères et étude en solution 110
f) Nouveaux vecteurs dégradables pour la transfection de gènes 113
IV. Conclusion 119

CHAPITRE IV : POLYMERISATION PAR TRANSFERT D'IODE A PARTIR DE PCL IODEE **120**

I. Etudes préliminaires : 122
1) Acétate de vinyle 123
2) N,N-(diméthylaminopropyl) méthacrylamide : 124
a) Synthèses et analyses 124
b) Analyse du spectre UV du copolymère 125
II. Etude systématique de la polymérisation par transfert dégénératif d'iode à partir de PCL iodée 127
1) Conditions 127
2) Styrène 128
3) Acrylate de Butyle : concentration faible en amorceur 129
a) Réaction 129
b) Résultats 130
c) Conclusion 132
4) Acrylate de butyle : concentration élevée en amorceur 133
a) Réaction 133
b) Résultats 133
c) Conclusion 137
5) [(Diméthyl)aminoéthyl)]acrylate : ADAM 137
a) Réaction 138
b) Résultats 138
c) Conclusion 141
III. Conclusion 142

CHAPITRE V : POST-MODIFICATION DE NOUVEAUX COPOLYMERES A BASE DE PCL 143

I. Synthon PCL bromoacétylée : 144
II. Synthon PCL iodée : 145
1) Substitution de l'iode par la triéthylamine 145
2) Substitution de l'iode par une triamine 146
3) Substitution de l'iode par la triphénylphosphine 147
III. Synthon PCL carboxylée 148
1) Estérification 148
2) Amidification 149
a) Activation de PEI 150
b) Amidification de la PCL-COOH : 150
IV. Conclusion 152

CONCLUSION GENERALE 153

PARTIE EXPERIMENTALE 157

A- Modification chimique de polymères par voie anionique 158
I. Synthèse générale 158
1) Montage et traitements 158
2) Exemples de substitutions 160
a) Carboxylation de la PCL : 160
b) Méthylation de la PCL 160
3) Exemples de greffages 161
a) Copolymère PCL-g-PGMA : 161
b) Terpolymère PCL-g-(PVP/PEG) : 161
II. Caractérisation des copolymères 161
1) Résonance magnétique nucléaire 161
2) Spectrométrie infra-rouge 162
3) Diffraction des Rayons X 162
4) Chromatographie d'exclusion stérique 162
5) Radiographie Rayons X 162
6) Analyse de particules submicroniques par diffusion dynamique de la lumière 163
7) Analyse thermique différentielle 163
8) Viscoélasticimétrie 163
9) Microscopie électronique à balayage environnemental 163
10) Dosage des fonctions acides du copolymère PCLCOOH par potentiométrie 163
11) Dégradation des copolymères 164

B- Transfection 164
I. Cellules et plasmides 164
1) Culture cellulaire 164
2) Plasmides 165
II. Préparation des solutions de copolymères 165
1) Tampon HBS 165
2) Solution 10mM en PEI 25K 165
3) Solutions de copolymères PCL-*g*-PLL 165
III. Préparation des solutions de plasmide 166
IV. Transfection 167

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 169

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Exemples d'auto-associations de copolymères amphiphiles en milieu aqueux 15
Figure 2 : Exemples d'architectures de copolymères 16
Figure 3 : Monomères méthacryliques aminés quaternisables 20
Figure 4 : Monomères méthacrylamides et méthacryliques aminés quaternisables[16] 20
Figure 5 : Techniques de greffage a) « from » et b) « onto » 21
Figure 6 : Comportement des copolymères greffés en milieu aqueux en fonction de la nature des squelettes et des chaînes latérales 22
Figure 7 : Copolymère PDMAEM-g-PPhOz 22
Figure 8 : Poly(phthalimidoacrylate-co-styrene) greffés par des ammonium-PEG 23
Figure 9 : N-carboxyanhydride et obtention d'un poly(acide α-aminé) 25
Figure 10 :Schéma de synthèse de polyiminocarbonates et polycarbonates 25
Figure 11 : Structure générale des poly(phosphates) 26
Figure 12 : Synthèse de polyphosphoesters cationisables ou cationiques 26
Figure 13 : Polydichlorophosphazène 27
Figure 14 : Synthèse de poly(phosphazènes) fonctionnalisés 27
Figure 15 : Poly(orthoesters) de type I 27
Figure 16 : Poly(orthoesters) a) de type II et b) de type III 28
Figure 17 : Structure générale des polyanhydrides non cycliques et principaux diacides cycliques utilisés 28
Figure 18 : Evolution des propriétés de PCL au cours de la dégradation in vivo[78] 35
Figure 19 : Mécanisme proposé pour la métabolisation de PCL 36
Figure 20 : Squelettes naturels polysaccharides 39
Figure 21 : Monomères cationiques méthacryliques et vinyliques greffés sur amidon 40
Figure 22 : Folate-PEI-b-P(L-LA) 42
Figure 23 : Chitosane-g-PLA 43
Figure 24 : Copolymère branché poly(4,4-bis(4-(PEtOz)-phenyl) valérolactone) 43
Figure 25 : Micelle formée par association de dendrimères PAMAM-b-(PCL-b-PEG) 46
Figure 26 : PCL-b-poly[γ–(2-hydroxyéthyl)caprolactone] 46
Figure 27 : Chitosane-g-PCL 48
Figure 29 : Méthode générale d'obtention de nouveaux polyesters fonctionnalisés et/ou protégés par polymérisation de monomères 51
Figure 30 : Homo- et copolymérisation d'ε-caprolactones fonctionnalisées 52
Figure 31 : Obtention d'ε-caprolactones fonctionnalisées par la méthode Bayer-Villiger 53
Figure 32 : Schéma réactionnel de modification par voie anionique d'une PCL 54
Figure 33 : Copolymères à base PCL obtenus par modification par voie anionique 55
Figure 34 : Voies de synthèses envisagées pour l'obtention de nouveaux copolymères par modification anionique de PCL 56
Figure 35 : PCL carboxylée : détermination du taux de substitution de la fraction 1 par dosage potentiométrique 60
Figure 36 : Attaques nucléophiles possibles sur l'épibromhydrine par $PCL^{\ominus}$ 64
Figure 37 : Synthèse de PCL-co-poly[(α-3-aminopropyl)-ε–caprolactone] 65
Figure 38 : Synthèse de PCL-co-poly[α-4-aminobenzyl)-ε–caprolactone] 66
Figure 39 : PCL halogénée a) halogène sur un bras espaceur b) halogène sur le squelette 67
Figure 40 :Mise en évidence de réactions secondaires par réaction avec le chlorure de bromoacétyle par analyses RMN ^{13}C (a) et RMN ^{1}H (b) 68
Figure 41 : Spectres obtenus par analyse RMN^{1}H a) RMN^{13}C b) d'unePCL iodée 70
Figure 42 : Chromatogrammes des différentes PCL iodées 70
Figure 43 : Masses molaires des PCL iodées en fonction du temps de réaction de l'étape de substitution 71
Figure 44 : Thermogrammes de montée et descente en température obtenus pour une PCL iodée lors du second cycle en température 72
Figure 45 : Module actif (E') et angle de perte(δ) pour la PCL iodée à 14% et la PCL commerciale . 72

Figure 46 : Influence de la température sur le module actif (E)') et l'angle de perte (δ) 73
d'une PCL-iodée à 14% 73
Figure 47:Radiographie de PCL iodée 74
Figure 48 : a) a-surface t_0 ; b) a-surface à 25 semaines de dégradation in-vitro; c) v-surface t_0 ; d) v-surface à 25 semaines de dégradation in-vitro 76
Figure 49 : Terpolymère PCL-g-(PVAc-co-PVA) 81
Figure 50 : Copolymère PCL-g-P(N-VP) a) synthèse b) potentialité 83
Figure 51 : Fraction F1 PCL-g-PVP (50/50) a) eau pH = 7 b) milieu acide pH = 2-3 84
Figure 52 : Structure probable du copolymère PCL-g-PVP (50/50) 85
Figure 53 : Copolymères en solutions et caractérisation en diffusion dynamique de la lumière. a) Copolymère PCL-g-PVP (milieu acide) b) Copolymère PCL-g-PVP^+ (eau pH=7) c) Terpolymère PCL-g-(PVP/PEG) (milieu acide) 86
Figure 54 : RMN ^1H ($CDCl_3$) du copolymère PCL-g-PGMA 89
Figure 55 : Structures probables du copolymère PCL-g-PDMAEM (F1) (80/20) a) architecture de type greffée b) architecture à rapprocher d'un dibloc 93
Figure 56 : Distribution en nombre des diamètres des nanoparticules formées en solution par auto-organisation des copolymères PCL-g-$PDMAEM^+$ 94
Figure 57 : Représentation schématique du copolymère PCL-g-P(MAPEG) 96
Figure 58: PCL-g-poly(MAPEG 300) : Diamètre moyen des nanoparticules en solution en fonction de la concentration et de la présence de Yellow OB 100
Figure 59 : Température de point trouble de solution 20 mg/cm^3 de PCL-g-P(MAPEG 300) 101
a) sans YOB ; b) en présence de YOB 101
Figure 60 : Monomères cycliques a)Epoxyde b)N-Carboxyanhydride c)Dilactame d)Depsipeptide . 101
Figure 61 : N-carboxyanhydride de Fmoc-Alanine 102
Figure 62 : a) N-ε-Z-Lysine b) NCA de N-ε-Z-Lysine 104
Figure 63 : RMN^1H dans TFA(d) de NCA(N-Z-Lys) 105
Figure 64 : CES avec détection réfractométrique et fluorométrique des homopolymères PCL et P(N-Z-Lys) et du copolymère PCL-g-P(N-Z-Lys) 107
Figure 65 :a) Début du mécanisme du « monomère activé » et mécanisme d'attaque nucléophile du macroamorceur PCL^Θ sur NCA : b) amorçage c) propagation 108
Figure 66 : RMN ^1H du copolymère PCL-g-P(N-Z-Lys) 45/55 (TFA(d)) 109
Figure 67 a : Solutions de PCL-g-PLL obtenu par macroamorçage 111
Figure 67 b : Solutions de PCL-g-PLL obtenu par greffage 111
Figure 68 : Représentation des objets formés dans l'eau par les copolymères PCL-g-PLL en fonction de la stratégie de synthèse retenue 112
Figure 69 : Etapes successives de transfection de gène par polyplexe 115
Figure 70 : Efficacités comparées de la transfection de cellules MCF7 par les témoins lipofectamine et PEI et les polyplexes PCL-g-PLL/plasmides 118
Figure 71 : Mécanisme de polymérisation radicalaire par transfert dégénératif d'iode 122
Figure 72 : Diffusion dynamique de la lumière d'une solution de PCL-g-PDMAPMA 125
Figure 73 : Chromatogramme 3D (UV) de PCL iodée à 13% 125
Figure 74 : Etude de la libération d'iode en solution 126
Figure 75 :Chromatogramme3D (UV) obtenu pour le copolymère PCL-g-PDMAPMA 126
Figure 76 : Analyses par CES du copolymère PCL-g-PS 129
Figure 77 : PCL-g-PABu DPn visé 10, évolution des masses molaires 131
Figure 78 : PCL-g-PABu DPn visé 50, évolution des masses molaires 131
Figure 79 : PCL-g-PABu : Composition et masse molaire en fonction du temps de réaction 132
Figure 80 : PCL-g-PABu : Composition et masse molaire en fonction du temps de réaction 134
Figure 81 : a) PCL-I de départ ; b) Poly(Acrylate de Butyle) ; c) « Copo 2 » DP 32 95% ABu 134
Figure 82 : Agrandissement du chromatogramme c de la figure 81 135
Figure 83 : Iododécane en CES avec détection par le détecteur à barrette de diode 135
Figure 84 : Masses molaires et polymolécularité en fonction du temps PCL-g-PABu 136
Figure 85 : Evolution des masses molaires avec le temps de réaction 139
Figure 86 : PCL-g-PADAM, Composition et masse molaire en fonction du temps de réaction 139
Figure 87 :Chromatogramme obtenu pour l'homopolymère PADAM 140

Figure 88 : Chromatogramme 3D (UV et RI) obtenu pour le copolymère PCL-g-PADAM 140
Figure 89 : Chromatogramme du copolymère PCL-g-PADAM, détecteur RI..... 141
Figure 90 : Stratégie de synthèse de nouveaux copolymères à base de PCL 144
Figure 91 : Voies de synthèse de PCL-g-PEI a) activation de PEI b) amidification..... 149
Figure 92 : Montage de la réaction de modification chimique par voie anionique 158

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des éco-emballages 11
Tableau 2 : Cahier des charges des matériaux pour applications biomédicales 12
Tableau 3 : Segments hydrosolubles[6] 18
Tableau 4 : Copolymères à blocs non ioniques obtenus à partir de téléchéliques et macromonomères 19
Tableau 5 : Polyesters aliphatiques 30
Tableau 6 : Applications biomédicales de PLA, PGA et copolymères 31
Tableau 7 : Propriétés mécaniques de PLA et PGA 32
Tableau 8 : Propriétés mécaniques de PCL en fonctions de la masse molaire 34
Tableau 9 : Dégradation de PCL en milieu tampon phosphate 36
Tableau 10 : Copolymères amhiphiles à blocs à segments polyesters 41
Tableau 11 : Copolymères amphiphiles à blocs à segments hydrophobes PCL 45
Tableau 12 : Conditions de réaction pour les substituants cationiques 62
Tableau 13 : Conditions de réaction pour les substituants à fonctions protégées 63
Tableau 14 : Essais de substitution avec l'épibromhydrine 64
Tableau 15 : Caractéristiques comparées des copolymères PCL-co-poly[α-4-nitrobenzyl)-ε–caprolactone] et PCL-co-poly[α-4-aminobenzyl)-ε–caprolactone] 66
Tableau 16 : Essais réalisés avec le chlorure de bromoacétyle 67
Tableau 17 : Synthèses et caractéristiques de PCL iodée 69
Tableau 18 : Propriétés thermiques de PCL iodées. 71
Tableau 19 : Dimensions des plaques de PCL et PCL-iodée radiographiée 74
Tableau 20 : Caractéristiques des copolymère PCL-g-PVP synthétisés 83
Tableau 21 : Caractéristiques physico-chimiques du copolymère PCL-g-PGMA 89
Tableau 22 : Synthèses et caractéristiques principales des fractions PCL-g-PDMAEM 91
Tableau 23 : Caractéristiques des copolymères PCL-g-PDMAEM quaternisés 93
Tableau 24 : Copolymères PCL-g-PDMA 95
Tableau 25 : Caractéristiques des copolymères PCL-g-poly(MAPEG) (1100) 97
Tableau 26 : Tailles des objets formés en solution aqueuse par les copolymères PCL-g-poly(MAPEG 1100) 98
Tableau 27 : Conditions de réaction de synthèse du NCA de N-Z-Lysine 105
Tableau 28 : Masses molaires des homopolymères et du copolymère 107
Tableau 30 : Plan d'expérience de transfection 117
Tableau 31 : Polymérisation de l'acétate de vinyle en présence de PCL iodée 123
Tableau 32 : Caractéristiques du copolymère PCL-g-PDMAPMA 124
Tableau 33 : Monomères testés en ITP à parti de la PCL iodée dans les conditions décrites par Iovu 127
Tableau 34 : Conditions de polymérisation de l'acrylate de butyle 130
Tableau 35 : Caractéristiques des copolymères PCL-g-PABu obtenus 130
Tableau 36 : Conditions de polymérisation de l'acrylate de butyle 133
Tableau 37 : Copolymères PCL-g-PABu obtenus 133
Tableau 38 : Conditions de polymérisation du diméthylaminoéthylacrylate 138
Tableau 39 : Copolymères PCL-g-PADAM obtenus 138
Tableau 40 : Propriétés thermiques du copolymère PCL-co-poly(α-tripéhnylphosphonium-ε-CL) .. 147
Tableau 41 : Déplacements chimiques du chlorure de choline en RMN^{1}H (DMSO) 148
Tableau 42 : Réaction d'amidification de la PCL-COOH par PEI 151
Tableau 43 : Solutions de copolymères dans le tampon HBS 166
Tableau 44 : Préparations des complexes de vectorisation 167
Tableau 45 : Plan d'expériences des essais de transfection 167

INTRODUCTION GENERALE

Les polymères dégradables, voire biodégradables par contact avec des cellules vivantes, font actuellement l'objet d'un grand nombre de recherches visant à proposer de nouvelles structures macromoléculaires originales. Cette originalité se retrouve dans tous les domaines de la synthèse macromoléculaire : nature des monomères utilisés, homo et copolymérisation, architectures des polymères synthétisés, ou encore mise en forme du matériau.

Plusieurs facteurs expliquent ce phénomène avec en premier lieu une prise de conscience de l'écologie par les populations qui s'est accompagnée de nouvelles réglementations. En effet, en raison de leur faible coût de production, de la reproductibilité des processus de fabrication, mais surtout de leurs propriétés (légèreté, bonnes propriétés physiques et mécaniques, résistance aux attaques biologiques et au vieillissement physique) les matériaux organiques dits plastiques ont remplacé progressivement les matériaux classiques (verre, métal, papier…) au cours des soixante dernières années. Parallèlement à ce succès, l'énorme production de matières polymères (actuellement 200 millions t/an) a entraîné l'apparition d'importants problèmes environnementaux. Ces problèmes sont liés, pour la plupart, aux déchets issus des emballages qui représentent 35-40% de la consommation annuelle en matière plastique. Pour exemple, on peut mentionner le cas des sacs de caisses : 18 milliards (!) sont distribués chaque année en France dont une bonne partie finit son cycle de vie dans la nature. L'IFREMER estime que 122 millions de sacs sont présents de façon continue sur le littoral français.

Le recyclage des matières plastiques pourrait être une réponse mais il se heurte à plusieurs problèmes, tant économiques que techniques (non miscibilité des polymères, vieillissement et perte de propriétés lors des processus de mise en forme des polymères recyclés...) ce qui restreint cette solution à quelques produits. Un marché est donc actuellement en pleine expansion dans le domaine des polymères (bio)dégradables qui apportent une alternative intéressante au recyclage et bien sûr à la mise en décharge. De nombreux « plastiques » dégradables sont d'ores et déjà commercialisés ou près de l'être, qu'ils soient issus de la synthèse chimique de nouveaux composés, ou de l'utilisation de bio-ressources telles que les fibres végétales, la cellulose ou encore la chitine (Tab.1). Leur essor dépend maintenant grandement de l'accueil du grand public et de la possibilité qu'il y a à proposer sur le marché des produits « verts » à des prix compétitifs.

Tableau 1 : Liste des éco-emballages (d'après CCI emballage CRIF-WTCM, F. Monfort-Windels, sept 2003 Food June 2003)

Marque	Producteur	Composition
Naturework	Cargill Dow LLC (US)	Poly(acide lactique) (PLA)
Biophan	Trespaphan GmbH (D)	PLA
Biopol	Metabolix Inc. (US)	PHB-PHV
Mater-bi	Novamont S.p.A. (I)	Amidon de maïs + polyesters
Biopar	Biop Polymer GmbH (D)	? 70% de fécule de pomme de terre
Bioplast	Biotec GmbH (D)	Fécule + poly(ε-caprolactone) (PCL)
Paragon	AVEBE (NL)	Fécule de pomme de terre
Solanyl	Rodenburg Biopolymers (NL)	Fécule de pomme de terre
Evercorn resin	Japan Corn Starch Co. Ltd. (J)	Amidon de maïs modifié
Supol	Supol GmbH (D)	Fécule + cellulose
Hydrolene	Idroplast Srl (I)	Poly(alcool vinylique)
Sokufol PVOH	Sokufol GmbH (D)	Poly(alcool vinylique)
Ecoflex	BASF AG (D)	Butadiol, acide adipique, acide téréphtalique, acide gras
BAK	BAYER AG (D)	Butadiol, acide adipique, caprolactame
Eastar Bio	Eastman Chemical Co. (US)	Butadiol, acide adipique, acide téréphtalique, acide gras
CAPA	Solvay Interox (B)	PCL
Biomax	Dupont (US)	Poly(éthylène téréphtalate) modifié
Natureflex	UCB (B)	Cellulose
Bioceta	Mazzucchelli (I)	Diacétate de cellulose

Le deuxième point expliquant l'intérêt suscité par les structures polymères dégradables concerne la médecine moderne. Le développement de nombreuses nouvelles techniques médicales repose sur l'emploi de cette classe de polymères : ingénierie tissulaire, sutures résorbables, implants dégradables, aides temporaires à la reconstruction tissulaire et osseuse… La plupart de ces applications font appel aux polyesters aliphatiques de type poly(acide lactique) (PLA), poly(acide glycolique) (PGA), et poly(ε-caprolactone) (PCL) qui sont de loin les polymères dégradables les plus développés d'un point de vu industriel. Plus récemment la délivrance ciblée de principe actifs et les thérapies géniques ont entraîné un renouveau dans la recherche de copolymères amphiphiles dégradables, intérêt relayé par une demande nouvelle et croissante des industries pharmaceutiques et biomédicales pour ces composés. En effet, dès le milieu des années 80, Bader *et al.*[1] et Vert[2] ont proposé l'emploi de micelles polymères et de vecteurs macromoléculaires de type prodrogue pour le transport de principes actifs, applications qui représentent actuellement un des axes principaux de recherche sur les amphiphiles dégradables.

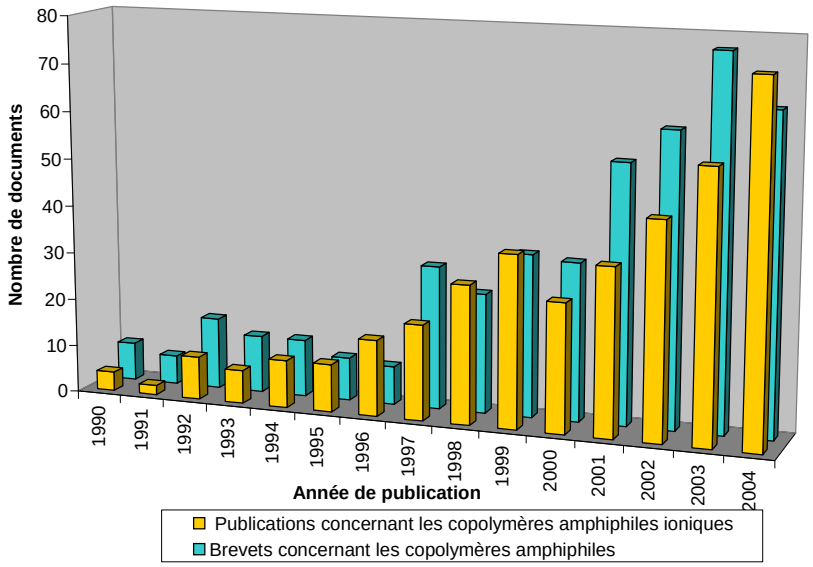
La définition IUPAC réserve le terme amphiphile à des composés organiques possédant une longue chaîne aliphatique linéaire associée soit à une charge cationique soit à une charge anionique. De manière plus générale lorsqu'il qualifie un polymère, ce terme traduit la présence au sein de la macromolécule de blocs ou segments liés de manière covalente et ayant un caractère hydrophile pour les uns, hydrophobe pour les autres. La nature amphiphile de ces copolymères leur confère des

propriétés particulières en solution comme par exemple une tendance à l'auto-organisation pour former des agrégats et des micelles polymères, ou encore une tendance à accroître l'activité de surface. Ces caractéristiques rendent ces composés particulièrement attractifs dans de nombreux domaines allant de la détergence aux cosmétiques, en passant par les industries des additifs alimentaires, du cuir, des matières plastiques, du papier, des peintures, du textile…sans oublier la libération contrôlée de principes actifs, en médecine et agriculture, qui est la plus récente des applications proposée. La délivrance contrôlée de composés bioactifs s'accompagne de nouvelles contraintes en termes de dégradabilité, de toxicité et plus généralement de biocompatibilité et biofonctionnalité[3] d'où la nécessité de proposer des structures originales répondant à ces exigences (Tab.2)

Tableau 2 : Cahier des charges des matériaux pour applications biomédicales

Biocompatibilité	Biofonctionnalité
Non toxicité Non Immunogénicité Non Carcinogénicité Non Thrombogénicité	Propriétés adaptées (mécaniques, physiques, chimiques, thermiques, biologiques) Vitesse de dégradation adaptée Elimination des résidus après utilisation Résistance à la stérilisation, au vieillissement et au stockage Simplicité d'emploi Autorisations de mise sur la marché, réglementation

Tous ces exemples expliquent la multiplication des recherches publiques et privées fondées sur cette thématique comme l'illustrent les histogrammes donnés ci-dessous.



Evolution du nombre de publications couvrant la thématique des copolymères amphiphiles ioniques et de brevets concernant les copolymères amphiphiles

RHODIA, qui possède déjà une expertise dans le domaine des surfactants polymères dégradables avec toute une gamme de produits ioniques à base de guar, est intéressé par un accroissement des connaissances dans le domaine et par le potentiel de cette approche nouvelle. Ce groupe a donc commandité et financé les travaux décrits dans ce mémoire visant à l'obtention de polyesters cationiques ou amphotères qui présentent un intérêt pour cette entreprise puisque cette recherche permet de diversifier l'éventail de polymères amphiphiles dégradables de RHODIA tout en valorisant par exemple la PCL dont les applications biomédicales, et environnementales sont limitées par sa trop grande hydrophobie et sa cristallinité élevée qui réduisent sa dégradabilité par hydrolyse. Des recherches récentes menées au CRBA ont montré que la modification chimique par voie anionique d'une PCL commerciale permet de modifier les propriétés de base de ce polymère afin de l'adapter aux applications envisagées.

Ce mémoire de thèse de rend compte des travaux effectués afin de réaliser des structures polyester hydrosolubles à base PCL caractérisées par la présence de fonctions cationiques et/ou amphotères. La description des polymères synthétisés fera suite à des rappels bibliographiques divisés en deux parties. La première traite des copolymères amphiphiles et de leurs principales propriétés. Elle se divise entre structures non dégradables et structures dégradables et est plus particulièrement centrée autour de l'étude des copolymères dégradables amphiphiles à blocs et greffés. La seconde décrit les méthodes existantes de modification de PCL afin de définir les différentes voies d'accès à des structures originales à partir de ce polyester disponible industriellement.

CHAPITRE I
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A- Copolymères amphiphiles

Comme évoqué dans l'introduction, le terme amphiphile caractérise des copolymères dont la structure comprend deux types de segments, les uns hydrophiles, les autres hydrophobes. En solution, les copolymères amphiphiles peuvent ainsi être considérés comme des surfactants polymères ayant des propriétés similaires aux surfactants classiques de basse masse molaire. A concentration faible, les macromolécules sont isolées. Lorsque la concentration augmente et atteint une valeur critique appelée CMC (Concentration Micellaire Critique), les chaînes s'organisent sous l'effet d'interactions entre parties apolaires hydrophobes. On assiste alors à une ségrégation de phase qui permet de diminuer l'enthalpie de solubilisation des macromolécules avec apparition d'une structure de type cœur hydrophobe /couronne hydrophile si l'on est dans l'eau (Fig.1) .

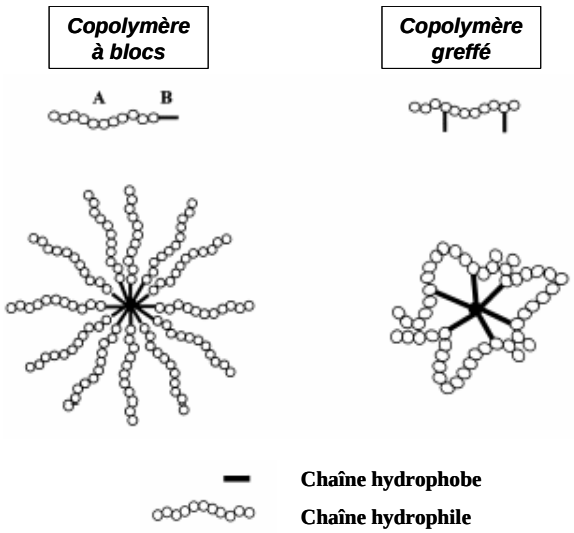


Figure 1 : Exemples d'auto-associations de copolymères amphiphiles en milieu aqueux

L'intérêt des surfactants macromoléculaires par rapport aux surfactants classiques réside entre autre dans les faibles valeurs de leurs CMC : 10^{-6}-10^{-7} M typiquement, contre 10^{-1}-10^{-4}M [4]. La relative stabilité des micelles formées, en particulier dans les milieux très dilués, explique leur intérêt dans le domaine de la délivrance de principes actifs. Il est possible dans certain cas d'augmenter cette stabilité en jouant sur les architectures, comme dans le cas de copolymères en peigne qui forment des agrégats stables, ou par des réactions de réticulations ciblées de la couronne ou du cœur des micelles voire des deux[5].

Un autre avantage des amphiphiles macromoléculaires réside dans le fait qu'ils forment des objets submicroscopiques dont la petite taille leur permet de circuler dans le corps et leur confère une certaine furtivité vis-à-vis du système reticuloendothelial, en particulier si la partie hydrophile contient

du PEO connu pour son effet « d'écran » vis-à-vis des protéines de défense. A ces avantages on peut ajouter ceux propres aux polyesters aliphatiques (PLA, PLAGA, et PCL) lorsque ces derniers sont utilisés comme bloc hydrophobe, notamment une dégradabilité intrinsèque qui, à son stade ultime, produit des métabolites entrant dans le cycle de Krebs ce qui leur assure une biocompatibilité quasi unique dans le monde des amphiphiles.

Les copolymères amphiphiles sont des copolymères c'est-à-dire des macromolécules constituées d'au moins deux types d'unités de répétition. La distribution de ces unités définit le type de copolymère. On trouve ainsi des copolymères statistiques, alternés, à bloc ou encore greffés (Fig.2a). Les copolymères à blocs sont les plus largement décrits et se divisent eux même en plusieurs sous-catégories : diblocs, triblocs, multiblocs, qui sont des structures linéaires, et les copolymères en étoiles et dendrimères qui sont des structures ramifiées (Fig.2b).

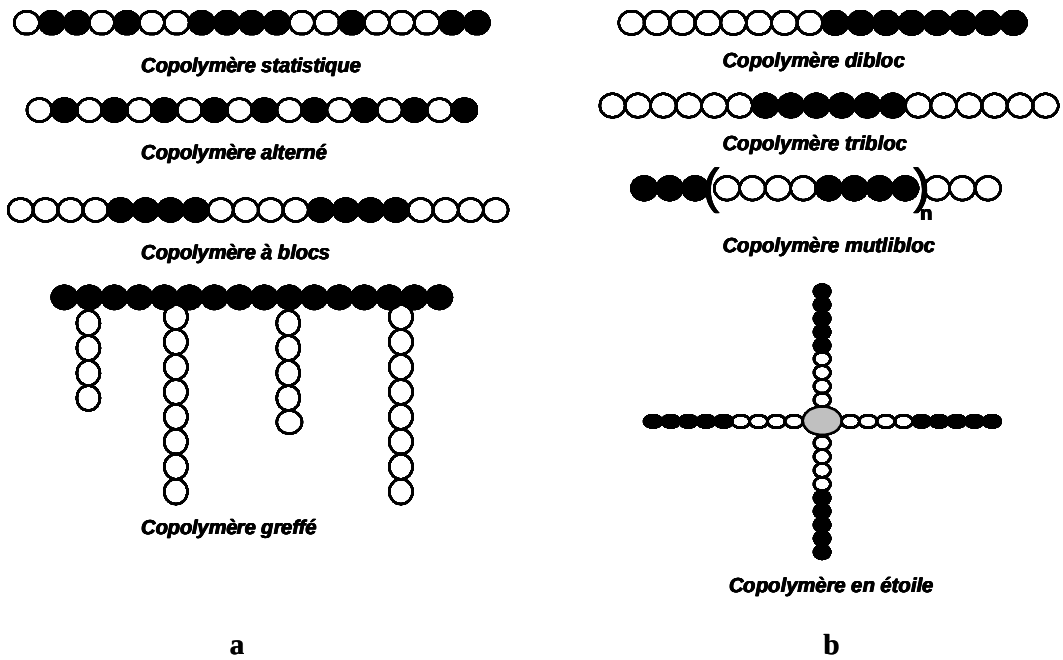


Figure 2 : Exemples d'architectures de copolymères

Du point de vue de la nature des constituants, on trouve une grande diversité de monomères utilisés pour former tant les segments hydrophobes qu'hydrophiles, ces derniers pouvant être non ioniques, cationiques ou anioniques, voire amphotères (Tab.3). Dans notre étude, on ne s'intéressera qu'aux copolymères comportant à la fois des segments hydrophiles et des segments hydrophobes, mais il faut noter ici qu'un grand nombre de structures amphiphiles « double hydrophile » (association d'un segment polyélectrolyte et d'un segment non ionique par exemple) sont décrites[6].

Le but de cette thèse étant de proposer de nouvelles structures polycationiques ou polyamphotères potentiellement (bio)dégradables, un intérêt tout particulier sera porté aux copolymères amphiphiles dont les segments hydrophiles sont ioniques ou ionisables et porteurs de charges cationiques. Comme

on le verra ultérieurement, la méthode de synthèse de nouveaux dérivés de la poly(ε-caprolactone) qui a été utilisée conduit à des copolymères greffés. On décrira donc succinctement les copolymères amphiphiles non dégradables avant de s'intéresser aux structures dégradables à blocs puis greffées.

I. Copolymères amphiphiles non dégradables :

Le Tableau 3 présente les différentes structures hydrosolubilisantes classiquement utilisés dans la synthèse de segments hydrophiles. On constate qu'hormis le PEG, qui est considéré comme dégradable au regard de sa biocompatibilité et de la possibilité d'excrétion reinale, tous les autres motifs forment des chaînes non dégradables. Ces monomères sont utilisés au sein de divers structures et en particulier des copolymères à blocs.

1) Copolymères amphiphiles non dégradables à blocs:

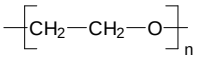
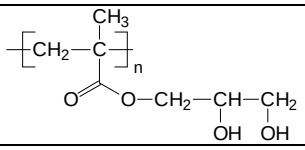
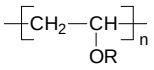
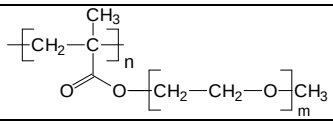
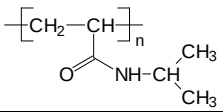
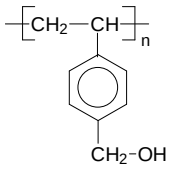
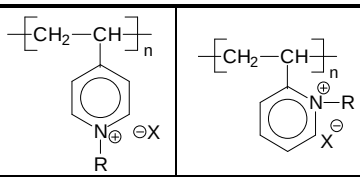
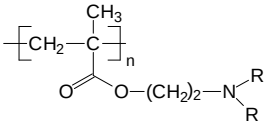
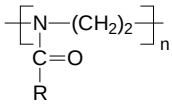
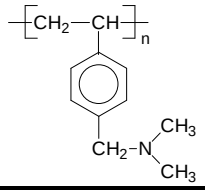
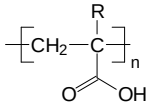
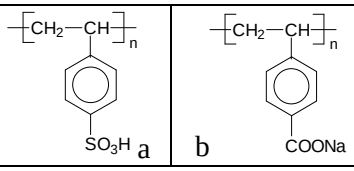
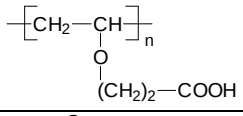
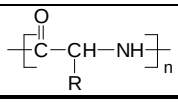
Ces copolymères sont les plus largement décrits dans la littérature. Leur synthèse peut se faire suivant 3 méthodes principales:

- la polymérisation séquentielle de monomères, que ce soit par polymérisation anionique, cationique ou par polymérisation radicalaire contrôlée
- des réactions de couplage de type polycondensation entre blocs téléchéliques de natures différentes et porteurs en bout de chaîne des fonctions réactives appropriées
- l'extension de chaînes en utilisant des agents de couplages bifonctionnels[7]

a) Non ioniques

Cette famille de copolymères est majoritairement composée de produits possédant des segments hydrophiles de poly(éthylène oxyde) (PEO). Ce type de copolymère a été développé dès les années 50 avec en particulier les tous premiers di- et triblocs Pluronic™ développés par Lundsted[8] et dont les segments hydrophobes sont du poly(propylène oxyde) (PPO). Leur succès a été rapide comme le prouve une revue écrite par Schmolka[9] en 1977 et dans laquelle sont détaillées les principales caractéristiques des 75 dérivés de PEO et PPO alors commerciaux : points troubles, hydrosolubilité, pouvoir mouillant, moussant, émulsifiant (etc…) ainsi que leurs principales applications industrielles. Plus récemment, Velichkova *et al.*[7] ont décrit dans une revue les différents amphiphiles à blocs obtenus à partir de prépolymères téléchéliques et de macromonomères. On trouvera dans le Tableau 4 la nature des segments hydrophiles et hydrophobes, le type de structure ainsi que quelques applications. Outre les dérivés de PEO qui représentent la plus grande part des segments hydrophiles, on trouve aussi des dérivés de type 2-alkyl-2-oxazoline dont les propriétés varient en fonction du type

Tableau 3 : Segments hydrosolubles[6]

	Bloc	Structure	Remarques	Type de polymérisation
Blocs hydrosolubilisants non ioniques	Poly(oxyde éthylène)		Point trouble 80°C, neutre / substrats	Anionique
	Poly(méthacrylate de dihydroxypropyle)		Neutre / substrats	Anionique (précurseur acétal)
	Poly(alcool vinylique) et Poly(éther vinylique)		Neutre / substrats Point trouble fonction de R	Cationique
	Poly(méthacrylate de poly(éthylène glycol))		Sensible à la force ionique	Radicalaire,PTG
	Poly(N-isopropyl-acrylamide)		Point trouble à 31°C	Radicalaire
	Poly(4-vinyl benzylalcool)		Souvent neutre / substrats	Radicalaire et TEMPO
Blocs cationiques	Poly(4-et 2-vinylpyridine) quaternisée		Polyélectrolytes forts	Anionique (4 et 2) Radicalaire et Tempo (2)
	Poly(méthacrylate de dialkylaminoéthyle)		Polyélectrolyte R=CH_3 PDMAEM Quaternisé CH_3 PTMAEM	Radicalaire PTG Anionique
	Poly(2-alkyloxazoline)		Polyélectrolyte R = CH_3, C_2H_5	Cationique
	Poly(4-N,N-diméthylaminométhyl styrène)		Polyélectrolyte	TEMPO Radicalaire
Blocs anioniques	Poly(acide méthacrylique)		Polyélectrolyte	Anionique GTP Radicalaire ATRP
	Poly(acide sulfonique styrène) / Poly(4-vinyl benzoate de sodium)		Polyélectrolytes (b) pH sensible	Anionique (a) TEMPO (ab) Radicalaire (ab) ATRP (b)
	Poly(vinyloxy-4-acide butyrique)		Polyélectrolyte	Cationique
	Poly(peptide)		Cationique, anionique ou neutre	POC NCA

d'alkyle utilisé, des poly(vinyl éthers), des dérivés méthacryliques, et quelques polyacétals. Tous les exemples d'amphiphiles cités montrent que le caractère amphiphile du copolymère est directement lié à la présence de groupements polaires hydrophilisants de type alcool, éther, voire amine ou acide sous leurs formes non ionisées.

Tableau 4 : Copolymères à blocs non ioniques obtenus à partir de téléchéliques et macromonomères [7]

Segments hydrophiles (A)	Segments hydrophobes (B)	Structures	Applications
• PEO • Poly(2-alkyl-2-oxazoline) • Poly(vinyléther) fonctionnalisés amine/alcool • Poly(méthyl vinyl éther) • Polyacétals • PGMA sulfoné • Poly(méthacrylate *de t*-butyle) partiellement hydrolysé • Poly(N-isopropyl acrylamide)	• PPO • PS • Poly(isoprène) • Poly(2-alkyl-2-oxazoline) • Poly(alkyl méthacrylate) • Poly(alkyl vinyl éther) • Poly(diméthylsiloxane) • Poly(2-méthylpropene) • Poly(oxytetraméthylène)	Diblocs Triblocs (ABA,BAB, BAC) Multiblocs (AB(BA)) Etoiles	Emulsion Transfert de phase Complexation Hydrogels Surfactant Electrostatisme

<u>Remarque</u> : dans le cas des méthyl et éthyl-2-oxazoline, on se trouve en présence d'un cas limite de copolymères non ioniques, puisque ces composés sont ionisables en fonctions du pH.

b) <u>Ioniques ou ionisables</u>

Cette classe de polymères amphiphiles a été largement développée au niveau industriel du fait des applications nombreuses liées à la présence de charges (détergence, agents antistatiques…). A côté de ces applications « historiques », on trouve celles plus récentes du domaine biomédical tirant profit des interactions entre amphiphiles ioniques et/ou ionisables et molécules biologiques chargées. C'est par exemple le cas des techniques de transfection de gène ou de certains anticoagulants.

Les segments hydrophiles sont constitués de toutes les familles classiques de monomères avec majoritairement des acryliques, des acrylamides et des vinyliques déjà cités dans le Tableau 3. Là encore, on trouve toutes les architectures de copolymères avec des structures di- tri- et multiblocs, des architectures en étoile, des dendrimères et même des réseaux. Tous les copolymères comportant ce type de segments hydrophiles forment spontanément des micelles ou des agrégats, parfois pH dépendants, dont le diamètre moyen est compris entre 20 et 100 nm.

Les Figures 3 et 4 reprennent les structures méthacryliques et acrylamides qui sont les plus nombreuses et sont souvent associées entre elles afin de former des copolymères amphiphiles. Le méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle (DMAEM) est l'un des monomères méthacryliques hydrophiles les plus utilisés. On le trouve associé à de nombreux comonomères de type méthacrylates d'alkyles[10,11] ou polyéther[12]. L'intérêt principal de ce monomère est que l'on peut augmenter

l'hydrophilie de la structure en effectuant une quaternisation de l'amine tertiaire latérale. Cette quaternisation est faite le plus souvent par réaction avec un halogénure d'alkyle et permet d'obtenir des charges vraies sur le copolymère modifié[10,13-15]. Il faut cependant noter que même sans quaternisation, les copolymères obtenus sont hydrosolubles du fait de la présence d'amines tertiaires ionisables par protonation. Les valeurs de pKa différentes de ces structures assurent à ces copolymères un caractère amphiphile.

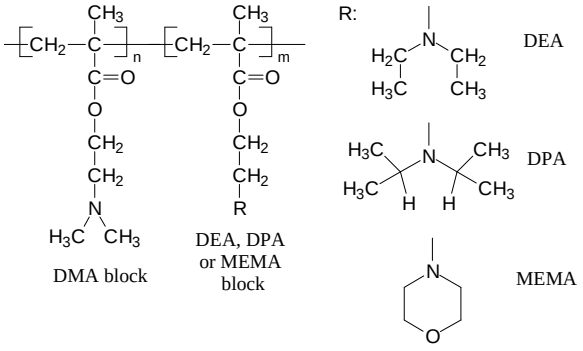


Figure 3 : Monomères méthacryliques aminés quaternisables

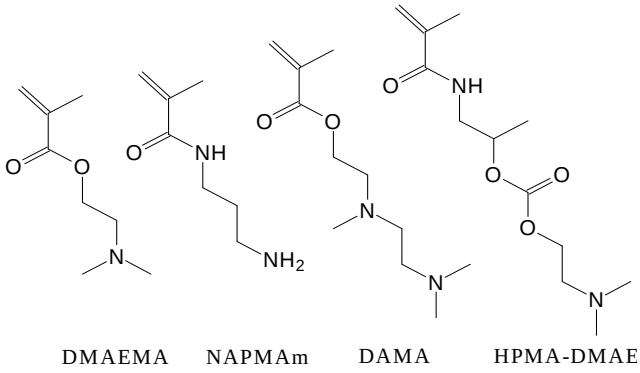


Figure 4 : Monomères méthacrylamides et méthacryliques aminés quaternisables[16]

<u>Remarque</u> : on trouve dans cette classe de polymères des copolymères zwitterions porteurs sur le même motif monomère de fonctions ammonium et carboxylique ou sulfonate[17-19].

En ce qui concerne les dérivés vinyliques on retrouve les monomères décrits dans le Tableau 3 avec en particulier les vinyl-pyridines sous leur forme quaternisée[20,21] ou non ionique[22]. Parmi les autres dérivés vinyliques utilisés figurent des chloro-vinyl styrènes quaternisés par réaction avec des amines tertiaires et copolymérisés avec du PEG, du PS[23,24], des copolymères de poly(vinylimidazoles) quaternisés /PEG[25] ou encore des poly(vinyl éther) porteurs de fonctions amine primaire[26].

Enfin, une famille importante de polymères cationiques utilisée pour la synthèse de copolymères à blocs est celle des poly(alkyl oxazolines). Comme on l'a déjà remarqué, cette famille de polymères est un cas limite puisque si le groupe alkyle est de type méthyle ou éthyle on se trouve en présence de dérivés ionisables utilisés comme segments hydrophiles alors que des chaînes alkyle plus longues conduisent à l'obtention de segments hydrophobes. Outre les structures répertoriées dans le Tableau 3, des blocs de poly(2-méthyl-2-oxazoline) sont par exemple associés à des poly(2-phényl-2-oxazoline)[27], à des segments perfluorés poly[2-(2-perfluorooctyl)éthyl-2-oxazoline][28], à des poly(vinyl éther)[29] ou encore à des dérivés poly(amido amines)[30,31].

2) Copolymères amphiphiles non dégradables greffés:

Les copolymères greffés constituent une classe de copolymères de plus en plus étudiée du fait de leurs propriétés rhéologiques originales par rapport à leurs analogues à blocs. Il existe diverses voies d'accès à ces structures.

La première est la voie de la copolymérisation d'un monomère à partir d'un squelette polymère préalablement activé, appelée greffage " from ". Cette méthode reste la plus répandue bien qu'elle présente l'inconvénient de ne pas permettre le contrôle de la longueur des chaînes ni du nombre de séquences greffées. La seconde voie consiste en un greffage d'oligomères monofonctionnels préalablement préparés sur un polymère porteur de groupes fonctionnels. Il s'agit de la voie du greffage " onto " qui est en plein développement car elle conduit à des structures mieux maîtrisées (Fig.5).

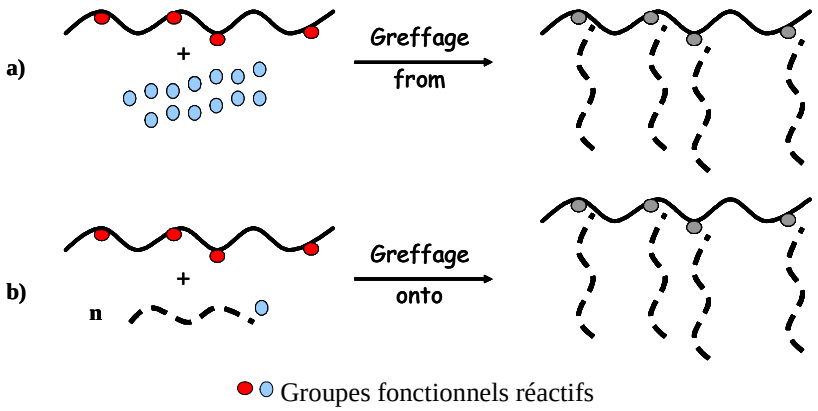


Figure 5 : Techniques de greffage a) « from » et b) « onto »

Comme nous le verrons plus loin, les structures greffées à base de PCL synthétisées au cours de ce travail de thèse font appel à ces deux stratégies.

On trouve principalement trois catégories de copolymères greffés :

- les copolymères à squelette principal hydrophile et chaînes latérales hydrophobes (Fig.6a)

- les copolymères à squelette principal hydrophobe et chaînes latérales hydrophiles (Fig.6b)

- les copolymères à squelette et chaînes latérales hydrophiles qui ne seront pas développés.

En accord avec la thématique de recherche qui intéresse RHODIA, on ne décrira dans ce qui suit que les copolymères greffés porteurs de charges cationiques vraies ou porteurs de fonctions ionisables conférant dans des conditions adéquates un caractère cationique à la structure. Etant donné l'importante littérature couvrant les structures non dégradables, on ne se limitera qu'à quelques exemples pour chaque type de copolymère décrit.

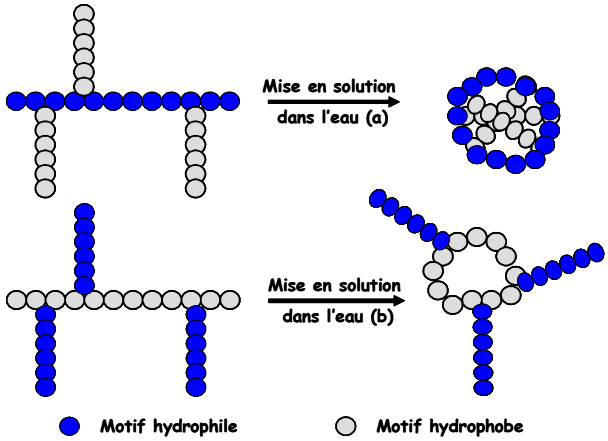


Figure 6 : Comportement des copolymères greffés en milieu aqueux en fonction de la nature des squelettes et des chaînes latérales

a) Squelettes hydrophiles ioniques / chaînes hydrophobes

Les dérivés non dégradables utilisés sont principalement de type polyoxazoline ou polyméthacrylate[32-34]. Pantchev *et al.*[33] ont, par exemple, synthétisé un copolymère à chaîne principale DMAEM et chaîne latérale PEtOz et PPhOz. Le squelette a été préalablement polymérisé par voie radicalaire alors que les dérivés d'oxazoline l'ont été par polymérisation cationique amorcée par le chlorure de benzyle. Le greffage est assuré par une réaction de type Menschutkin entre la chaîne PROz en croissance et l'amine tertiaire du PDMAEM. Le copolymère greffé comporte donc une charge cationique par greffon (Fig.7)

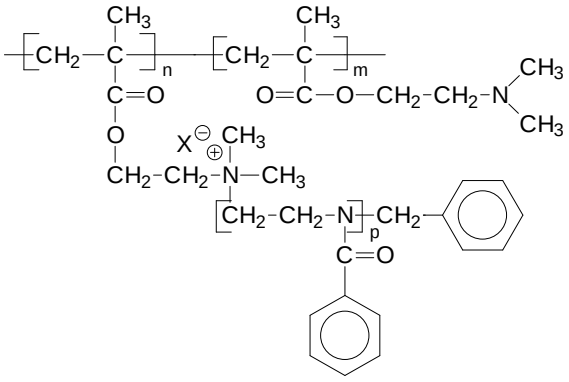


Figure 7 : Copolymère PDMAEM-g-PPhOz

<u>Remarque</u> : là encore le cas de PDMAEM-g-PEtOz est un cas limite de structure à chaîne latérale hydrophobe puisque sous certaines conditions le PEtOz est sous forme protonée. Il faut en outre noter que le copolymère à chaîne PPhOz, malgré son caractère amphiphile n'est pas hydrosoluble.

Muehlebach *et al.*[35] ont synthétisé des copolymères PDMAEM-*g*-poly(ABu) et poly(DMAA)-*g*-poly(ABu) par polymérisation radicalaire de macromonomères de P(ABu) et des monomères acryliques. Dans les deux cas les composés forment des objets de 25 à 145 nm de diamètre.

b) Squelettes hydrophobes/ chaînes hydrophiles

Ces structures sont les plus courantes. Un brevet de Miyama datant de 1974 donne de nombreux exemples de structures greffées à squelette hydrophobe[36]. On trouve principalement des squelettes vinyliques avec en particulier de très nombreux dérivés du polystyrène (PS). Ce polymère a été associé à des chaînes anioniques de type poly(styrène sulfonate de sodium)[37] ou poly(acide méthacrylique)[38], avec des segments non ioniques de type PPO et PEO[39] ou encore cationiques. C'est, par exemple, le cas du copolymère PS-*g*-poly(bromure de [4-vinyl,N(*n*-butyl)pyridinium]) décrit par Riza *et al.*[40] obtenu par copolymérisation du styrène et du macromonomère correspondant. Une autre structure cationique originale, basée sur des chaînes latérales PEO modifiées, a été décrite par Berlinova *et al.*[41]. Le groupe phtalimide d'un squelette poly(phthalimidoacrylate-*co*-styrene) est substitué par une chaîne PEO α-trimethylammonioethyl-ω-amino fonctionnalisée. Un copolymère greffé à chaînes latérales PEO portant une fonction ammonium est ainsi obtenue (Fig.8)

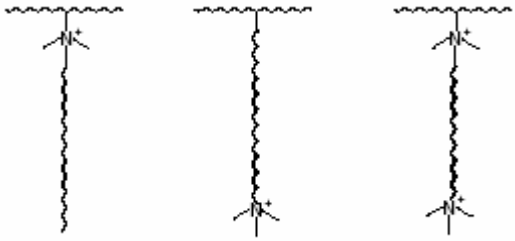


Figure 8 : Poly(phthalimidoacrylate-co-styrene) greffés par des ammonium-PEG

Dans le même esprit, Ishizu *et al.*[42,43] ont synthétisé des terpolymères à base de PS contenant des segments polyamine, et des segments polyéther. Les structures PS-*g*-(PTHF-*b*-PMeOz) et PS-*g*-(PPO-*b*-PMeOz) ont été préparées et l'hydrolyse alcaline des segments PMeOz a permis de passer à un composé polycationique PS-*g*-(PPO-*b*-PEI). D'autres exemples à base de PS et de chaînes latérales 2-oxazoline sont donnés dans une revue de Kobayashi[44] qui cite en particulier le travail de Schulz *et al.*[45] ayant copolymérisé des macromonomères poly(2-alkyl-2-oxazoline) avec des dérivés méthacryliques et vinyliques.

En ce qui concerne les autres monomères utilisés comme chaîne principale on trouve le PVC[46] qui permet d'amorcer la polymérisation de monomères cationiques de manière photo-induite, des N-vinylformamides associés à des macromonomères de PDMAEM quaternisés par CH_3I[47], des polyméthacrylates ou encore des polyalkylènes. Pour ces deux dernières familles, on peut citer le travail de Nuyken *et al.*[48-50] qui ont synthétisé des dérivés amphiphiles par polymérisation par ouverture de cycle de la 2-méthyl-2-oxazoline amorcée par les motifs *p*-chlorométhylstyrene (CMS) de copolymères statistiques poly(CMS-*co*-MMA) et poly(CMS-*co*-isobutène).

Outre ces monomères relativement classiques, des structures plus originales sont décrites dans la littérature comme le polymère super-greffé (une chaîne par atome de carbone de la chaîne principale) décrit par Grassl *et al*.[51]. Cet amphiphile est obtenu par homopolymérisation d'un macromonomère de poly(oxyde de tétraméthylène) fonctionnalisé en extrémité de chaîne par du 3-(diméthylamino)propyl isocyanure.

Remarque : on ne s'intéresse pas ici au greffage sur des surfaces. Il y a toutefois des exemples de plaques de polypropylène ou polyéthylène sur lesquelles sont polymérisées des 4-vinylpyridine ou des DMAEM par photo amorçage ou par irradiation.

II. Copolymères amphiphiles dégradables :

Comme indiqué dans l'introduction, les nouvelles exigences des consommateurs, relayées par le monde industriel, ont amorcé l'essort des polymères dégradables dans des domaines jusqu'alors réservés aux plastiques de grande diffusion. Le domaine des amphiphiles n'échappe pas à cette tendance où les polymères dégradables, de par leur nature, sont employés comme segments hydrophobes. On se propose dans ce paragraphe de décrire rapidement les différentes familles de squelettes dégradables et leur dégradation avant de s'intéresser aux amphiphiles qui en dérivent.

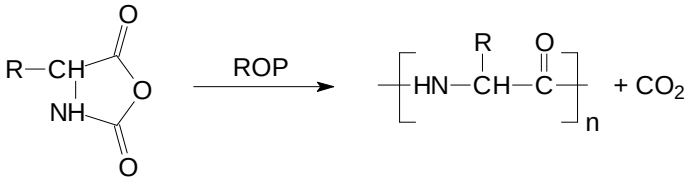
1) Polymères dégradables:

D'un point de vue historique, les premiers matériaux dégradables utilisés ont été ceux d'origine naturelle telle que la cellulose, les protéines et leur dérivés plus complexes : cuir, laine, os… La modification chimique de ces composés a permis d'en multiplier les fonctionnalités et d'en diversifier les emplois. Mais ces processus de modification sont à la fois difficiles à contrôler et réduisent, voire suppriment, la dégradabilité. C'est pourquoi, dès les années 60, des recherches ont été impulsées dans le domaine biomédical afin de trouver une alternative aux matériaux naturels sous la forme de macromolécules synthétiques dégradables[3]. On décrira succinctement les squelettes dégradables existant en se limitant aux polymères de synthèse qui sont tous caractérisés par la présence de liaisons « fragiles » dans leur enchaînement. On s'intéressera ensuite à l'une des familles les plus importantes parmi ces polymères dégradables, celle des polyesters aliphatiques avec une étude plus poussée de la PCL.

a) Polymères dégradables non polyesters

i. Poly(amides)[52,53]

La plupart des poly(amides) dégradables décrits dérivent directement d'acides aminés utilisés sous leur forme N-carboxyanhydride (NCA) et polymérisés par ouverture de cycle (Fig.9). On trouve en particulier de nombreux polymères et copolymères à base de L-Lysine et d'acide glutamique (γ-alkylester de poly(L-glutamate), poly(N-alkyl L-glutamine)…).



N-carboxyanhydride

Figure 9 : N-carboxyanhydride et obtention d'un poly(acide α-aminé)

Des structures de type poly(pseudo acide aminé) ont aussi été préparées. Il s'agit de polymères synthétiques à bases d'acides aminés liés par une liaison ester, carbonate ou uréthane. Des polyiminocarbonates et polycarbonates ont été obtenus à partir de tyrosine (Fig.10) alors que des polyesters ont été synthétisés à partir d'une proline modifiée.

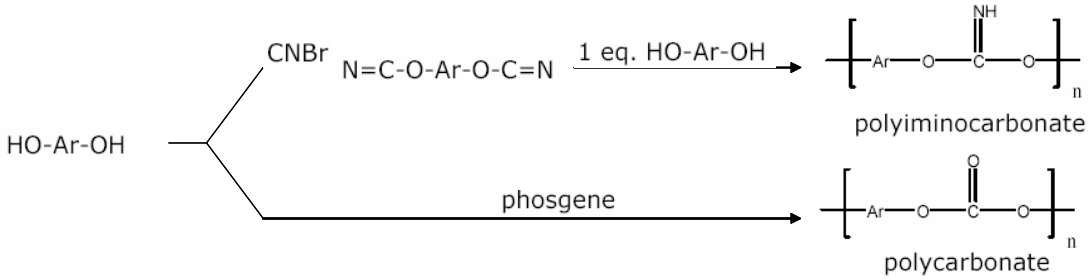


Figure 10 :Schéma de synthèse de polyiminocarbonates et polycarbonates

L'intérêt principal des poly(acides aminés) réside dans le fait qu'ils sont en principe biodégradables et pour la plupart fonctionnels ce qui donne ainsi accès à des polymères porteurs d'amines, d'acides carboxyliques ou d'alcools.

ii. Poly(phosphoesters)[52,54]

Cette famille comprend les poly(phosphates), les poly(phosphites) et les poly(phosphonates) qui peuvent être ou non hydrosolubles (Fig.11). Ces polymères sont obtenus par réaction entre un composé phosphorodichloré et divers diols. La liaison phosphoester est facilement rompue dans les conditions physiologiques ce qui conduit à des produits de dégradations non toxiques : phosphates, alcools, amines, dioxyde de carbone.

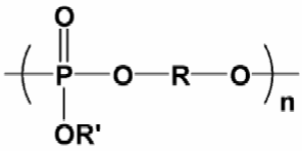


Figure 11 : Structure générale des poly(phosphates)

Une grande diversité de structures est accessible du fait de la pentavalence du phosphore et des fonctions qui peuvent être introduites sur la chaîne latérale des poly(phosphates) et poly(phosphonates). Les polyphosphoesters peuvent ainsi être hydrophobes lorsqu'ils portent une chaîne latérale R' alkyle, ou hydrosolubles. Zhao *et al.*[54] ont proposé des composés de type phosphate et phosphoramide cationiques et porteurs de fonctions ammonium quaternaire ou amine tertiaire de masse molaire environ 3.10^4 g/mol. Ces composés ont été testés en transfection de gènes (Fig.12).

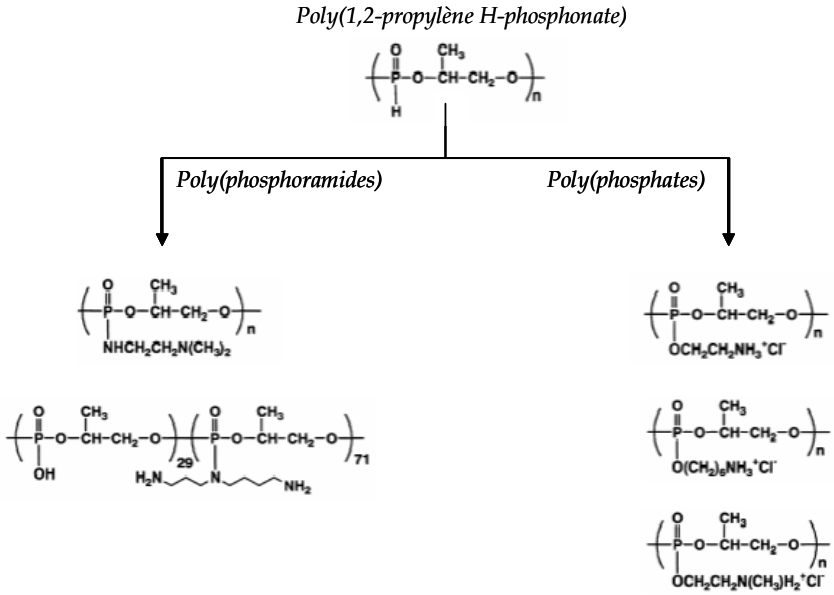


Figure 12 : Synthèse de polyphosphoesters cationisables ou cationiques

iii. <u>Poly(phosphazènes)</u>[52,55]

Dès les années 60, Allcock s'est intéressé à la synthèse de polyphosphazènes dont la particularité est de posséder un squelette inorganique et dégradable dont le motif de répétition de type (N=P) peut, en fonction des substituants qui lui sont adjoints, conduire à des résidus de type phosphate et ammoniaque. La synthèse de ces polymères se fait normalement à partir de la polymérisation par ouverture thermique du cycle hexachlorotriphosphazène qui conduit à un prépolymère polydichlorophosphazène de forte masse molaire et de grande polymolécularité (Fig.13). La polymérisation cationique de phosphoranimines est une alternative conduisant à un meilleur contrôle des structures.

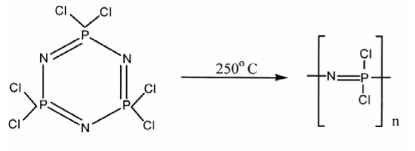


Figure 13 : Polydichlorophosphazène

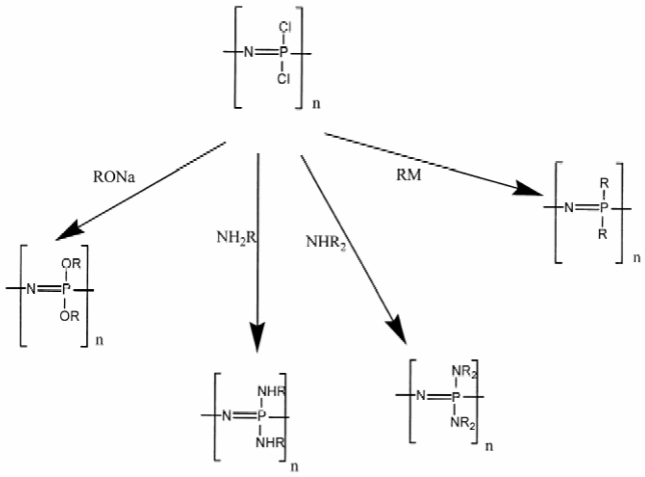


Figure 14 : Synthèse de poly(phosphazènes) fonctionnalisés

Différentes classes de poly(phosphazènes) ont été obtenues par substitution à température ambiante des atomes de chlore par des groupes alcoxyde ou aryloxyde, des groupes amines I^{aire} et II^{aire}, ou encore de dérivés organométalliques (Fig.14).

La plupart des poly(phosphazènes) sont hydrolytiquement stables mais un choix judicieux de substituants (amines à bas pKa, groupes alcoxy) permet d'obtenir une dégradation hydrolytique voire une biodégradation.

iv. Poly(orthoesters)[52,56]

Dans les années 70, Heller *et al.*[56] ont été les premiers à synthétiser ces composés suivant le schéma réactionnel donné dans la Figure 15.

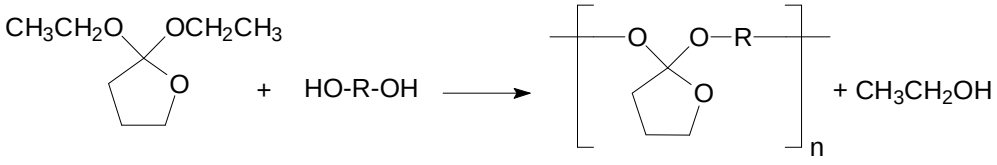


Figure 15 : Poly(orthoesters) de type I

La structure donnée ci-dessus est dite de type I et a fait l'objet de brevets pour des produits connus sous la dénomination Alzamer®. En présence d'eau, ces chaînes se dégradent rapidement pour redonner le diol et l'acide γ-hydroxybutyrique et sont donc stabilisés par addition d'une base faible (Na_2CO_3) empêchant une autocatalyse acide de la dégradation. Malgré cette stabilisation il ne sont plus utilisés. Depuis, la famille des poly(orthoesters) s'est enrichi de 3 autres type de polymères (II,III et IV), plus stables.

Le type II est issu de la polycondensation d'un diol avec un acétal de dicétène. Il est très hydrophobe et donc très stable, même en présence d'eau. Le type III résulte de la réaction d'un triol porteur de

deux groupes hydroxyle vicinaux avec un alkyl orthoacétate (Fig.16). Enfin le type IV est basé sur une modification du type II permettant le contrôle du taux de dégradation sans avoir recours à des additifs. Cette modification repose sur l'intégration dans le squelette hydrophobe d'oligomères téléchéliques hydroxyles de PLA ou PGA.

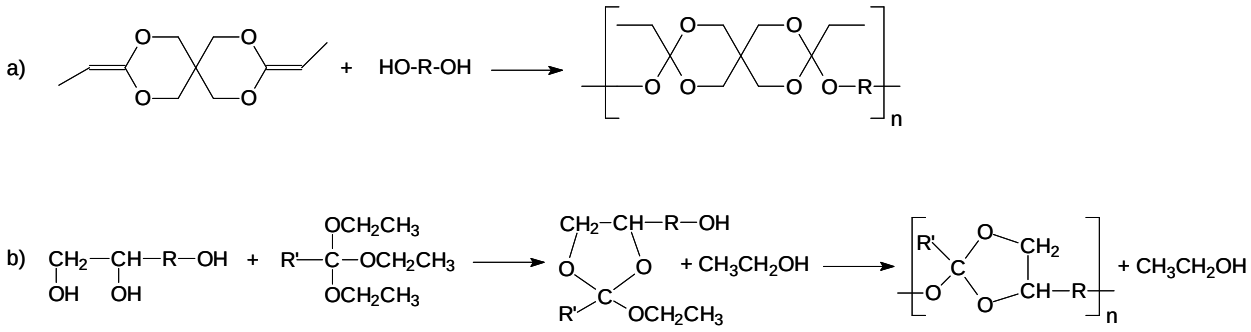
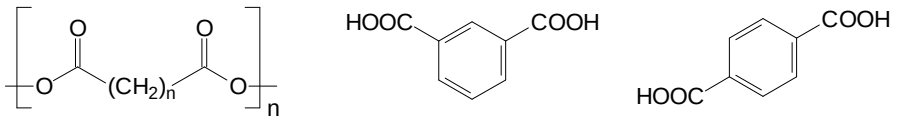


Figure 16 : Poly(orthoesters) a) de type II et b) de type III

v. *Poly(anhydrides)*[52]

Ces polymères ont été synthétisés et étudiés avec pour objectif d'en faire des fibres textiles, ce qui est le cas des poly(anhydrides) aromatiques à base d'acide téréphtalique ou isophtalique et des poly(anhydrides) à bases d'hétérocycles (Fig.17). Cependant, leur sensibilité à l'hydrolyse les a détournés de cette première application vers une utilisation dans le domaine biomédical où cette fragilité ainsi que leur hydrophobie les rendent intéressant pour la délivrance de principes actifs.



Polyanhydride | Acide isophtalique | Acide téréphtalique

Figure 17 : Structure générale des polyanhydrides non cycliques et principaux diacides cycliques utilisés

Ils sont pour la plupart préparés par polycondensation à l'état fondu. La première étape, en présence d'acide acétique, permet de passer d'un diacide carboxylique à un dianhydride. Ce dernier est ensuite polycondensé sous vide afin d'éliminer l'acide acétique qui se forme. Les deux autres méthodes sont la polycondensation en solution et l'ouverture de cycle.

Les poly(anhydrides) sont très sensibles à l'hydrolyse qui peut être catalysée par les acides et les bases. La structure des polymères, et en particulier leur plus ou moins grande hydrophobie, influe sur leur vitesse de dégradation. En outre, en dehors des poly(anhydrides) aromatiques, ils subissent tous

une auto-dépolymérisation que ce soit à l'état solide ou liquide, et ce même en conditions anhydres, ce qui limite leurs applications à la délivrance de principes actifs.

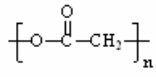
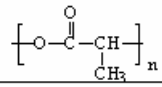
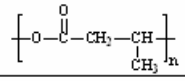
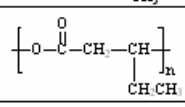
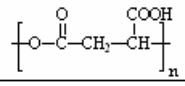
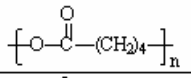
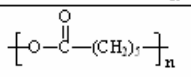
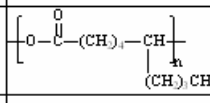
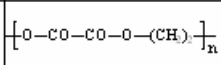
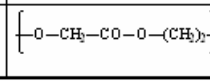
b) Polyesters aliphatiques

La profusion d'unités structurales pouvant conduire aux polyesters est telle que ces polymères possèdent un très vaste éventail de propriétés qui explique leur succès dans des domaines aussi divers que les applications temporaires biomédicales, les cristaux liquides, les fibres textiles (Dacron™, Terylene™) ou encore les matériaux à haute résistance thermique (polyarylates). Le domaine environnemental n'est pas exclu avec en particulier un grand nombre de sacs dégradables à base de polyesters aliphatiques (Tab.5).

Ils sont théoriquement dégradables par hydrolyse du fait de la réversibilité thermodynamique qui caractérise l'estérification. Mais en pratique la grande hydrophobie et parfois la cristallinité élevée de ces composés, en particulier dans le cas des polyesters aromatiques, empêche tout contact intime entre le milieu aqueux et le polymère rendant leur dégradation impossible ou trop lente. Ce n'est cependant pas le cas pour les composés aliphatiques possédant les plus courtes chaînes carbonées tels que les PGA, PLA, et dans une moindre mesure la PCL principalement biodégradable en présence de microorganismes. Cette dégradabilité explique l'utilisation importante de ces polymères dans les domaines agricole et biomédicale. On se limitera dans ce qui suit à la description des structures polyesters répondant à ce critère. Après une brève présentation de l'ensemble de cette classe de polymères on s'intéressera plus particulièrement aux dérivés PLA et PCL.

Les polyesters aliphatiques appartiennent à une famille de polymères qui comprend à la fois des composés d'origine naturelle produits par voie bactérienne, les poly(β-hydroxyacides), et des composés synthétiques obtenus soit par polycondensation d'hydroxyacides ou de diacides et diols, soit par ouverture d'hétérocycles de type lactone. Le Tableau 5 rend compte des principales structures polyesters aliphatiques existantes[57].

Tableau 5 : Polyesters aliphatiques

Type de polyesters aliphatiques	Polymères et acronymes	Structures
Poly(α-hydroxyacides)	Poly(acide glycolique) PGA	
	Poly(acide lactique) PLA	
Poly(β-hydroxyacides)	Poly(hydroxybutyrate) PHB	
	Poly(hydroxyvalérate) PHV	
	Poly(β-acide malique) PMLA	
Poly(γ-hydroxyacides)	Polyvalérolactone PVL	
Poly(ε-hydroxyacides)	Poly(ε-caprolactone) PCL	
	Poly(ε-décalactone) PDL	
Autres	Poly(1, 4-dioxane-2, 3-dione)	
	Poly(*para*-dioxanone) PDS	

i. Polyesters aliphatiques d'origine bactérienne

Ces polymères sont produits par une fermentation bactérienne contrôlée impliquant des organismes présents dans la nature. Cette famille comprend entre autres l'homopolymère PHB, ainsi que ses copolymères avec d'autres β-hydroxyacides dont la composition peut être ajustée (0-95% de 3-hydroxybutyrate) par contrôle de la source carbonée fournie aux microorganismes. On trouve également des copolymères de 3-HB et d'acide 4-hydroxybutyrique.[52] Ces polymères se biodégradent dans le sol et les boues activées lorsque les microorganismes appropriés sont présents. En revanche, ils subissent une dégradation hydrolytique relativement lente en milieu tampon phosphate et *in vivo* du fait de l'absence d'enzymes nécessaires. D'un point de vue industriel, des copolymères PHB-*co*-PHV sont proposés sous la marque Biopol™ par Metabolix pour des applications dans le domaine de l'emballage, des fibres, des adhésifs... Cette famille de polyesters comprend aussi les PMLA, analogues carboxylés des PHB, qui sont produits sous leur forme isomère R par des microorganismes alors que tous les stéréoisomères peuvent être synthétisés. Les PMLA sont peu développés du fait de leur dégradation trop rapide en milieu aqueux.[3]

ii. Polyesters aliphatiques de synthèse

Comme on l'a évoqué plus haut, les polyesters de synthèse peuvent être obtenus soit par polycondensation d'hydroxyacides ou de diacides et diols, soit par ouverture d'hétérocycles de type lactone. Concernant les premiers, on se réfèrera à une revue écrite par Edlund et Albertsson[58] qui présente l'ensemble des composés polyesters obtenus par polycondensation de diacides ainsi que leurs applications en tant que polymères dégradables ou non et leurs copolymères poly(ester-amides, -imides et -uréthanes). A titre d'exemple, on citera seulement les homo- et copolyesters d'éthylène glycol ou 1,4-butanediol et d'acide succinique ou adipique qui sont biodégradables. C'est le cas des poly(butylène succinate–*co*-butylène adipate), commercialisés sous le nom Bionolle™, et utilisés sous forme de pots pour plantes vertes. Le problème commun des polycondensations étant de conduire à des masses molaires faibles, le recours à des agents de couplage est quasi obligatoire pour augmenter ces masses et obtenir ainsi des propriétés mécaniques acceptables.

α) Polyesters à base de lactide et de glycolide[52,57]

Les poly(acides lactiques) (PLA), le poly(acide glycolique) (PGA) et les copolymères correspondants sont les polymères dégradables les plus utilisés.

Comme on l'a vu dans le Tableau 1, ils sont utilisés dans une certaine qualité pour la fabrication de sacs dégradables et autres objets : Naturework™ de Dow-Cargill ou Biophan™ de Trespaphan. Récemment une collaboration Mitsui / Sanyo Mavic Media s'est concrétisée par la production de disques CD musicaux, de CD-Rom et de disques vidéo en PLA. Mais leur développement est surtout lié à l'industrie biomédicale où ils sont couramment utilisés depuis plus d'une trentaine d'année. Leurs nombreuses applications biomédicales ont fait l'objet d'une revue écrite par Ueda et Tabata[59] et sont reprises dans le tableau ci-dessous (Tab.6).

Tableau 6 : Applications biomédicales de PLA, PGA et copolymères

Application		Matériau	Nom commercial
Implants chirurgicaux	fils de sutures	PGA PLAGA, poly(GA/triméthylène carbonate/dioxane)	Dexon® Vicryl® Biosyn®
	chirurgie osseuse (plaques et vis)	PLA	Phusiline®, Bioscrew®, Sysorb®
	renforcement tissulaire (tricots)	PGA PLAGA	Dexon Mesh®, Neoveil® Vicryl Mesh®
	peau artificielle	PLAGA	Dermagraft®
	cartilage artificiel		Neocyte®
	dure-mère spinale		Ethisorb®
Libération contrôlée de principes actifs	implants (gels, éponges poreuses, films et tissus)	PLAGA	Décapeptyl® LP, Zoladex®, Enantone®, Bigonist® Sandostatine®

➢ Synthèse :

Les PLA et PGA sont principalement obtenus par deux voies de synthèse. La première est la polycondensation acido catalysée des acides lactiques et/ou glycolique. Les masses molaires obtenues sont faibles (M<5000 g/mol) et les matériaux préparés par cette voie ne présentent aucune propriété mécanique intéressante. La seconde est la polymérisation par ouverture des cycles glycolide et/ou lactide. Ce dernier existe sous trois formes diastéréoisomères et un mélange racémique. Dans le cas des PLA, la polymérisation se fait la plupart du temps en masse à température élevée, 140-180°C, et sous pression réduite en présence d'un catalyseur. Elle peut également se faire en solution. Plusieurs mécanismes ont été étudiés : cationique, anionique et coordination-insertion. Les copolymères statistiques PLAGA sont synthétisés de la même manière mais à des températures légèrement plus basses.

Afin de définir les différents types de stéréo et copolymères de PLA et PGA, une nomenclature a été proposée par Vert[60]. Elle est basée sur la teneur en unités L-lactique où la notation PLA_x définit un PLA contenant X % de ces unités. Ainsi, un PLA_{100} est un homopolymère de L-lactique, un PLA_{75} contient 25% d'unités D, et un $PLA_{37,5}GA_{25}$ est un copolymère contenant 37,5% de chacun des stéréoisomères L- et D-lactique et 25% de motifs glycolique.

➢ Propriétés :

Les bonnes propriétés mécaniques de ces matériaux, et en particulier du PLA_{100}, expliquent en partie le succès rencontré par ces polymères. Le module de conservation (composante élastique du module complexe obtenu dans le cas où les contraintes sont sinusoïdales et de faibles intensités) et la contrainte de rupture sont élevés, mais tendent à diminuer avec l'incorporation d'unités D-lactique ou glycolique (Tab.7). Du point de vue de leurs propriétés physico-chimiques les P(D-LA) et P(L-LA) sont semblables alors que le polymère racémique est très différent. Les deux premiers sont semi-cristallins avec une Tg entre 48 et 59°C et une température de fusion pouvant aller de 130 à 196°C en fonction des conditions de cristallisation et des masses molaires. Les PLA_x voient leur température et leur enthalpie de fusion diminuer avec l'incoporation d'unités D ou L-lactique et sont totalement amorphe à partir de 15% de D ou L-LA. La plupart des PLAGA sont amorphes et ont une température de transition vitreuse, et de fusion le cas échéant, qui diminuent avec la teneur en unités glycolique.

Tableau 7 : Propriétés mécaniques de PLA et PGA

Polymère	**Tg** (℃)	**Tf** (℃)	**Module de conservation** (Mpa)	**Contrainte à la rupture** (Mpa)	**Elongation à la rupture** (%)
PLA_{100}	48-59	130-196	3600	50-65	2,1-3
PLA_{50}	56	/	3200	48	8,7
PGA	35	210	/	/	/

L'une des plus importantes propriétés de ces polymères est leur biocompatibilité. Cette dernière est à l'origine de leurs nombreuses applications médicales et est d'autant plus importante que les produits de dégradation ultime sont des métabolites. De nombreuses études ont été menées sur ce sujet, en particulier par Vert *et al*.[60] qui ont montré la biorésorbabilité de ces composés et se sont intéressés à leur dégradabilité en fonction de divers facteurs, notamment la composition en unités D et L-lactiques[61-64], la morphologie du matériau[65], la taille du matériau (phénomènes d'autocatalyse et diffusion d'oligomères[62,63]) et les masses molaires. Bien que l'hydrolyse soit le facteur principal intervenant dans la dégradation, la dégradation enzymatique de ces composés par la protéinase K, protéine non humaine, a également été étudiée[66]. Dans le cas des PLAGA, la vitesse de dégradation augmente avec la teneur en unités glycolique. Les polymères PLAGA ne sont pas à proprement parler biodégradables dans les organismes animaux et humains, mais ils sont bio résorbables de par leur produits de dégradation hydrolytiques simples.

Plus généralement, il faut remarquer que tout ce qui rend les polymères PLA_xGA_y moins cristallins et plus hydrophiles favorise leur dégradation. La grande diversité des structures de PLA_xGA_y, liée à l'existence de stéréoisomères de PLA, permet de moduler cette vitesse de dégradation ainsi que les propriétés mécaniques à moindre coût et justifie le vaste éventail d'applications commerciales de ces polymères, même si les marchés restent petits en quantités.

β) Poly(ε-caprolactone)

La PCL, tout comme les polymères à base de lactide et glycolide, fait partie de la famille des polyesters aliphatiques. Elle est produite industriellement (Tone®, Capa®) et trouve de nombreuses applications. Elle est, par exemple, utilisée en tant que thermoplastique, sans lien avec sa dégradabilité, pour des semelles de chaussures ou des adhésifs à base de polyuréthanes où ce sont sa bonne compatibilité avec les autres polymères, sa pigmentation aisée, et ses propriétés physicochimiques (Tg basse, semi-cristallinité, température de fusion modérée) qui la rende attractive. Sa dégradabilité est variable en fonction des conditions de dégradation avec une dégradation relativement rapide en présence de microorganismes mais lente par hydrolyse. Ces variations sont mises à profit dans la fabrication de sacs dégradables (Bioplast®) ou de films de paillages, rapidement dégradés dans l'environnement, et des applications dans le domaine biomédical où c'est cette fois-ci sa dégradation hydrolytique lente et ses propriétés mécaniques qui sont intéressantes. Elle est par exemple utilisée sous forme d'implant permettant la libération prolongée d'un contraceptif sur une période d'un an (Capronor®), sous forme de fils de sutures PGA/PCL (Monocryl®, Monosyn®), sous forme de substitut de dure-mère en PLA et PCL[59]. Des études sont également en cours en vue de son utilisation en tant que matrice en ingénierie tissulaire[67] et en tant que coeur hydrophobe dans la préparation de micelles, applications pour lesquelles sa résistance à la dégradation est un facteur limitant.

➢ Synthèse :

La méthode de choix pour la synthétise de PCL est la polymérisation par ouverture de cycle de l'ε-CL, lactone issue de l'oxydation de la cyclohexanone. Trois types de mécanismes sont décrits dans la littérature : anionique qui donne de faibles masses molaires, cationique ($\overline{Mn}$ = 15 à 50.10^3 g/mol) et par coordination[68]. Cette dernière est la plus utilisée. Les amorceurs utilisés sont alors le di-n-butyl zinc[68], les chlorures et octanoate d'étain[69,70], les alkylates et halogénures d'Al, Mg, Sn, Ti, Zi et Zn[71-73] et les lanthanides[74]. Le 2-éthylhexanoate d'étain, ou octanoate d'étain, est le plus largement utilisé. Généralement, la polymérisation a lieu sous argon à 120°C et conduit à des polymères ayant une faible polymolécularité et des masses molaires supérieures à 50.10^3 g/mol.

Il est également possible d'obtenir la PCL par polymérisation radicalaire de 2-méthylène-1,3-dioxepane comme l'ont montré Bailey *et al.*[75] ou par d'autres méthodes alternatives comme celle utilisant des radiations micro-onde décrite par Song *et al.*[76].

Il faut noter que de nombreux copolymères de ε-CL et LA ont été synthétisés, principalement des copolymères à blocs. Ces derniers permettent de combiner la bonne perméabilité de la PCL aux principes actifs (10^4 fois supérieure à celle du PLA_{50}) à la bonne dégradation hydrolytique des PLA[52].

➢ Propriétés :

La PCL est soluble dans les solvants halogénés, les hydrocarbures aromatiques, la cyclohexanone et le 2-nitropropane. Elle est, par contre, insoluble dans les hydrocarbures aliphatiques, l'éther diéthylique, les alcools et l'eau.

Il s'agit d'un polymère semi-cristallin dont le taux de cristallinité est élevé. Il peut varier de 80% à 35-45% pour des PCL de 5000 à 60000 g/mol respectivement. La température de transition vitreuse d'une PCL est de -60°C environ alors que la fusion se produit entre 59 et 64°C selon la cristallinité. La température de décomposition est élevée (300°C) ce qui facilite sa mise en forme.
Les propriétés mécaniques (module actif (E'), contrainte à la rupture (σ), élongation à la limite élastique (ε_b), élongation à la rupture (ε_y)) diminuent avec les masses molaires (Tab.8).

Tableau 8 : Propriétés mécaniques de PCL en fonction de la masse molaire

$\overline{Mw}$	**E'** (MPa)	**σ** (MPa)	**ε_b (%)**	**ε_y (%)**	**Réf.**
44000	400	16	80	7	[52]
200000	549	20,3	576	8	[77]

La PCL est très hydrophobe en raison du nombre important de groupes méthylène qui composent le motif de base. Cette hydrophobie se traduit par une valeur élevée de l'angle de contact avec l'eau qui est autour de 95° et une tension de surface faible, 16 mJ/cm^2 [57,67]. Elle est responsable de la faible sensibilité à l'eau de ce polymère. Les dégradations *in vitro* et *in vivo* d'une PCL ont été étudiées par Pitt *et al*.[68,78,79] au cours du développement du Capronor® (Fig.18). La vitesse de dégradation hydrolytique est très lente et la dégradation n'est complète qu'au bout de 2 à 4 ans qu'elle soit réalisée *in vitro* ou *in vivo*.

Concernant la dégradation *in vitro*, les résultats issus des études de Pitt (Fig.18) permettent de distinguer deux phases de dégradation :

1- dans un premier temps, les chaînes subissent des coupures statistiques au niveau des liaisons esters (a), ces coupures n'entraînent pas de perte de masse pour le matériau (b)

2- la seconde phase commence avec l'apparition d'oligomères ($\overline{Mn} < 5000$) pouvant diffuser. Il y a alors perte de masse.

La dégradation s'accompagne d'une augmentation de la cristallinité du matériau qui s'explique par le fait que l'hydrolyse est plus rapide dans les parties amorphes, ce qui ne laisse que des domaines cristallins et les courtes chaînes formées qui peuvent cristalliser plus facilement (c). On remarque aussi que le module d'Young n'évolue pas avant 40 semaines (d) alors même que les masses molaires sont déjà nettement plus faibles.

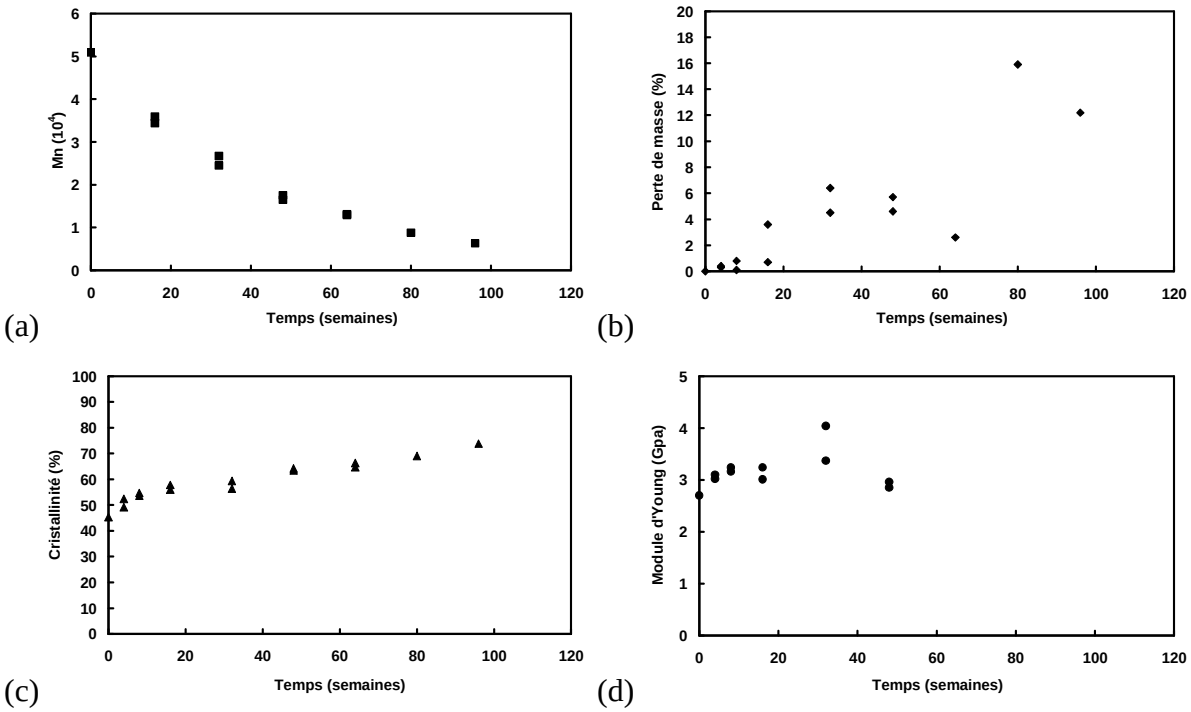


Figure 18 : Evolution des propriétés de PCL au cours de la dégradation in vivo[78]

Tous ces résultats sont corroborés par les études menées par Li *et al*.[80,81] en milieu tampon phosphate isoosmolaire (Tab.9). Ces études ont en outre montré l'absence de dégradation hétérogène pour la PCL.

Tableau 9 : Dégradation de PCL en milieu tampon phosphate

Semaine	**Absorption d'eau** (%)	**Perte de masse** (%)	**Masse molaire** (g/mol)	**Cristallinité** (%)
0	0	0	58700	47
63	<2	3,5	~ 20000	63
133	8	10,7	/	/
200	12,5	14,2	7000	75

La dégradation *in vivo* a été étudiée par de nombreux groupes dans des conditions environnementales abiotiques[82,83], biotiques en présence de micro-organismes, bactéries ou champignons[84,85] ou en présence d'enzymes (protéinase K, lipase Pseudomonas…)[86-89]. Ces études ont montré que la PCL est rapidement dégradée, avec une disparition préférentielle des zones amorphes. Une perte totale de masse est constatée en 28 jours dans les eaux naturelles. La dégradation enzymatique est donc beaucoup plus rapide que l'hydrolyse chimique en tampon phosphate. Goldberg *et al*.[90] ont proposé le mécanisme suivant (Fig.19).

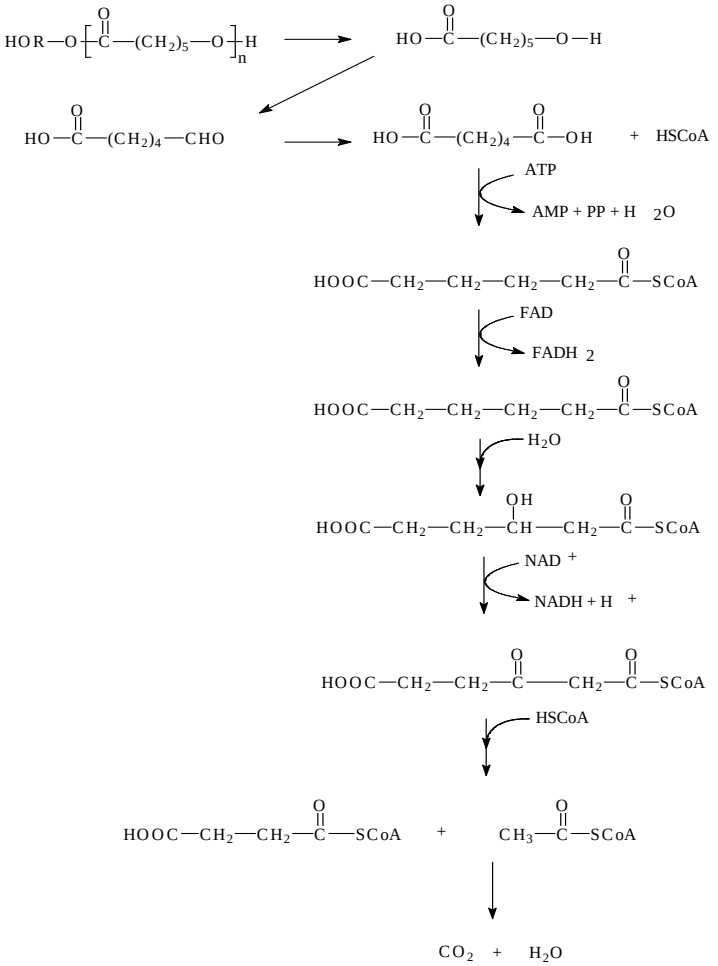


Figure 19 : Mécanisme proposé pour la métabolisation de PCL

La dégradation d'une PCL a également été étudiée par Ponsart après marquage radioactif au tritium du squelette polymère. En accord avec la littérature, aucune perte de masse n'a été observée après 200 jours dans le tampon phosphate à 37°C. Seule une perte initiale de masse de 4% a été observée[91].
Une étude de la biodégradation en boue activée de films de PCL tritiée a montré une dégradation par la surface due à la présence d'exoenzymes. Cette biodégradation conduit à une fragmentation de 80% de la matrice sous forme d'oligomères hydrosolubles après seulement 40 jours. Elle atteint un plateau à 85% après 72 jours se traduisant par une disparition totale des films accompagnée d'une prolifération bactérienne[57].

Il faut noter que la dégradation des PCL peut-être grandement améliorée par augmentation de son hydrophilie et/ou diminution de sa cristallinité. Ceci a été montré dans le cas de copolymères PCL/PLA[52,67] et de PCL carboxylée[92].

c) Conclusion

Il existe comme on l'a vu un grand nombre de polymères dégradables proposés pour répondre aux besoins spécifiques des applications dans les domaines environnementaux et biomédicaux. Parmi eux, les polyesters aliphatiques restent les polymères synthétiques de choix dans la majeure partie des cas. Ils ne peuvent cependant pas répondre à toutes les attentes étant donné que la diversité de leurs structures est limitée. En particulier, la PCL, qui présente des avantages certains du point de vue de ses propriétés mécaniques et biologiques, est restreinte dans ses applications du fait de sa très grande hydrophobie et d'une cristallinité importante qui rende sa dégradation hydrolytique très lente. L'une des méthodes permettant de modifier les propriétés des polymères, et en particulier de PCL, est, comme on l'a vu dans le cas des amphiphiles non dégradables, de les copolymériser.

2) Copolymères amphiphiles partiellement et totalement dégradables :

Le terme « partiellement dégradable » décrira dans ce qui suit les structures amphiphiles dont l'un des composants est dégradable. Etant donné la nature des polymères dégradables décrits ci-dessus, nous aurons principalement affaire à des segments hydrophobes dégradables et des segments hydrophiles non dégradables. Parmi ces copolymères, nous nous intéresserons tout d'abord aux structures ne contenant pas de segments polyester puis nous décrirons ces dernières et en particulier celles à base de PCL. Chaque famille sera subdivisée entre copolymères amphiphiles à blocs et greffés.

a) Non polyesters

i. Copolymères à blocs :

On trouve des dérivés d'acides aminés hydrophobes associés au PEO dans des copolymères à base de poly(β-benzyl-aspartate)[93], de poly(glutamate de benzyl)[94], des poly(leucines)… L'avantage des poly(L-acides aminés) est qu'ils sont dégradables enzymatiquement et/ou biodégradables.

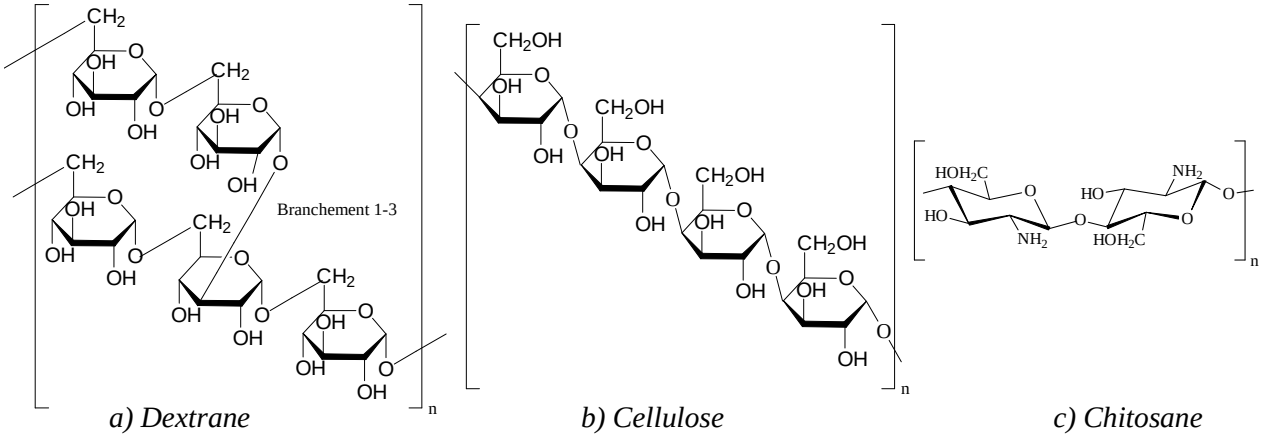
Des poly(acides α–aminés) hydrophiles ont aussi été décrits. L'acide aspartique a été combiné avec le poly-butadiène par Kros[95] pour former des diblocs. Deming *et al*. eux ont synthétisé des copolymères diblocs PMMA-*b*-Poly(benzyl-L-glutamate) à longueurs de chaînes contrôlées par polymérisation ATRP de MMA suivie d'une polymérisation vivante du NCA de glutamate de benzyle (Bzl-Glu)[96]. Ils ont également préparé des diblocs totalement dégradables poly(L-leucine)-*b*-poly(acide L-glutamique)[97] formant des hydrogels et ayant un potentiel en ingénierie tissulaire.
La plupart de ces équipes a également travaillé avec les poly(L-Lysine)s (PLL) afin d'obtenir les pendants cationiques des polymères décrits ci-dessus. C'est le cas de Pakstis *et al*.[98] qui ont obtenu des hydrogels anioniques ou cationiques dégradables à partir de diblocs de lysine ou acide glutamique pour la partie hydrophile et de valine ou leucine pour la partie hydrophobe. La PLL est largement utilisée, en particulier, pour la recherche transfection de gènes car elle « condense » l'ADN. C'est dans ce but que Malavosklish et Ahn ont synthétisé des multiblocs $[PLL\text{-}b\text{-}PEG]_n$ à partir de chaînes courtes de chacun des homopolymères[99] ou par ouverture du cycle NCA de N-Z-Lys[100]. On remarque que dans ce cas on n'est plus vraiment en présence d'un amphiphile classique puisque les deux monomères sont hydrophiles.

Chulhee *et al.*[101] ont synthétisé des copolymères à blocs composés de poly(2-éthyl-2-oxazoline) (PEtOz) pour la partie hydrophile et de poly(1,3-triméthylène carbonate) (PTMC) pour la partie hydrophobe. Ces composés forment des micelles de 200 nm de diamètre dans l'eau. Des objets plus petits (120 nm) ont été obtenus par Youngkyu *et al.*[102]. Ces auteurs ont utilisé des dérivés de type phosphazène avec un bloc hydrophile portant deux groupements méthoxyéthoéthoxy (MEE) et un bloc hydrophobe portant un MEE et un phényl. Des dérivés phosphazènes contenant le même segment hydrophile et un segment hydrophobe polystyrène PS-*b*-P(MEEP) ont été synthétisés par Allcock *et al.*[103] avec des compositions en PS et P(MEEP) allant de 1 :0,37 à 1 :0,86. Ces copolymères forment des micelles d'un diamètre d'environ 170 nm.

ii. Copolymères greffés :

On trouve principalement deux classes de chaînes principales utilisées pour la formation de copolymère greffés : les dérivés naturels de type dextrane, cellulose et chitosane dont les structures

sont représentées dans la Figure 20 et les polymères de synthèse dégradables. Les squelettes polysaccharide sont largement utilisés du fait de leur caractère renouvelable. Ils possèdent en outre un caractère dégradable, voire biodégradable, qui les rend particulièrement attractif, en particulier dans le domaine des formulations galéniques en raison de leur non-toxicité, de leur grande viscosité en solution et de leur caractère amphiphile intrinsèque. Ce dernier peut être exacerbé par modification chimique.



a) Dextrane *b) Cellulose* *c) Chitosane*

Figure 20 : Squelettes naturels polysaccharides

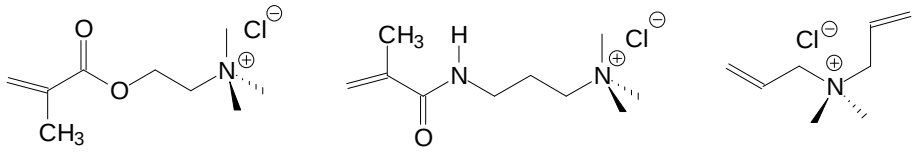
α) Squelettes naturels

Toutes les structures greffées dont les squelettes sont des polymères naturels sont obtenues à partir d'une même stratégie. Les groupes réactifs hydroxyle et/ou amine du squelette sont activés ou partiellement protégés en fonction du type de réaction, puis utilisés pour des greffage de type « onto » ou « from ».

La cellulose est le principal dérivé naturel utilisé pour former des dérivés amphiphiles avec en particulier des acrylates, des acrylamides[104-108] et des 2-oxazolines. Bien que ces composés aient déjà fait l'objet de nombreuses études et de nombreux dépôts de brevets depuis les années 50 (Corn Product International, Casco…), la tendance actuelle, qui vise à l'utilisation de matériaux issus de ressources renouvelables, et l'évolution des techniques de polymérisation, font que les recherches dans ce domaine restent intenses. Les chercheurs visent à obtenir un contrôle plus poussé des structures, ou à faciliter le greffage en masse (techniques d'extrusion réactive). On ne décrira pas en détail toutes les structures obtenues mais on peut noter l'existence de copolymères de cellulose et méthacrylate de glycidyle (GMA), DMAEM, acide acrylique[105,106] ou MeOz[109,110].

L'amidon est également utilisé et combiné avec des segments méthacryliques de type TMAEMA, MAPTAC et DADMAC (Fig.21)[111-113], des segments polyacrylamides greffés par irradiation γ[114] ou

des polyamines commerciales[115] greffées après introduction de fonctions amine sur l'amidon et réduction de poly(acrylamide) en poly(isopropyl amine).



TMAEMA, *MAPTAC* *DADMAC*

Figure 21 : Monomères cationiques méthacryliques et vinyliques greffés sur amidon

Le chitosane, qui est porteur de fonctions amine et provient de la N-déacétylation de la chitine, est aussi présenté comme matériel intéressant du fait de son caractère renouvelable, de sa dégradabilité et de son hydrosolubilité. On le trouve associé à des chaînes hydrophobes de PS[116], poly(N-acétyléthylèneimine)[117] ou PMMA. [118]. Dans ce dernier cas, il se forme spontanément des nanosphères d'un diamètre de 60-160nm en milieu aqueux.

Enfin, on peut citer les structures dérivées de lignine hydrophilisée par greffage de chaînes polyacrylate et polyacrylamide. De telles structures sont citées par Meister *et al.*[119] qui ont synthétisé des terpolymères greffés de type lignine-*g*-P(TMAEM-*co*-AM) et lignine-*g*-P(DADMAC-*co*-AM).

β) Squelettes de synthèse

Iwasaki *et al.*[120] rapportent la synthèse de polyphosphates hydrophobes greffés par des chaînons amphotères de poly(2-méthacryloyloxyéthyl phosphorylcholine) P(MPC). La première étape consiste en la synthèse de polyphosphates dont quelques unités sont fonctionnalisées par un atome de brome (Mw = 3-4.10^4 g/mol). Cette étape est suivie par la polymérisation par ATRP de MPC. Les copolymères obtenus ont des masses molaires de l'ordre de Mw = 8-25.10^4 g/mol et des CMC allant de 10^{-1} à 10^{-3} g/dm^3. Des micelles apparaissent en fonction de la longueur des segments hydrophiles/hydrophobes et de la balance amphiphile. Lorsque la densité de greffage est importante, seul l'unimère de type peigne est observé alors qu'une densité de greffage plus faible conduit à l'obtention de micelles d'un diamètre hydrodynamique de 32 nm.

Des polyphosphazènes ont été utilisés par Chang *et al.*[121] pour la synthése de poly(4-méthylphénoxyphosphazène)-*g*-poly(2-méthyl-2-oxazoline) capables de former des micelles en milieu aqueux. Après synthèse d'oligomères de poly(dichlorophosphazène), l'introduction de groupes latéraux *p*-bromométhyl-phénoxy (5% et 20%) permet l'amorçage du cycle MeOz et l'obtention de 1,5 et 6 chaînes latérales par chaîne polyphosphazène respectivement (Mn = 6000 et 14000). On peut également évoquer les structures réalisées par Couffin-Hoarau *et al.*[122] qui sont constituées d'un polyphosphazène porteur de chaînes latérales PEO et dont certains motifs sont porteurs de fonctions amphotères carboxylate d'aminoalkyle.

b) Polyesters non PCL

i. Copolymères à blocs :

Dès 1979, Gilding[123] a proposé l'utilisation d'un copolymère de PEO et de poly(éthylène téréphtalate) en tant que matériel biomédical. Ce premier composé a ouvert la voie à toute une famille de copolymères utilisables dans les domaines biomédicaux avec en particulier ceux à base de PLA, PGA, PCL et de PEO, que de nombreux auteurs, dont Pechar *et al.*[124] en 1995, ont proposé pour le transport de principes actifs.

Les PLA sont les plus cités comme le montre le Tableau 10, mais on trouve quelques exemples à base d'autres polyesters comme le poly(1,3-propylène succinate)[125] ou des dérivés de type poly(acide β-malique)[126].

Parmi les copolymères à blocs à base de PLA, les PLA-PEG sont de loin les plus nombreux. Au sein de notre laboratoire des triblocs de type PLA-PEO-PLA à longues chaînes PLA ont été synthétisés par Li *et al.*[127] par polymérisation par ouverture de cycle de L-lactide amorcée par un α–ω–hydroxy(PEO) en présence d'un catalyseur au zinc ou CaH_2. La tendance de ces copolymères à former des hydrogels ou des micelles dégradables suscite un grand intérêt et explique que l'on trouve un grand nombre de ces structures dans la littérature[128-131].

Tableau 10 : Copolymères amhiphiles à blocs à segments polyesters

Segment Polyester	Segment hydrophile	Type de structure	Applications	Références
PLA	PEG	dibloc tribloc multibloc	Gels pour libération contrôlée	Choi[128] Jeong[130,131] Lee[130] Huh[129]
	poly(éthyl oxazoline)	dibloc tribloc	Micelles thermosensibles	Hui[132], Sang Cheon[133]
	polysérine	dibloc	/	Tasaka[134]
	poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)	dibloc	Micelles (40 nm)	Leroux[135,136]
	poly(N-isopropylacrylamide)	dibloc	Microsphères thermosensibles	Liu[125,137]
	poly(acide aspartique) poly[Glc-Asp] (depsipeptide)	dibloc	micelles (50-100 nm), surfactants biodégradables	Ouchi [138-140]
	poly(acide glutamique)	dibloc	encapsulation	Caillol[141]
	PEI	dibloc	transfection	Nam[142], Wang *et al.*[143]
poly(1,3-propylène succinate)	PEG	tribloc	/	Liu[125]
poly(β-malate d'alkyl)	poly(acide β-malique)	dibloc	/	Cammas[126]

Les chaînes de PLA ont également été associées à d'autres motifs non ionisables comme des poly(éthyl oxazoline) [132], des polysérine[134], des poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)[135,136] ou des poly(N-isopropylacrylamide)[125,137] (Tab.10).

En ce qui concerne la synthèse de blocs ioniques, des acides aminés sont utilisés. Gotsche *et al.*[144] ont été les premiers à rapporter la synthèse de diblocs de type PLA-*b*-poly(α-amino acide) obtenus par polymérisation par ouverture de cycle de NCA d'acide aminé amorcée par des segments PLA fonctionnalisés amine en extrémité de chaîne. Les blocs poly(acide α-aminé) peuvent être soit anioniques comme c'est le cas pour les acides aminés porteurs de fonctions carboxyliques[138,139,141], soit cationiques si la fonctionnalité est de type amine.
Enfin on peut citer des copolymères à blocs partiellement dégradables à segments PEI[142,143141], linéaire ou non, généralement obtenus par couplage entre la polyamine et le PLA monocarboxylé en bout de chaîne. L'utilisation de ces copolymères est principalement orientée vers des applications de transfection (Fig.22)

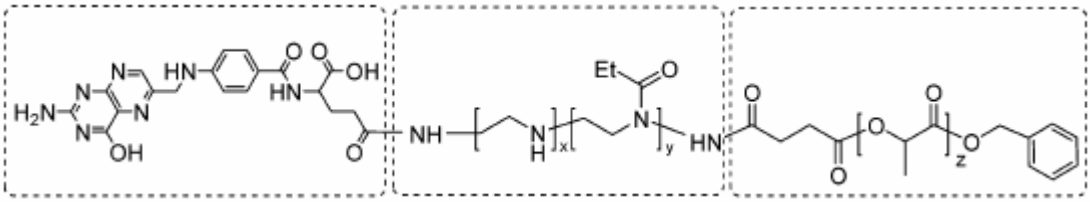


Figure 22 : Folate-PEI-b-P(L-LA)

ii. <u>Copolymères greffés :</u>

En ce qui concerne la nature des chaînes principales, la même distinction que pour les copolymères amphiphiles à blocs non polyester peut être faite avec d'un côté les squelettes naturels, et de l'autre ceux de synthèse. Il faut noter que les exemples qui suivent sont d'un intérêt tout particulier pour nous étant donné que notre travail conduit à l'obtention de copolymères greffés à base polyester.

α) Squelettes naturels

Un squelette polysaccharide fréquemment rencontré est le dextrane. Il est principalement utilisé avec la PCL (paragraphe 2-c-ii-α) et le PLA dans des structures de type squelette hydrophile/chaînes hydrophobes. Ces copolymères sont utilisés comme compatibilisants dans des formulations polysaccharides/polyesters, comme promoteurs de nanoémulsions ou encore comme vecteurs de principes actifs. Plusieurs équipes[145-147] ont polymérisé le D,L-lactide à partir de dextrane dont les fonctions hydroxyle ont été partiellement protégées par des groupes triméthylsilyle. Les groupes hydroxyle résiduels peuvent alors être utilisés pour amorcer la polymérisation.

D'autres amphiphiles totalement dégradables ont été synthétisés par Wu *et al*.[148] à partir de D,L-lactide dont la polymérisation a été amorcée par les fonctions alcool et amine primaire du chitosane en présence de triéthylamine (Fig.23). Le rapport molaire (unités D,L-lactique / unités saccharidiques) dans les copolymères ainsi obtenus varie entre 2 et 7 en fonction des conditions initiales. Malgré cette forte teneur en éléments hydrophobes, ces amphiphiles forment des micelles dont le diamètre varie de 150 à 180 nm selon la teneur en PLA.

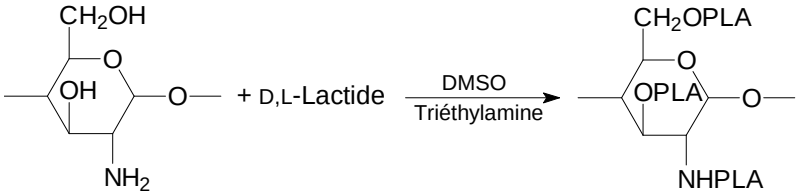


Figure 23 : Chitosane-g-PLA

β) Squelettes polymères de synthèse

Concernant l'utilisation de polyesters en tant que squelette on trouve un exemple à base de films de poly(éthylène téréphtalate) greffés par des chaînes DMAEM[149]. Il s'agit d'un cas limite puisque ce polyester n'est pratiquement pas dégradable et que la modification est une modification de surface. Plus en adéquation avec notre recherche, Weberskirch *et al*.[150] ont synthétisé un polyester hyperbranché par polycondensation d'acide 4,4-bis(4-hydroxyphenyl)-valérique. Les fonctions hydroxyle des oligomères obtenus ($\overline{Mn}$ = 3900g/mol) sont fonctionnalisés pour amorcer la polymérisation cationique de MeOz. Ces copolymères amphiphiles sont hyperbranchés (12 bras hydrophiles) avec des chaînons PMeOz de $\overline{DPn}$ 45-50 et forment des agrégats d'environ 400-600 nm dans l'eau (Fig.24).

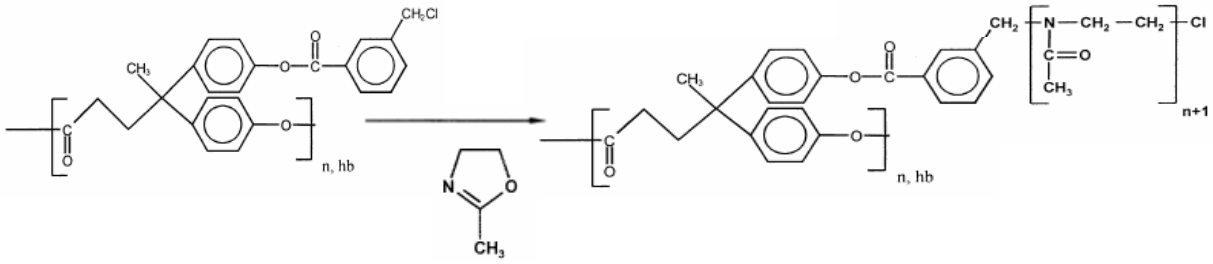


Figure 24 : Copolymère branché poly(4,4-bis(4-(PEtOz)-phenyl) valérolactone)

Des structures contenant du PLAGA ont été synthétisées par plusieurs équipes. Celle de Oster *et al*.[151] a amorcé la polymérisation du D,L-lactide et du glycolide (1 :1) à partir des fonctions hydroxyle d'un squelette de PVA sur lequel des amines avaient été préalablement couplées. Ces polymères, qui combinent des fonctions amine et des oligomères PLAGA, sont amphiphiles mais non hydrosolubles et sont destinés à la complexation d'ADN dans des applications de transfection. C'est également le cas de la structure composée d'un squelette de poly(L-Lysine) décrite par Jeong *et al*.[152,153] . La technique de « grafting onto » a été utilisée. Des chaînons PLAGA ont été greffés sur un squelette PLL activé

par la N-hydroxysuccinimide en présence de DCC. Ce copolymère PLL-*g*-PLAGA forme dans l'eau des micelles d'un diamètre moyen de 150 nm avec une distribution de taille étroite et une CMC à 10 mg/L.

Des copolymères à base de PLA en tant que squelette hydrophobe ont fait l'objet de modification par greffages. Barrera[154,155], Hrkach[156] et Caponetti[157] ont réalisé des dérivés amphiphiles de PLA et acides aminés. Le premier a synthétisé un copolymère statistique poly(acide lactique-*co*-lysine) (PLAL) contenant environ 2% de lysine dont les fonctions amine latérales sont au départ protégées. Par traitement acide, les amines primaires sont récupérées et utilisées pour amorcer l'ouverture de cycles NCA. Les dérivés non ionique PLA-*g*-PAla, anionique PLA-*g*-PAsp et cationique PLA-*g*-PLL synthétisés ont permis de préparer des microsphères. Dans le même esprit, Choi *et al.*[158] ont déposé un brevet couvrant la synthèse de dérivés amphiphiles à blocs ou greffés à base de polyesters (PLA, PCL, PGA) d'une part, et poly(acides aminés) (PLL surtout) ou polysaccharides d'autre part. Ces composés trouvent des applications en tant que vecteurs de gènes.

c) Polyesters PCL

La copolymérisation de PCL permet, comme on l'a évoqué, de modifier les propriétés de l'homopolymère et en particulier son hydrophobie en partie responsable de sa trop lente vitesse de dégradation par hydrolyse. On trouve pour cette raison de nombreux exemples de copolymères à blocs contenant de la PCL. Ces derniers seront décrits, mais on s'intéressera surtout aux architectures greffées beaucoup moins courantes mais directement comparables aux copolymères synthétisés dans le cadre de ce travail de thèse.

i. Copolymères à blocs :

Comme pour PLA, PCL est principalement associée à des PEG. Cette association doit permettre, outre une solubilisation en milieu aqueux, d'améliorer la vitesse de dégradation de ce polymère qui est un frein à son utilisation. C'est ainsi qu'un copolymère dibloc MeOPEG-b-PCL a été préparé dès 1989 par Cerrai *et al.*[159] par ouverture de cycle d'ε-caprolactone par un α-hydroxy-ω-méthoxyPEG sans catalyseur. Ce type de synthèse est le plus fréquemment rencontré. Les différences résident généralement dans l'usage d'un catalyseur et sa nature.

Outre les blocs PEG non ioniques, on trouve des blocs polyoxazolines, polyméthacryliques, polyvinyliques et poly(α-amino acide) qui permettent d'obtenir des copolymères ioniques, ionisables voire neutre plus ou moins dégradables (Tab.11). Ces segments de différentes natures sont associés dans tous les types d'architectures classiques (diblocs, triblocs…) avec des compositions variables en

motifs hydrophiles et hydrophobes assurant un caractère amphiphile leur permettant pour la plupart de former des micelles en solution aqueuse dont les diamètres moyens sont compris entre 10 et 200 nm.

Tableau 11 : Copolymères amphiphiles à blocs à segments hydrophobes PCL

	Bloc hydrophile	Structure	Applications	Références
Polyéther	(MeO)PEG-OH	dibloc	libération de principes actifs micelles (10-150nm)*	160-169
	HO-PEG-OH	tribloc	délivrance de principes actifs culture cellulaire surfactant	170-173 174 175,176
	α–ω–dicarboxyPEG	multibloc**	/	177-179
	PEG	étoiles	« cœur » PEG ou PCL	180,181
	PEG	dendrimères	Micelles stables***	Wang[182]
	Pluronic™	dibloc	micelles (120 à 200nm) et des gels thermo-dépendants.	Chul[183]
Oxazoline	PEtOz	dibloc	micelles (20 et 200 nm)	Sang Cheon [133] Chulchee[184]
		multibloc $A(BA)_nB$	hydrogels thermosensibles	Lee[185]
Acryliques	poly(hydroxyéthylméthacrylate) P(HEMA)	réseau	hydrogels bioérodibles	Barakat[186]
	poly(N-hydroxypropyl méthacrylamide)	étoile cœur PCL	micelles unimodales de 100–150 nm	Lele[187]
	poly(méthacrylate de D-gluconamidoéthyle) P(GAMA)	triblocs (ATRP PCL-Br ou Br-PCL-Br)	/	Ravin[188] Chen[189]
	poly(acide acrylique)	dibloc		Zhang[190]
Vinyliques	poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)	dibloc PVP-OH	30-80 nm	Chung[191]
		tribloc bloc central PCL	/	Lele[192]
	poly(alcool vinylique)	dibloc	/	Jin[193]
Autres	poly[4-(2-hydroxyéthyl)caprolactone]	étoile cœur PCL****	/	Sung[194]
	poly(acide α-aminés) : glycine, alanine, phénylalanine et γ-benzyl-L-glutamate	tribloc bloc central PCL	/	Kricheldorf[195]
	poly(carbonate de 2-méthyl-2-benzyloxycarbonyl-propylène) déprotégé	dibloc	/	Guan[196]

* La taille des micelles formées par les structures diblocs est en partie fonction de la balance hydrophile/hydrophobe du copolymère. Pour exemple, des copolymères diblocs PCL-*b*-PEG forment des objets de 54 à 130nm pour des compositions massiques (PEG :PCL) 70 :30 à 40 :60 respectivement[159].

**Les multiblocs de type $A(BA)_nB$ sont issus de la polycondensation de téléchéliques.

*** ce type de structure dendrimère à noyau poly(amido amine) (PAMAM), coeur PCL et couronne PEG permet d'obtenir une structure amphiphile possédant un cœur hydrophobe stable fixé de manière covalente au noyau PAMAM. Cette stabilité est recherchée puisqu'elle permet d'éviter les phénomènes de dissociation intempestive des objets formés lorsque la concentration en polymère est inférieure à la CMC. Ces micelles peuvent en outre former des agrégats de plus grande taille schématiquement représentés sur la Figure 25.

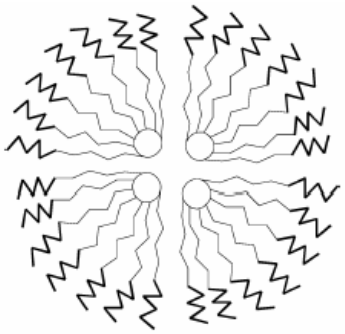


Figure 25 : Micelle formée par association de dendrimères PAMAM-b-(PCL-b-PEG)

**** (Fig.26) Cette structure amphiphile totalement dégradable ne fait intervenir que des motifs PCL dont 50% sont hydrophilisés. Ce copolymère est issu de la synthèse d'un nouveau monomère et se rapproche donc du travail de Jérôme décrit dans la dernière partie de cette étude bibliographique. Cet exemple est intéressant puisqu'il se rapproche de certaines structures obtenues par modification chimique de la PCL (Chap.II).

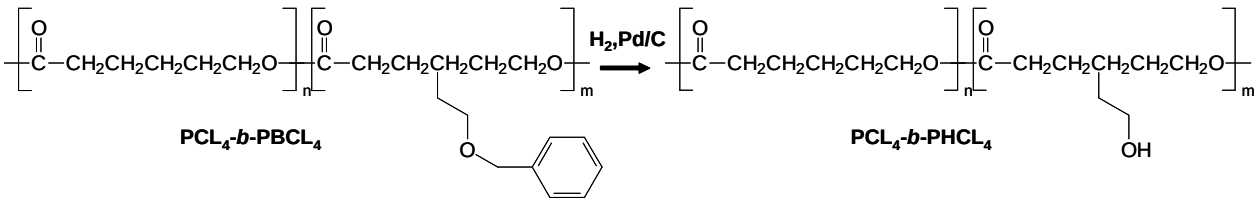


Figure 26 : PCL-b-poly[γ-(2-hydroxyéthyl)caprolactone]

<u>Remarque</u> : généralement les PCL commerciales utilisées ont des masses molaires peu importantes très souvent aux alentours de 2000 et toujours < 10000 g/mol.

Le paragraphe ci-dessus illustre la grande diversité de structures amphiphiles à blocs PCL. Il faut toutefois remarquer que la plupart sont non ioniques et que si elles le sont, seuls des segments anioniques sont décrits. La synthèse de copolymères à blocs cationiques et/ou amphotère à base de PCL n'a, à notre connaissance, jamais été rapportée.

ii. Copolymères greffés :

Dans ce paragraphe, nous décrirons les structures greffées à base de PCL. Comme on le verra, ces structures utilisent dans leur grande majorité une PCL comme chaîne latérale hydrophobe.

α) Squelette naturel

On retrouve ici l'exploitation des fonctions amine ou alcool des polysaccharides pour amorcer la polymérisation par ouverture de cycle de l'ε-caprolactone.

Des amphiphiles hydroxypropyl-cellulose-*g*-PCL (HPC-*g*-PCL) hydrosolubles et faiblement cristallins ont été préparés en vue du transport de principes actifs hydrophobes. Ces copolymères sont généralement obtenus par polymérisation par ouverture de cycle d'ε-caprolactone (ε-CL) amorcée par les fonctions hydroxyle d'une HPC. Shi *et al.*[197] ont effectué la polymérisation en masse et sans catalyseur afin d'avoir des chaînons courts ($\overline{DPn}$ 7) et nombreux (12 toutes les 10 unités glucosidiques). Un autre exemple est rapporté par Wang *et al.*[198] qui ont synthétisé un copolymère semblable au précédent en cherchant à avoir un meilleur contrôle de la réaction. Pour ce faire, ils ont protégé une partie des groupes hydroxyle d'une HPC afin de solubiliser la macromolécule dans le xylène et utilisé l'octanoate d'étain qui permet un contrôle relatif de la longueur des chaînons par ajustement de la concentration en monomère. Ces deux exemples sont fondés sur la technique de « grafting from ».

Le dextrane a aussi été exploité comme squelette selon la stratégie décrite pour les dextrane-*g*-PLA [199,200]. Des structures relativement contrôlées ont été synthétisées par Gref *et al.*[201-203] par la technique de « grafting onto ». Une PCL mono acide carboxylique (R-PCL-CO_2H), obtenue par ouverture d'ε-CL amorcée par l'acide carboxylique RCO_2H, est alors activée puis couplée au squelette dextrane. Dans tous les cas les groupements protecteurs présents sur le dextrane-*g*-PCL sont éliminés pour régénérer les fonctions hydroxyle.

Le chitosane a quant à lui été utilisé par Li *et al.*[204]. Les auteurs ont préparé un chitosane-*g*-PCL par réaction entre une PCL portant une fonction isocyanate en extrémité de chaîne ($\overline{Mn}$ = 1250 et 2000 g/mol) et les groupes hydroxyle d'un chitosane modifiés par réaction avec le phtalimide. Après déprotection des amines, les auteurs ont obtenu des copolymères à caractère amphotère avec différentes teneurs en PCL (fraction molaire de 12 à 64%). Une structure similaire à base de chitine N-déacétylée à 50% contenant jusqu'à 40% de PCL (wt%) a été réalisée en milieu aqueux par Detchprom *et al.*[205] (Fig.27)

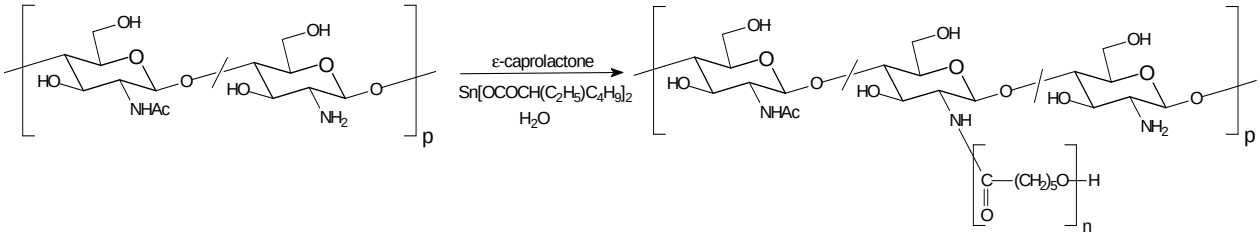


Figure 27 : Chitosane-g-PCL

β) Squelettes polymères de synthèse

Bien que cette partie bibliographique soit axée sur les structures cationiques, il faut souligner qu'il existe des copolymères dont la chaîne principale est non ionique ou anionique. Pour exemples, on peut citer le travail de Cretu *et al.*[206] qui ont préparé des copolymères type P(HEMA)-*g*-PCL et celui de Coulembier *et al.*[207] qui ont synthétisé un copolymère totalement dégradable à base de polyesters poly(acide (R,S)-β-malique)-*g*-PCL par les voies « onto » et « from ».

Tout récemment Mespouille *et al.*[208] ont décrit la synthèse d'un amphiphile cationique partiellement dégradable à base de PCL. Ce copolymère est de la forme PDMAEM-*g*-PCL et a été obtenu en trois étapes. PCL est d'abord synthétisé par ROP d'ε-CL amorcée par ($Al(O^iPr)_3$), puis les extrémités de chaînes sont quantitativement estérifiées par un dérivé d'acide méthacrylique avant d'être copolymérisé avec le DMAEM par ATRP. La quaternisation par réaction des fonctions amine tertiaire de la chaîne principale avec l'iodure de méthyle conduit finalement au dérivé cationique. Les copolymères obtenus avaient une masse molaire de 20-25000 g/mol et présentaient un indice de polymolécularité de 1,25 environ. Cette valeur est faible pour une structure greffée mais peut être expliquée d'une part par la technique de polymérisation utilisée et surtout par la faible teneur en PCL du copolymère (fractions massiques de 6 à 20%). Au-delà de 6wt%, la structure greffée obtenue n'est pas hydrosoluble sans quaternisation même après mise en solution dans un tampon acide (pH 4,8). Dans ce tampon des objets ayant des diamètres de l'ordre de 240-340nm ont été obtenus pour le copolymère contenant 6 wt% de PCL.

PEI a été proposé comme squelette. Une PEI branchée, porteuse d'un agent de ciblage hystidine, a été utilisée comme squelette hydrophile par Xintao *et al.*[209]. Ces auteurs ont greffé des diblocs MePEG-*b*-PCL par réaction entre les fonctions amine de la chaîne principale de PEI et un groupe N-succinimide introduit sur le dibloc. Un copolymère Hys-PEI-*g*-PEG avait déjà été synthétisé par cette équipe. L'introduction de PCL est justifié par les auteurs comme permettant l'introduction d'une certaine dégradabilité du terpolymère présentée comme favorable dans une utilisation *in vivo* en tant que vecteur d'ADN. Les effets des longueurs de chaînes ont été testées pour chaque segment avec des compositions molaires PEI/PCL/PEG variant de 8/40/52 à 61/4/35. Ces copolymères, en fonction de

leur composition, forment des micelles, des agrégats ou existent sous forme de macromolécules solvatées isolées. Comme dernier exemple de structure greffée à squelette hydrophile, citons le travail de Jeong *et al.*[210] qui ont récemment réalisé la synthèse d'un dérivé Poly(Asparagine)-*g*-PCL (PAsp-*g*-PCL) par réaction d'une PCL aminée en extrémité de chaîne ($\overline{Mn}$ 1250g/mol) et d'un poly(succinimide) (PSI) ($\overline{Mw}$ 51000g/mol) synthétisé à partir d'acide aspartique. L'aminolyse du copolymère PSI-*g*-PCL par NH_4OH conduit au dérivé PAsp-*g*-PCL (Fig.28) contenant entre 13 et 45 wt% de PCL et formant des agrégats macromoléculaires de 30 nm pour la première population et 150 nm pour la seconde.

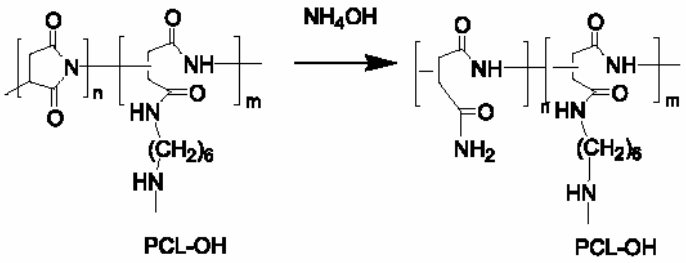


Figure 28 : PSI-g-PCL et PAsp-g-PCL

Les exemples qu'on vient de voir utilisent la PCL comme chaînes latérales. Bien qu'il en existe peu, on trouve cependant quelques exemples d'amphiphiles greffés dégradables à squelette PCL hydrophobe dans la littérature.

Xu *et al.*[211] se sont intéressés à la production de micelles polymère furtives et stables. Cette stabilité est obtenue par réticulation partielle du cœur hydrophobe de PCL et de la couronne hydrophile composée de PEG et PDMAEM. Les structures greffées amphiphiles ont été synthétisées par copolymérisation de macromonomères de PCL et PDMAEM ou PCL et PEG. On n'a donc pas de squelette PCL mais une structure hyperbranchée dite en peigne où chaque motif de la chaîne principale est greffé par une chaîne polymère. Les CMC de ces structures greffées sont très inférieures à celles des copolymères blocs équivalents avec 1 et 40 g/L respectivement.

Un autre exemple est donné par Parrish *et al.*[212]. Ces auteurs ont exploité la technique décrite par Barrera pour les PLA-co-PLL en copolymérisant l'ε-CL et l'α-propargyl-δ-valérolactone.Des fonctions réactives acétylène sont ainsi introduites sur un squelette majoritairement composé de motifs PCL. Une fois le copolymère obtenu, des réactions de modification du squelette par greffages sur le groupe acétylène ont conduit à des structures greffées PCL-*g*-PEG hydrosolubles et PCL-*g*-polypeptides. Cette technique est fondée sur les méthodes de la « click chemistry » actuellement en développement.

Les autres amphiphiles greffés à squelette PCL ne sont pas cationiques. Liu *et al.*[213] ont synthétisé un dérivé anionique par copolymérisation d'un macromonomère de PCL avec du MMA et de l'acide acrylique. Des copolymères de PCL et PEG ont été décrits par Rieger *et al.*[164] et Ponsart *et al.*[214]. Les premiers ont fonctionnalisé un PEG par un groupe ε-caprolactone terminal, puis copolymérisé par ouverture de cycle ce macromonomère avec de l'ε-CL. Les seconds ont suivi une stratégie de modification par voie anionique de PCL mise au point au laboratoire pour synthétiser un copolymère PCL-*g*-PEG. Ce greffage de type « onto » a conduit à un amphiphile non ionique greffé à squelette PCL. Le taux de greffage faible (1,5%) permet cependant l'obtention de micelles d'environ 150nm de diamètre.

III. Conclusion

Ce premier chapitre bibliographique nous a permis de décrire les différents types de copolymères amphiphiles existants et en particulier ceux contenant des segments dégradables. On a pu constater que dans la plupart des cas, il s'agit de copolymères à blocs et que les architectures greffées sont assez peu nombreuses. Cette remarque est d'autant plus vraie dans le cas où c'est la PCL qui est utilisée puisque l'on ne dénombre qu'un nombre très limité de copolymères amphiphiles greffés utilisant ce polyester. Le dernier paragraphe a permis de conclure quant à l'absence quasi-totale de structures à chaîne principale PCL et chaînon latéraux hydrophiles dans la littérature.

Il faut cependant noter que la copolymérisation permet de modifier les propriétés de base de la PCL puisqu'il est par exemple possible d'hydrosolubiliser ce polymère pourtant très hydrophobe en lui adjoignant des comonomères hydrosolubilisants. Ainsi, le greffage constitue une des voies permettant de modifier les caractéristiques physico-chimiques d'une PCL. Dans le but de sélectionner la ou les stratégies à suivre, il nous a paru important de passer en revue les différentes méthodes de modifications de la PCL existantes.

B- Méthodes de modification chimique de PCL

La modulation des propriétés des polymères peut être réalisée par modifications physiques et /ou chimiques de leurs structures.

La plus simple est la méthode physique par mélange de polymères. Elle est cependant peu satisfaisante du point de vue du contrôle des propriétés et de la qualité du matériau obtenu étant donné le caractère

incompatible de la plupart des mélanges de polymères sauf dans le cas de polyesters où les réactions de transestérification peuvent créer des copolymères statistiques

.

Les voies chimiques, décrites par Ferruti[215] dès 1973, représentent des alternatives bien plus intéressantes. La première consiste en la copolymérisation de deux monomères dont l'un au moins possède la propriété ou la fonctionnalité souhaitée et dont les propriétés de base façonnent celles du nouveau matériau. Ce type de modification a été illustrée au paragraphe A dans le cas des copolymères amphiphiles. La seconde réside dans la synthèse puis la polymérisation de nouveaux monomères. Cette méthode, qui semble simple, n'est pourtant pas toujours envisageable. En effet, la synthèse même des monomères fonctionnalisés n'est pas toujours possible et nécessite beaucoup de temps. En outre, les fonctions à intégrer peuvent interférer avec les mécanismes de polymérisation, ce qui nécessite donc de passer par des étapes de protection-déprotection souvent fastidieuses et pas toujours respectueuses des squelettes polymères (Fig.29). Il est alors envisageable de passer par des méthodes agissant sur le squelette d'un polymère préexistant.

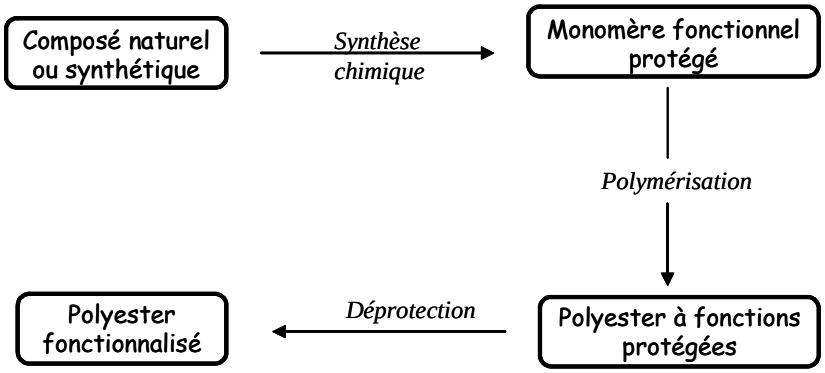


Figure 29 : Méthode générale d'obtention de nouveaux polyesters fonctionnalisés et/ou protégés par polymérisation de monomères

On s'appliquera par la suite à illustrer ces différentes voies dans le cas de structures faisant intervenir PCL. On s'intéressera en particulier à la méthode décrite par Ponsart et Coudane[216] qui consiste en une modification par voie anionique applicable à des PCL commerciales.

I. Modification en extrémité de chaîne et copolymérisation

L'introduction d'une fonction terminale sur la PCL n'est généralement pas suffisante pour modifier ses propriétés physico-chimiques et mécaniques. Cette méthode est cependant largement décrite car elle constitue une première étape vers la réalisation des architectures macromoléculaires plus complexes (copolymères à blocs, greffés, en étoiles…) qui ont fait l'objet d'une description détaillée dans le paragraphe précédent.

Concernant la nature des fonctions introduites, on trouve tous les groupes réactifs intervenant dans les différents type de polymérisation : insaturations sous forme de groupement méthacryloyles[186,217], halogènes tels que l'iode et le brome utilisés pour le transfert en polymérisations radicalaires contrôlées[189], groupes photosensibles[218] ou encore groupes permettant le greffage ou la polycondensation de blocs (alcools, amines, acides sous leurs formes protégées ou non)[219-222].

II. Modification via des lactones fonctionnalisées

La synthèse d'ε-CL fonctionnalisée est une méthode intéressante qui permet de générer des PCL originales possédant des fonctions, des degrés de substitutions et des architectures variés comme l'illustre la Figure 30.

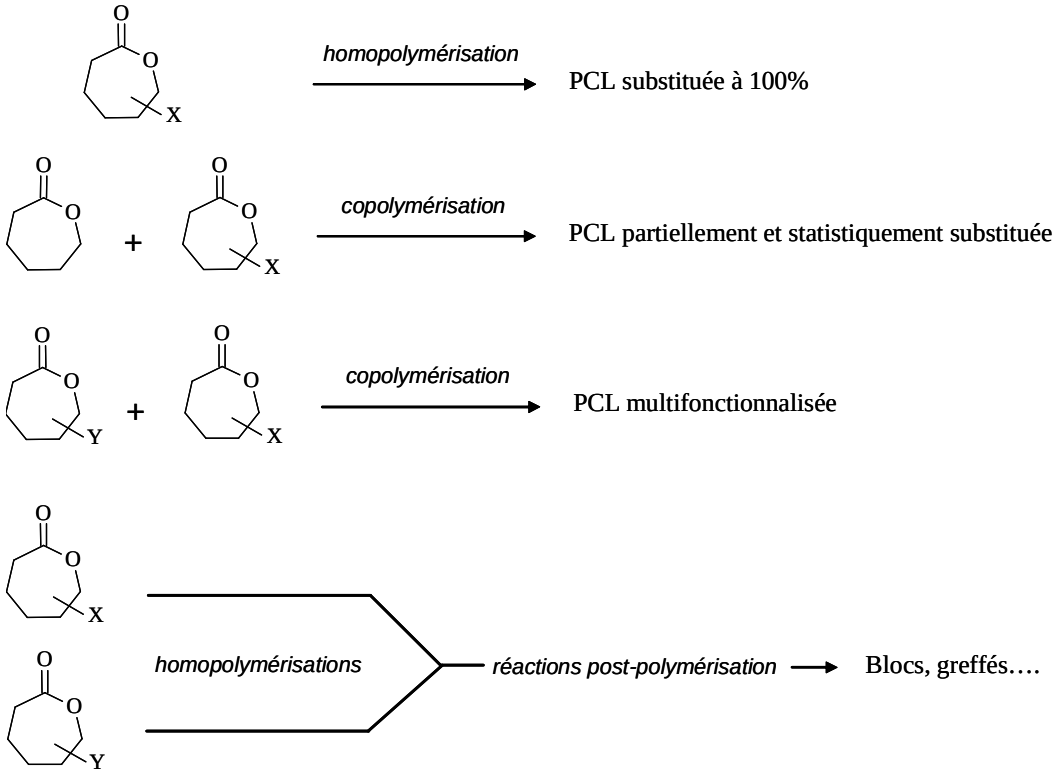


Figure 30 : Homo- et copolymérisation d'ε-caprolactones fonctionnalisées

Cette approche, principalement exploitée par R. Jérôme et son équipe, présente cependant un inconvénient puisque la synthèse des monomères n'est pas toujours réalisable et qu'elle est dans tous les cas longue et délicate.

Chiellini[223] reprend dans une revue récente les différentes lactones fonctionnalisées synthétisées. Ces lactones sont préparées à partir d'1,4-cyclohexanediol qui est oxydé en cyclohexanone

monofonctionnalisée. Cette cétone est soumise à une oxydation par la méthode de Bayer-Villiger utilisant l'acide m-chloroperbenzoïque, ce qui conduit à une ε-CL 4-substituée (Fig.31).

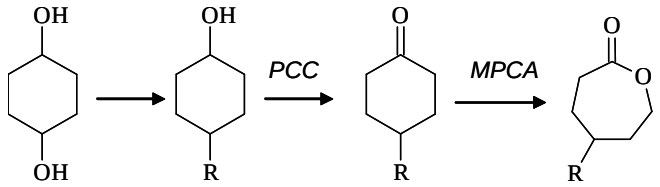


Figure 31 : Obtention d'ε-caprolactones fonctionnalisées par la méthode Bayer-Villiger PCC=chlorochromate de pyridinium MPCA = acide m-chloroperbenzoïque

Les substituants introduits sont semblables à ceux décrits au paragraphe B-1 et permettent après polymérisation et déprotection d'obtenir des PCL fonctionnalisées.

La méthode Bayer-Villiger peut être généralisée à un grand nombre de caprolactones afin de générer des fonctionnalités hydrophiles variées : amine, alcool, acide carboxylique...[222,224,225]. On accède, par exemple, aux fonctions hydroxyle par introduction de radicaux *t*-butyldiméthylsilyloxy [220] et triéthyl-siloxy[224-226] ou par emploi des monomères 4(2-benzyloxyéthyl)-ε-CL[194] ou 1,4,8-trioxa[4,6]spiro-9-undecanone (TOSUO)[227-229].

L'introduction d'halogène sur la lactone est un autre moyen d'obtention de PCL fonctionnalisées puisque la grande réactivité des liaisons carbone-halogène permet d'effectuer facilement des substitutions conduisant à l'introduction de groupes pyridiniums[224,230], des éliminations afin d'obtenir des insaturations[231-234], voire des polymérisations radicalaires contrôlées à partir d'un squelette PCL bromée sur la chaîne[235] ou à l'extrémité d'un bras espaceur[236].

Pour conclure avec ces exemples de modification du monomère ε-CL, citons l'existence d'une PCL méthylée, issue de la polymérisation d'une γ-méthyl-ε-CL synthétisée par Vangeyte[237] et copolymérisée avec du PEO pour former des copolymères amphiphiles non ioniques.

En conclusion, la synthèse de monomères fonctionnalisés est une méthode courante qui permet l'obtention de polyesters fonctionnalisés. Cette méthode est décrite pour la PCL, mais également pour des polymères de type PLA, notamment le DIPAGYL préparé par Saulnier *et al*.[238], ou encore les α-propargyl-δ-valérolactones de Parrish[212]. Elle permet d'envisager la synthèse de copolyesters dont les motifs, de natures différentes peuvent être ou non fonctionnalisés.

Cette diversité devrait donner accès à des comportements physico-chimiques variés et permet de moduler la dégradabilité. Cependant, le temps nécessaire à la synthèse d'un nouveau monomère ainsi

que le soin à apporter à chaque étape (protection, déprotection, (co)polymérisation) sont des obstacles à l'exploitation industrielle.

III. Modification de PCL préformée

La modification de macromolécules préformées est relativement peu exploitée pour PCL. Bhattacharaya *et al.*[239-242] ont introduit des groupes oxazoline et anhydride maléïque à hauteur de 3 et 0,7% de motifs substitués sur la PCL en présence de péroxyde de dicumyle ou d'AIBN au cours de son extrusion. Outre cette modification par voie radicalaire, on trouve également l'utilisation de plasma qui a fait l'objet d'une revue écrite par Södergärd[243]. Il faut remarquer que cette dernière technique permet de modifier avant tout des objets finis en surface et laisse la masse de l'objet inchangée. Des PCL-*g*-poly(acide acrylique) ont été obtenues par cette voie.

La technique la plus récente est celle décrite par Ponsart *et al.*[57,91,92,214,216,244]. Elle consiste en une activation du polymère par voie anionique. PCL, mis en solution dans le THF à -70°C, est activée par attaque par une base forte, le diisopropylamidure de lithium (Fig.32, étape 1). Cette attaque, du fait de l'activation de l'hydrogène en α de la fonction ester, produit un squelette PCL dont un pourcentage faible de motifs caprolactone sont porteurs d'une charge anionique. L'intermédiaire carbanionique PCL, noté $PCL^{\ominus}$**,** peut être utilisé en tant qu'agent nucléophile dans des réactions de substitution pour générer un grand nombre de nouveaux polyesters fonctionnalisés (Fig.32, étape 2).

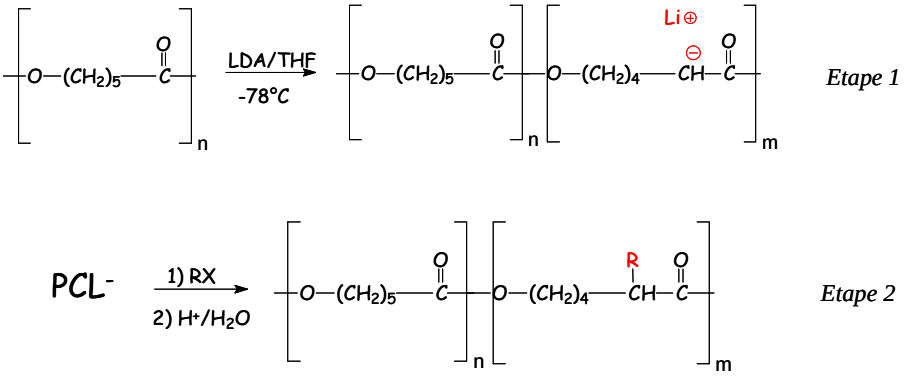


Figure 32 : Schéma réactionnel de modification par voie anionique d'une PCL

Par réaction avec l'iodure de méthyle, le chlorure de bromoacétyle et par bullage de CO_2, des copolymères de PCL-*co*-(α-méthyl-ε-CL), PCL-*co*-(α-bromoacétyl-ε-CL) et PCL-*co*-(α-acide carboxylique-ε-CL) ont été respectivement synthétisés (Fig.33). Outre la diversité des composés synthétisés, un autre avantage de cette méthode réside dans sa rapidité puisqu'une nouvelle structure peut être synthétisée en une journée environ.

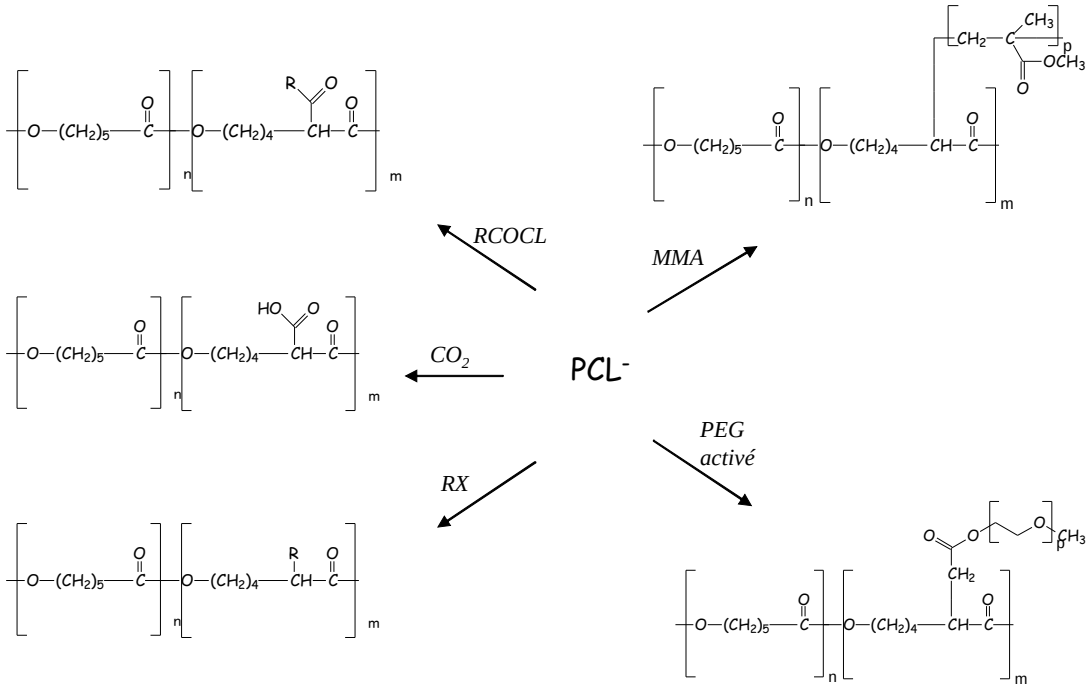


Figure 33 : Copolymères à base PCL obtenus par modification par voie anionique

L'intermédiaire $PCL^{\ominus}$, a également été utilisé dans des réactions de greffages de type « onto » et « from ». Des copolymères PCL-*g*-PMMA contenant environ 30-35% de motifs esters ont par exemple été synthétisés en utilisant le macropolycarbanion comme macroamorceur de polymérisation anionique de méthacrylate de méthyle. De même, par réaction d'un PEG (2000g/mol) activé en extrémité de chaîne par un groupe bromoacétyl, une PCL-*g*-PEG porteuse de 3 greffons en moyenne par chaîne polyester a été obtenue.

Cette méthode, très versatile, a été appliquée à d'autres polyesters tels que le PLA et le poly(β-malate de benzyle)[3].

IV. Conclusion :

Les différentes méthodes de modification de la PCL sont intéressantes puisqu'elles permettent d'adapter ses propriétés (hydrophobie, cristallinité, dégradabilité…) à de nouvelles applications. Mais cette thématique de recherche reste neuve et le nombre de structures synthétisées est pour l'instant limité. C'est en particulier le cas pour les copolymères amphiphiles à base de PCL (A-II-2c) d'où l'intérêt qu'il a été décidé de porter à la méthode de modification par voie anionique.

C- Conclusion et stratégie de synthèse

L'analyse bibliographique des aspects pertinents par rapport à nos objectifs a révélée l'existence de divers types de copolymères amphiphiles dont certains contiennent des segments dégradables, très souvent polyesters aliphatiques.

La synthèse de caprolactones fonctionnalisées et la copolymérisation d'ε-CL sont des méthodes qui permettent de modifier les propriétés intrinsèques du squelette PCL (hydrophobie, cristallinité, dégradabilité…). Ces méthodes posent toutefois des problèmes spécifiques en terme de synthèse et de polymérisation, ce qui explique le nombre restreint de structures synthétisées jusqu'à présent. C'est notamment le cas pour les copolymères amphiphiles à base PCL dont on trouve peu d'exemples. Ces derniers concernent presque exclusivement des copolymères à blocs.

La méthode de modification proposée par Ponsart et Coudane, à savoir la modification chimique par voie anionique de la PCL, présente l'avantage d'être simple et adaptée à un grand nombre de substituants. Le mécanisme général, donné sur la Figure 32, permet d'envisager deux stratégies d'hydrophilisation du squelette hydrophobe PCL :

- la voie privilégiant le caractère « nucléophile » du macropolycarbanion $PCL^{\ominus}$. La réaction se fait alors sur un électrophile choisi en fonction de son caractère cationisable ou hydrophilisant et passe par un mécanisme de type SN.
- la voie privilégiant le caractère « macroamorceur » du macropolycarbanion $PCL^{\ominus}$. La polymérisation d'un monomère susceptible de réagir par voie anionique est alors amorcée.

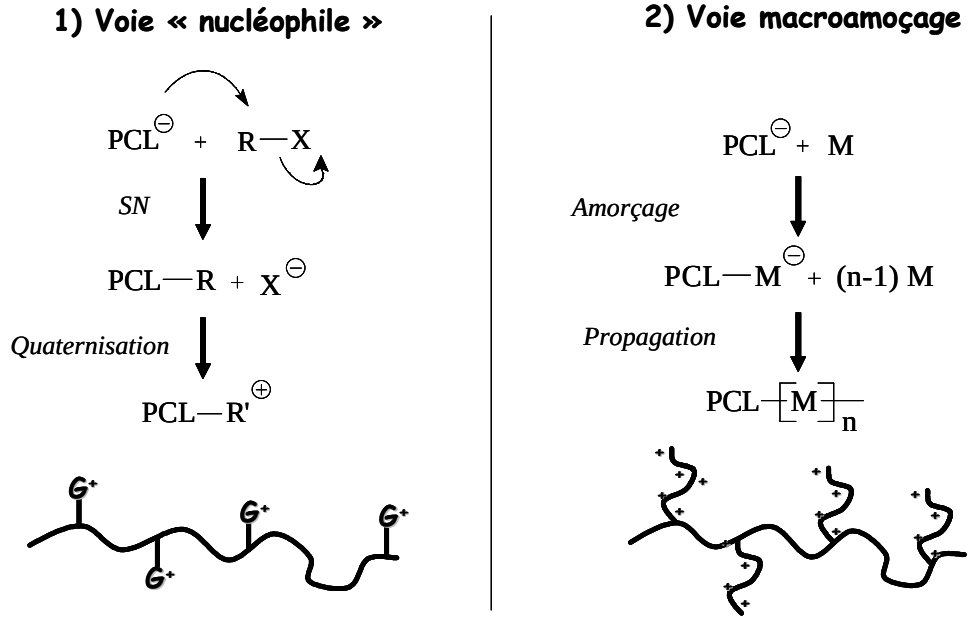


Figure 34 : Voies de synthèses envisagées pour l'obtention de nouveaux copolymères par modification anionique de PCL

Nous nous proposons, dans ce mémoire de thèse, d'exploiter cette technique et ses différentes voies à des fins d'hydrophilisation du squelette PCL.

Le travail réalisé comprend quatre approches de modification distinctes. On s'intéressera dans un premier temps au greffage de groupes hydrophilisants par substitution nucléophile sur le squelette PCL (Fig.34, voie 1). Une deuxième partie décrira les synthèses et les caractéristiques de copolymères amphiphiles greffés par polymérisation anionique de monomères fonctionnels amorcée à partir du squelette de PCL activé (Fig.34, voie 2). La troisième partie rapportera une étude visant à établir la faisabilité d'un contrôle de polymérisation radicalaire par un dérivé halogéné de PCL. Enfin, la post-modification de PCL déjà fonctionnalisées par voie anionique sera abordée.

CHAPITRE II

LE SQUELETTE PCL CARBANIONIQUE COMME AGENT NUCLEOPHILE

Nous décrivons ici la première stratégie de synthèse envisagée pour obtenir des PCL cationiques. Celle-ci s'appuie sur le caractère nucléophile du macropolycarbanion $PCL^{\ominus}$ qui est mis à réagir avec des réactifs électrophiles cationiques (ou cationisables) et/ou hydrophilisants. Les étapes générales de synthèse sont celles données dans la Figure 32 avec les conditions suivantes :

- une concentration en motifs monomères ε-CL de 0,35M dans le THF
- une température basse [-80 ; -70]°C
- 1 équivalent de LDA et 1 équivalent de réactif électrophile par équivalent de motifs monomères

1) Méthylation de PCL

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la méthylation de PCL activée afin de nous familiariser avec le protocole expérimental établi par Ponsart. L'emploi d'iodométhane lui avait permis de synthétiser un squelette méthylé à 15% possédant des propriétés mécaniques différentes de celles de la PCL. Nous avons donc retenu les conditions standard (1 eq. LDA, 1 eq. d'iodure de méthyle) appliquées à une PCL synthétisée au laboratoire par ouverture du cycle en présence d'octanoate d'étain. La seule différence a été la concentration en motifs PCL dans le THF qui a été ajustée à 0,35M au lieu de 0,1M afin de tenir compte de résultats obtenus précédemment au laboratoire. Par la suite cette concentration a été utilisée pour tous les essais.

Dans ces conditions, un taux de substitution comparable à ceux cités (15-20%) a été évalué par analyse RMN ^{1}H. Par contre, un pourcentage de coupures de chaînes 10 fois inférieur à celui obtenu avec une PCL commerciale a été constaté. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence éventuelle de défauts d'enchaînements existant au sein de la PCL commerciale et favorisant les coupures de liaisons. La PCL utilisée pour toutes les manipulations ultérieures est d'origine commerciale pour se rapprocher de conditions industrielles et la même référence a été commandée afin de s'affranchir de toute influence de la provenance du polymère sur les résultats.

Suite à ces essais préliminaires encourageants, la fonctionnalisation de la PCL par des fonctions hydrophilisantes a été envisagée.

2) Synthèse de PCL carboxylée

De même que pour le composé méthylé, la synthèse d'une PCL carboxylée a été réalisée afin de se familiariser avec la réaction tout en produisant un copolyester possédant des fonctions hydrophilisantes. Bien que ces dernières ne soit pas cationiques/cationisables, elles sont néanmoins intéressantes du fait de leur fort caractère hydrophilisant et de leur réactivité qui permet, comme on le verra au chapitre V, d'envisager des réactions supplémentaires sur le squelette carboxylé.

La réaction a été effectuée selon le protocole décrit par Gimenez et Ponsart,[57,92] par bullage de CO_2 gazeux dans le milieu réactionnel contenant le macropolycarbanion. Deux fractions ont été récupérées. La première, qui est de loin majoritaire, a été précipitée dans le méthanol (fraction1), la seconde dans l'éther (fraction 2). Cette différence de solubilité s'explique à la fois par la longueur des chaînes et la teneur de chaque fraction en fonctions carboxyle. Le taux de substitution a été estimé par analyse RMN ^1H et dosage potentiométrique à l'aide d'une solution aqueuse de soude (0,01N) ajoutée à une solution de PCL carboxylée dans le THF (Fig.35). Etant donné le manque de précision et les incertitudes qui accompagnent la première méthode lorsqu'elle est utilisée pour des fonctions à hydrogènes mobiles (massifs diffus plutôt que pics, faible intensité des signaux…) seuls les résultats obtenus par dosage sont retenus dans ce qui suit.

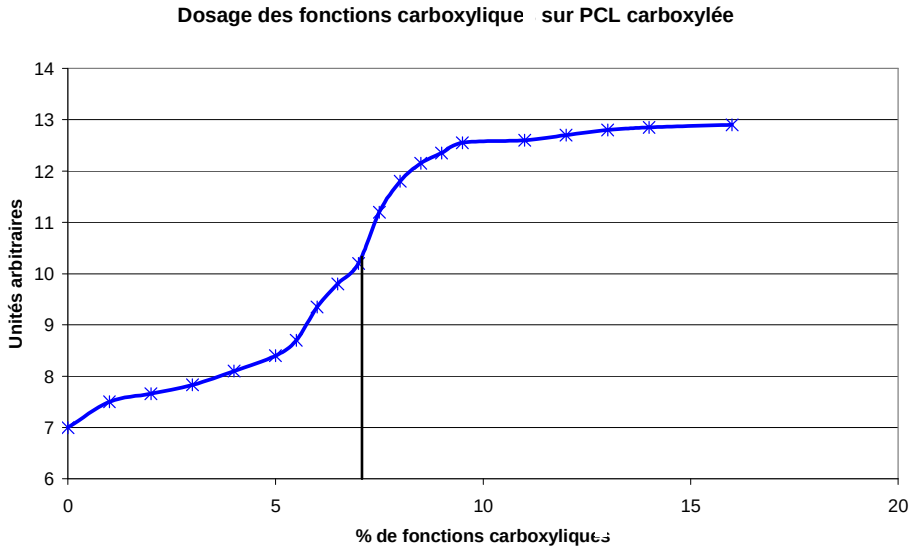


Figure 35 : PCL carboxylée : détermination du taux de substitution de la fraction 1 par dosage potentiométrique

La fraction 1, qui représente 80% du produit récupéré, contient 7,6 % de motifs carboxylés et une analyse par chromatographie d'exclusion stérique (CES) a montré que les chaînes ont une masse molaire moyenne en nombre $\overline{Mn}$ = 15 000 g/mol et un indice de polymolécularité de 2,8 (contre 35 000 g/mol et 1,6 initialement). En ce qui concerne la fraction 2, le taux de substitution est de 19% et la masse molaire moyenne, qui n'a pas été mesurée, est probablement plus faible en accord avec l'aspect de cire collante alors que la fraction 1 est une poudre de couleur crème.

Les propriétés des copolymères PCL-co-poly[(α-carboxy)-ε–caprolactone] n'ont pas été évaluées davantage étant donné qu'une étude poussée avait déjà été réalisée par Ponsart[57] et que notre intérêt principal réside dans la possibilité d'utilisation de ce copolymère comme intermédiaire réactionnel. On soulignera seulement que pour des composés semblables à la fraction 1, tant sur le plan des masses molaires que des taux de substitution, il a été montré par Ponsart que les copolymères de ce type sont semi-cristallins avec un taux de cristallinité inférieur à celui d'une PCL de masse molaire équivalente et que les températures de fusion et de transition vitreuse sont de 50 et -45°C environ contre 60 et -

60°C environ pour la PCL de départ. Une hydrophilie plus importante a été confirmée par la mesure des angles de contact, ce qui explique que les vitesses de dégradation de ces composés sont grandement accélérées.

3) Introduction de groupes cationiques

Afin d'arriver le plus rapidement possible à une structure polyester porteuse de fonctions cationiques, la mise en présence du macropolycarbanion avec des réactifs déjà quaternisés a été envisagée. Les premiers produits utilisés ont été les bromures de (3-bromoéthyl)triméthylammonium et de (3-bromopropyl)triméthylammonium ($BrEtN^+Br^-$ et $BrPrN^+Br^-$) qui ont été rapidement remplacés par leurs homologues triphénylphosphonium ($BrEtP^+Br^-$ et $BrPrP^+Br^-$) afin de favoriser la solubilisation en milieu organique par l'organophilie des groupes aromatiques. En effet, le problème majeur qui rencontré est l'insolubilité des réactifs aliphatiques chargés dans le THF, solvant de la réaction. Le remplacement du groupe ammonium par un groupe phosphonium n'ayant pas eu d'effet sur la solubilisation, deux autres voies ont été envisagées :

- effectuer un échange de contre-ion afin de créer des paires d'ions solubles en milieu organique (échange entre un bromure et Sodium Dodecyl Sulfate (SDS))
- trouver un solvant organique miscible au THF et permettant une solubilisation des dérivés ammonium et/ou phosphonium

Deux stratégies ont été suivies pour l'échange de contre-ion:

- la première consiste en un échange direct en milieu éthanol ou aqueux entre l'anion dodécyl sulfate du SDS et les ions bromures des cations $BrPrP^+Br$- et $BrPrN^+Br^-$. Cette méthode s'est révélée inefficace.
- la seconde est basée sur l'échange d'ions sur colonne avec passage de la forme bromure à la forme hydroxyle pour le cation $BrEtN^+$ et de la forme Na^+ à H^+ pour le SDS. Les deux solutions ont ensuite été mélangées afin de réaliser un échange thermodynamiquement favorisé par le caractère quantitatif de la réaction acido-basique. Cette voie a permis l'obtention d'un sel ($BrEtN^+$; dodécyl sulfate) avec un rendement de 40% estimé par titrage potentiométrique. Malgré ce nouveau contre-ion, le sel est demeuré insoluble dans le THF, d'où l'abandon de ces techniques d'échange.

Pour la recherche d'un cosolvant, des essais préliminaires ont fait émerger deux composés, le nitrobenzène et le DMSO dans lesquels $BrPrP^+Br^-$ est soluble. Les essais réalisés sont résumés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Conditions de réaction pour les substituants cationiques

Réactif	**Cosolvant** (Cos)	**(THF,Cos)** (v;v)	**E_1**	**E_2**	**Substitution** (%)	**Remarques**
$BrPrP^+,Br^-$	$C_6H_5NO_2$	(1;0.85)	30 min -50°C	90 min [-55;-30°C]	0,5	Légère prise en masse
CH_3I	DMSO	(1;0.25)		35 min [-45;-40°C]	2,5	Légère prise en masse
$BrPrP^+,Br^-$		(1;1)		45 min **[-25;-10°C]**	**4**	Obtention d'une **huile**

Il faut noter que la température de réaction ne peut être abaissée à -70°C même en mélange, puisque la température de fusion du DMSO pur est élevée (18,4°C). L'essai réalisé avec l'iodure de méthyle avait pour but de montrer l'influence du DMSO sur le taux de substitution. La substitution faible de 2,5 %, contre 15-20% dans les conditions normales, peut s'expliquer par la prise en masse du milieu observée en cours de réaction. Afin de favoriser cette substitution et d'éviter la prise en masse, la température de la seconde étape a été augmentée de -50°C environ à [-25 ; -10°C] pour le troisième essai. Ces conditions ont permis la synthèse d'une PCL substituée à 4% par des groupes cationiques démontrant ainsi l'intérêt que présente l'emploi d'un cosolvant qui a permis une substitution directe de PCL par un réactif cationique.

Ce type d'essai a cependant été abandonné sans chercher à en optimiser les conditions car les taux de substitution accessibles sont bien trop faibles pour permettre la solubilisation de la PCL substituée en milieu aqueux, même avec un substituant beaucoup plus hydrophilisant que les groupes triphénylphosphonium.

4) Introduction de groupements hydroxyle et amine

Ayant montré qu'il est difficile d'introduire directement des groupes cationiques, nous nous sommes ensuite intéressés à la substitution des motifs PCL par des entités hydrosolubilisantes et/ou quaternisables, à savoir des fonctions amine et des groupes hydroxyle.

a) Introduction de fonctions amine et alcools

Dans le cas d'une substitution directe, il est probable que la mise en présence du macropolycarbanion et de réactifs porteurs de fonctions hydroxyle ou amine non protégées détruise les sites carbanioniques. Une expérience a donc été effectuée en utilisant le bromoéthanol comme réactif. Ce composé est susceptible de réagir suivant deux mécanismes avec le squelette carbanionique :
-par arrachage du proton de l'alcool primaire, ce qui entraîne la perte de carbanion généré et la reformation de PCL

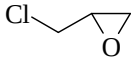
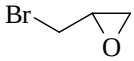
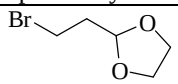
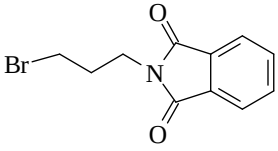
-par susbstitution nucléophile sur le carbone porteur du brome et formation d'un copolymère porteur de fonctions hydroxyle.
Si la 2ème réaction est plus rapide que la première, on doit aboutir à une substitution directe.

Dans les conditions standard, comme on peut s'y attendre, aucune substitution n'a été observée par analyses RMN, ou IR. Il est donc nécessaire de protéger les fonctions hydroxyle et amine pour pouvoir effectuer la substitution nucléophile visée.

b) Introduction de fonctions protégées

La stratégie envisagée consiste à d'abord protéger les fonctions hydroxyle ou amine avant réaction sur PCL puis de les déprotéger après réactions par des méthodes appropriées, si possible respectueuses du squelette polyester.

Tableau 13 : Conditions de réaction pour les substituants à fonctions protégées

Réactif	T(°C) /durée Etape 1	T(°C) /durée Etape 2	Hydrolyse	Taux de substitution
 Epichlorhydrine	[-70 ;-60] 35 min	<-50°C 35 min	classique*	1-3%
 Epibromhydrine	[-70 ;-65] 30 min	[-65 ;-55] 45 min	classique	0%**
 Bromoéthyldioxolane	[-75 ;-70] 35 min	[-70 ;-60] 45 min	inverse*	0%**
 Bromopropylphtalimide	[-75 ;-70] 40 min	[-70 ;-60] **1h40**	inverse	**7%**

* *voir la partie expérimentale* ** *non détectable par RMN.*

Le Tableau 13 présente les conditions et résultats des différents essais effectués en faisant réagir des agents électrophiles porteurs de fonctions protégées. Ces réactions ont toutes impliqué 1 équivalent de LDA et 1 équivalent de réactif électrophile par rapport aux motifs ε-CL. Les taux de substitution ont été déterminés par analyse RMN ^{1}H en comparant les intégrations relatives des signaux caractéristiques du squelette PCL et du substituant.

En dehors du bromopropylphtalimide, aucun réactif n'a réagi de manière significative avec le macropolycarbanion PCL$^{\ominus}$. Deux facteurs peuvent expliquer cet échec :

- la durée de réaction était trop courte lors de la seconde étape. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le seul réactif ayant réagi a été mis en contact avec le carbanion 1h40 au lieu de 35-45min

pour les autres électrophiles.

- la température de cette même étape était trop basse pour permettre la réaction de substitution nucléophile dans le cas de chaînes macromoléculaires porteuses de carbanions, même avec des électrophiles très réactifs (épibromhydrine).

Afin d'évaluer l'influence de ces facteurs, des essais supplémentaires ont été réalisés avec l'épibromhydrine qui peut réagir soit avec substitution de l'atome de brome, soit par ouverture de cycle époxyde entraînant de manière concomittante le départ du brome et la reformation de l'époxyde (Fig.36)

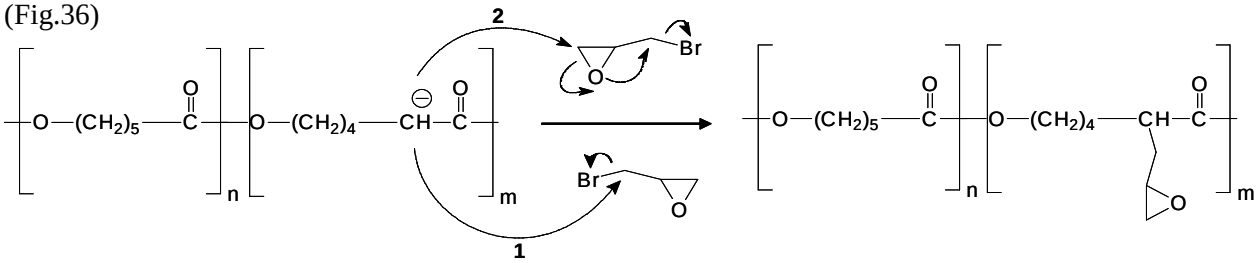


Figure 36 : Attaques nucléophiles possibles sur l'épibromhydrine par PCL$^{\ominus}$

Les résultats sont résumés dans le tableau qui suit.

Tableau 14 : Essais de substitution avec l'épibromhydrine

Conditions	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Etape 1	-70°C / 30 min		
Etape 2	- 60°C / 45 min	-60 à -35°C / 1h30	**0°C** / 1h30
Taux de substitution	0%	0%	**20%**

Les taux de substitutions ont été calculés en se référant aux signaux caractéristiques de l'époxyde se situant à 1,8-2,5 et 3,3 ppm et à ceux de PCL. Le facteur le plus important est la température puisqu'avec une même durée de réaction fixée à 1h30, on passe de 0 à 20% de substitution lorsque la seconde étape est effectuée à une température variant de -60 à -35°C et à 0°C respectivement.

Le taux élevé de substitution obtenu à 0°C est cependant contre-balancé par une diminution importante des masses molaires. On passe en effet d'une masse molaire moyenne en nombre initilale $\overline{Mn}_0$ = 37500 g/mol à une valeur finale $\overline{Mn}_f$ = 4000 g/mol alors que pour les réactions utilisant des températures plus basses cette valeur est encore de $\overline{Mn}_f$ = 18000 g/mol. L'influence de la température a déjà été évoqué par Ponsart *et al.*[57]. Un compromis est donc à trouver entre une PCL fortement substituée de faible masse molaire et une PCL peu fonctionnalisée mais dont la masse molaire reste élevée.

Concernant le copolymère ayant 7% de ses motifs porteurs d'une fonction phtalimide (Tab.13), la déprotection des fonctions amine primaire a été réalisée par réaction avec l'hydrazine[245](Fig.37). Cette méthode a été retenue après un test préalable sur une PCL commerciale ayant montré que les liaisons

ester du squelette ne sont pas aminolysées. Un premier essai dans les conditions de la littérature n'a conduit qu'à une déprotection de 30% des amines. Cette limitation a été attribuée aux conditions utilisées, prévues pour des petites molécules organiques et non pour des macromolécules. Afin de tenir compte de l'encombrement stérique inhérent aux squelettes polymères, le temps de réaction a été augmenté de 1h30 à 22h et un taux de déprotection de 100% a été déterminé par RMN ^{1}H. Il faut toutefois noter que l'augmentation du taux de déprotection s'est accompagné de coupures de chaînes reflétées par l'analyse chromatographique par CES avec passage de ($\overline{Mn}_0$ = 18300 ; Ip_0 = 1,9) pour le copolymère protégé à ($\overline{Mn}_f$ = 7300 ; Ip_f = 3,0) pour la polyamine. Il est cependant possible que ce polymère traîne sur la colonne en raison des fonctions amine.

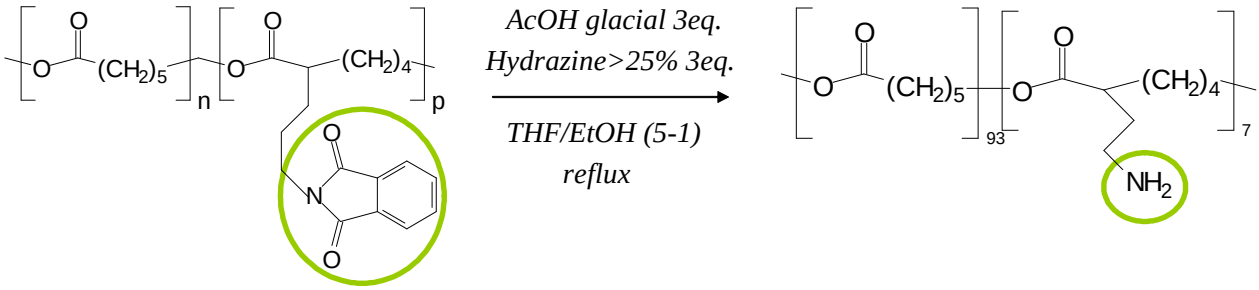


Figure 37 : Synthèse de PCL-co-poly[(α-3-aminopropyl)-ε–caprolactone]

Selon une variante, un groupe nitro a été introduit sur le squelette PCL par réaction du macropolycarbanion avec le bromure de 4-nitrobenzyle. Bien que le groupe benzyle soit hydrophobe, ce substituant a été choisi car il est aisément détectable en RMN, le passage de la fonction nitro à la fonction amine se traduisant par un déplacement chimique net des signaux correspondants aux protons aromatiques. Il s'agit donc plus d'une validation de la méthode permettant de s'assurer de l'efficacité de la déprotection et de sa compatibilité avec le squelette polyester que d'une hydrophilisation. La réaction de substitution a été réalisée dans les conditions standard. La déprotection, fondée sur la méthode décrite par Satoh *et al.*[246], a été effectuée à l'aide d'un mélange de $SnCl_2$ et de $NaBH_4$. La procédure a été testée sur une PCL commerciale non substituée dans des conditions plus « dures » que celle décrites dans la littérature : seulement 0,2% des liaisons ester se sont trouvé coupées ce qui est acceptable. La réaction a donc été appliquée au copolymère PCL-*co*-poly[(α-4-nitrobenzyl)–ε–caprolactone] avec 0,5 puis 0,8 équivalent de $NaBH_4$ par rapport aux fonctions nitro et un nombre d'équivalent de $SnCl_2$ fixé à 5. Après 22 heures de réaction, seule l'utilisation de 0,8 eq. de $NaBH_4$ a conduit à une déprotection totale. Les résultats après déprotection sont donnés dans le Tableau 15, les structures obtenues sont représentées sur la Figure 38.

Tableau 15 : Caractéristiques comparées des copolymères PCL-co-poly[α-4-nitrobenzyl)-ε–caprolactone] et PCL-co-poly[α-4-aminobenzyl)-ε–caprolactone]

	$\overline{Mn}$ (g/mol)	Ip	Substitution	T_c / T_f (°C)	ΔHf (J/g)
PCL	35500	1,6	/	27 / 61	44
PCL-*co*-(PCL-CH_2ØNO_2)	26300	3,5	11%	5 / 46	19
PCL-*co*-(PCL-CH_2ØNH_2)	6000	2,2	11%	/	/

On constate que les masses molaires sont plus faibles que celles attendues d'après le test préliminaire de déprotection sur PCL. Deux facteurs expliquent ce résultat. Le premier est technique, il est lié à la méthode utilisée pour évaluer les masses molaires. En effet, les analyses CES ont été effectuées dans le THF et il est probable que dans ce solvant le fait de passer des fonctions nitro aux fonctions amine, avec possibilité de liaisons hydrogène, change le rayon hydrodynamique des macromolécules et donc leur temps de rétention. La présence de fonctions amine peut aussi créer une certaine affinité pour la phase fixe. Le second facteur est chimique, même si ce type de réaction nécessite généralement une activation thermique, il se pourrait que les fonctions amine générées aminolysent les liaisons ester de la structure de manière intra ou intermoléculaire. Cette seconde hypothèse expliquerait les résultats obtenus pour la déprotection du phtalimide décrit précédemment.

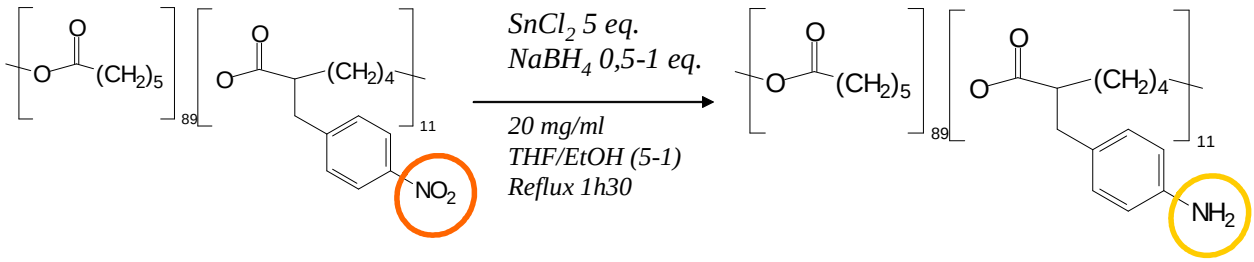


Figure 38 : Synthèse de PCL-co-poly[α-4-aminobenzyl)-ε–caprolactone]

5) Introduction d'halogènes

L'introduction sur la PCL d'un groupe porteur d'un halogène est une modification intéressante du squelette polyester puisqu'elle permet de disposer d'un bon groupe partant facilement substitué par un nucléophile de type amine tertaire comme décrit par l'équipe de R.Jérôme[224,234,236].

On peut envisager deux types de stratégies (Fig.39). Soit l'atome d'halogène est séparé de la chaîne principale par un bras espaceur pour favoriser l'accessibilité à la liaison C-X réactive (a). Soit l'halogène est sur le squelette en α de la fonction ester pour favoriser la réactivité de la liaison C-X (b).

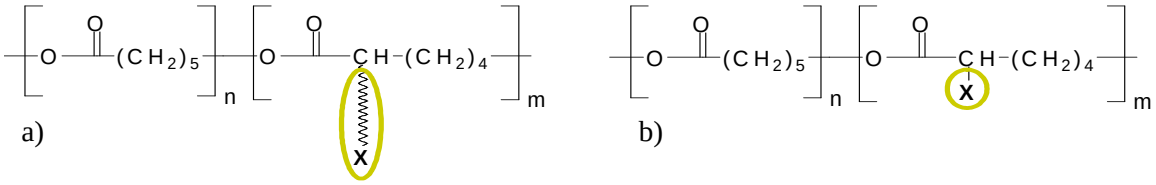


Figure 39 : PCL halogénée a) halogène sur un bras espaceur b) halogène sur le squelette

a) Halogène en extrémité de bras espaceur

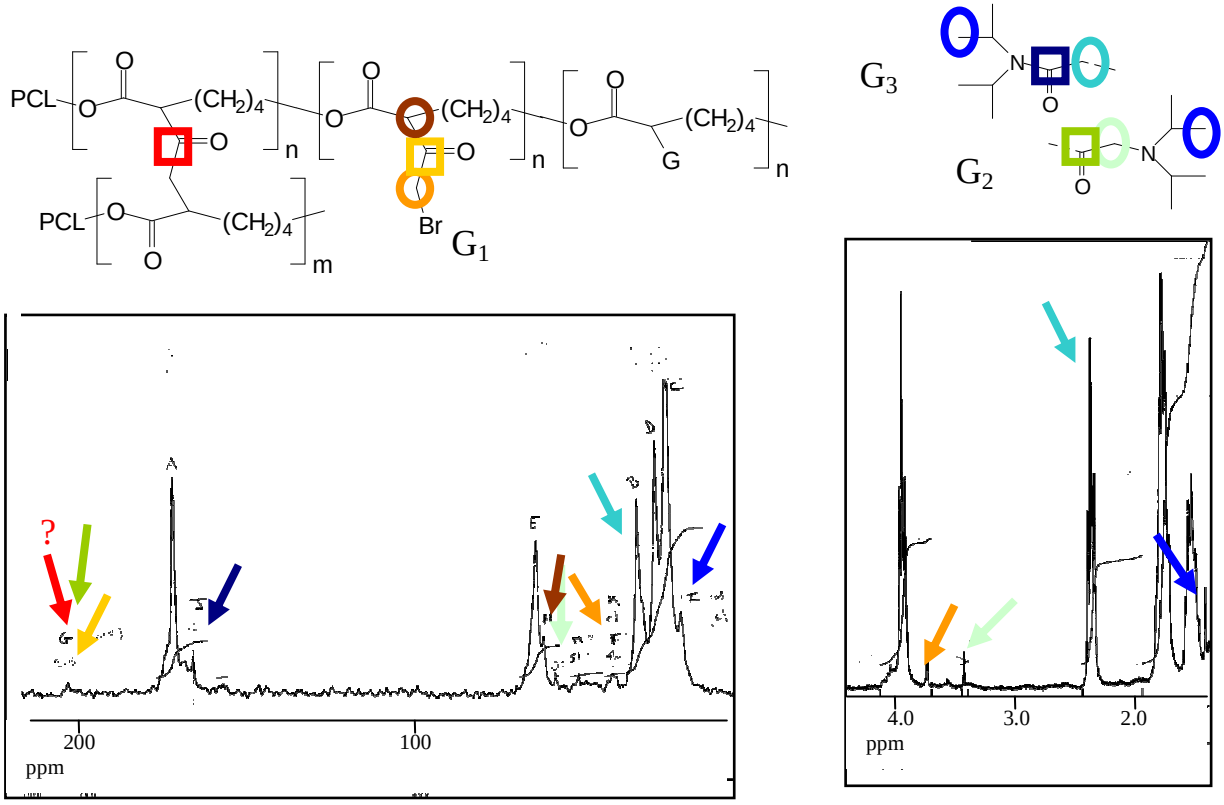
Le chlorure de bromoacétyle a été retenu en raison de sa grande réactivité. Plusieurs essais ont été réalisés afin d'augmenter le taux de substitution. Ce dernier est en fait resté faible malgré des changements de conditions (température, durée, nombre d'équivalent de chlorure de bromoacétyle). Aucun de ces essais n'a permis d'obtenir des taux supérieurs à 4,2% (Tab.16).

Tableau 16 : Essais réalisés avec le chlorure de bromoacétyle

Essai	E1	E2	Equivalents	% de substitution
1	30 min ; -70°C	45 min ; -55°C	1	2,7
2	30 min ; -55°C	35 min ; -50°C	2	3,0
3	30 min ; -65°C	50 min ; -50°C	2	3,8
4	30 min ; -55°C	60 min ; -40°C	3	4,2

Cet échec est attribuable aux nombreuses réactions secondaires survenant en cours de modification, le chlorure de bromoacétyle pouvant réagir par le carbone portant le brome ou par celui portant le chlore. Le résultat est une structure PCL partiellement réticulée moins réactive vis-à-vis du réactif libre.

La multiréactivité été mise en évidence par analyses CES et DSC. La masse molaire $\overline{Mn}$ est restée peu différente de celle de la PCL de départ. En revanche, l'indice de polymolécularité est passé de 1,6 à 2,5-6, ce qui peut traduire des branchements partiels de la structure. Le thermogramme obtenu par DSC présente deux températures de fusion à 40 et 50°C dues à la présence de deux populations de macromolécules. On pourrait penser qu'il s'agit d'une population branchée et d'une autre substituée sans branchement. Cette hypothèse est confirmée par RMN ^{1}H et ^{13}C (Fig.40).



(a) *(b)*

Figure 40 :Mise en évidence de réactions secondaires par réaction avec le chlorure de bromoacétyle par analyses RMN ^{13}C (a) et RMN ^{1}H (b)

Le spectre RMN ^{13}C présente un pic à 205 ppm qui correspond soit à une double liaison C=O se trouvant aux nœuds de réticulation soit à celles des substituants. La RMN ^{1}H montre en outre la présence de nombreux signaux caractéristiques de produits de réaction entre le chlorure de bromoacétyle et la diisopropylamine générée au cours de la première étape. En particulier, l'augmentation du nombre d'équivalents de chlorure de bromacétyle entraîne une augmentation de l'intensité des signaux à 1,25 ppm dans le produit. Ces signaux traduisent la présence des groupements méthyle de l'amine non éliminée par lavage et donc liés au squelette polymère. Par comparaison des intensités relatives des signaux on peut estimer à 4% le pourcentage de substitution par un groupe pendant -$COCH_2Br$ (G_1 signal à 3,9 ppm), à 3% celle de motifs substitués par un groupe -$COCH_2N((CH(CH_3))_2$ (G_2 signal à 3,5 ppm) et à environ 1% les motifs porteurs de groupes -$CH_2CON((CH(CH_3))_2$ (G_3 taux calculé par différence).

Au final, on se trouve donc en présence d'une PCL qui peut être partiellement branchée et substituée à 8%, taux peu différent des 10-15% habituels[57]. Ce taux peut sembler faible par rapport à la grande réactivité du chlorure de bromoacétyle vis-à-vis du macropolycarbanion. Il peut être justifié par l'existence de réactions parallèles entre la diisopropylamine et le chlorure de bromoacétyle non lié au squelette dont les produits sont éliminés au cours du traitement.

Bien que la PCL obtenue soit porteuse de fonctions amine tertiaire, la substitution de seulement 4% des motifs reste trop faible pour compenser les inconvénients liés aux nombreuses réactions secondaires (taux global de 8 % faible, réticulation partielle…). Cette méthode d'introduction d'un atome d'halogène a donc été abandonnée.

b) Introduction d'atomes d'iode sur le squelette : PCL iodée

L'iode est connu pour être un bon groupe partant vis-à-vis d'une substitution nucléophile et ce d'autant plus qu'il entraîne un fort encombrement stérique. I_2 se présente en outre sous la forme d'un solide ce qui facilite sa manipulation.

En raison des applications potentielles du dérivé PCL-iodée, une étude plus poussée a été menée sur ses caractéristiques physico-chimiques et mécaniques. Les paragraphes suivants présentent les propriétés de ce nouveau polyester dégradable radio-opaque.

i. Synthèses

La réaction a été menée suivant le schéma classique avec comme réactif une solution de diiode dans le THF (1 équivalent I_2 par motif ε-CL). De même que pour le chlorure de bromoacétyle, plusieurs essais ont été réalisés afin d'optimiser le taux de substitution et les propriétés des copolymères synthétisés en jouant sur les conditions de la seconde étape (Tab.17).

Tableau 17 : Synthèses et caractéristiques de PCL iodée

Echantillon	**t** (min)	**T** (℃)	**Rendement %**	**Taux d'iode %**	**Mn**	**Ip**
Iodo-PCL1	50	[-50 ;-45]	30	25	gel	
Iodo-PCL2	30	[-70 ;-65]	83	10	9500	4.8
Iodo-PCL3	50	[-70 ;-65]	66	13.5	7000	2.8
Iodo-PCL4	120	[-70 ;-65]	74	11	6000	3.6
Iodo-PCL5	30	[-70 ;-65]	65	15-20	10400	3,4

La quantité de PCL commerciale initialement mise en jeu est la même pour tous les essais (4g) sauf pour le dernier dont le but était de montrer la faisabilité de la méthode sur des quantités plus importantes (10g). On constate que les caractéristiques du copolymère iodo-PCL(#5) sont semblables à celles des Iodo-PCL(#1 à 4). La réaction peut donc être menée sur des lots plus importants sans modification sensible des caractéristiques du produit (taux de substitution, masses molaires…)

ii. Caractérisations

- Pourcentage d'iode

Le taux de substitution par l'iode a été calculé à partir des spectres RMN ^{1}H en comparant les intensités relatives des signaux à 4,5 ppm (méthyne du CHI) et 2 ppm (méthylène du CH_2-CHI) avec celles du signal de la PCL à 4,1 ppm (méthylène du O-CH_2) (Fig.41-a).
L'iodation a été confirmée par RMN ^{13}C du solide, réalisée avec le gel obtenu lors du premier essai, où les signaux correspondant aux carbones des motifs iodés sont visibles (Fig.41-b).

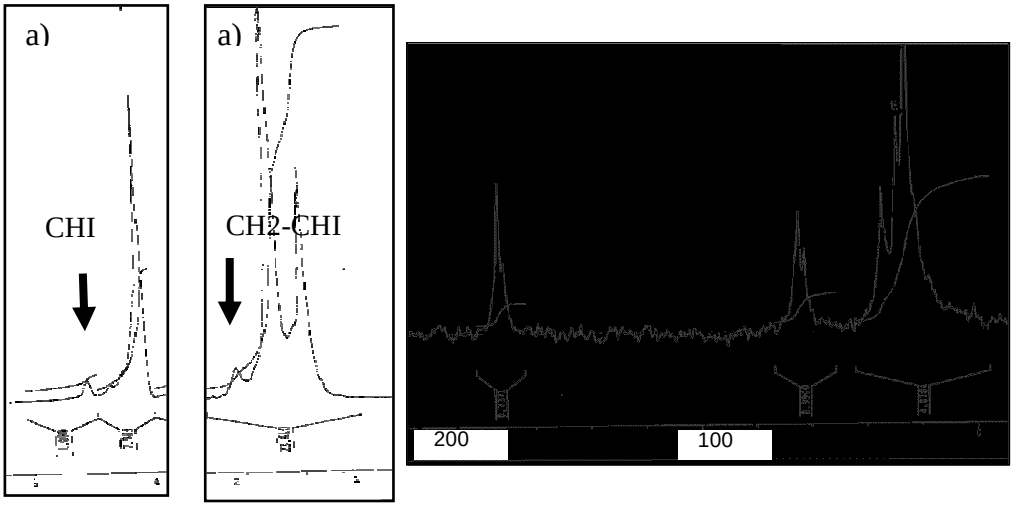


Figure 41 : Spectres obtenus par analyse RMN^{1}H a) RMN^{13}C b) d'unePCL iodée

- Masses molaires

Les chromatogrammes des PCL iodées obtenues au cours des essais 2 à 4 (copolymères solubles dans le THF) sont présentés sur la Figure 42.

GPC des PCL iodées (THF)

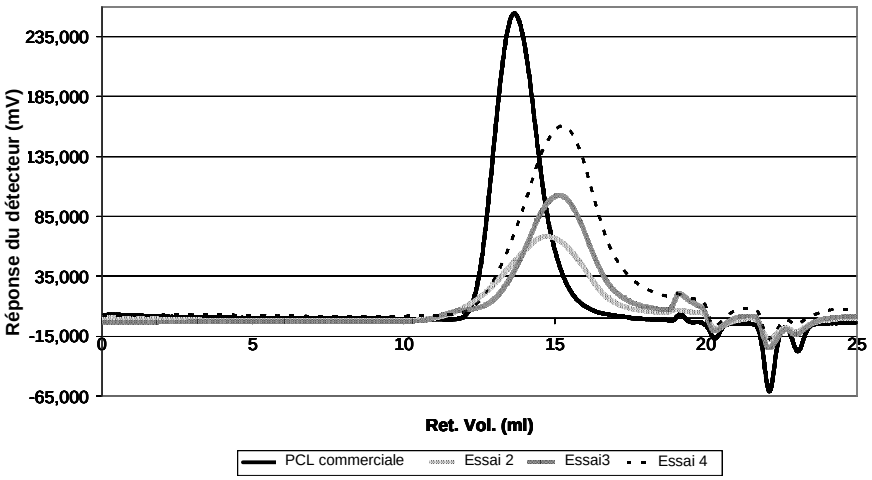


Figure 42 : Chromatogrammes des différentes PCL iodées

L'augmentation du temps d'élution, correspondant à une diminution de masse molaire, traduit des coupures de chaînes au cours de la réaction de substitution, en accord avec la littérature[57,216]. Tous les chromatogrammes sont monomodaux. La Figure 43 montre une diminution progressive des valeurs de $\overline{M_n}$ avec le temps de réaction de la seconde étape*. Cette diminution de $\overline{M_n}$ est très importante dans les premières minutes de réaction avant de ralentir par la suite. La polymolécularité est élevée (Ip compris entre 2,8 et 4,8), et est attribuée à l'existence de coupures de chaînes et à la formation de liaisons covalentes intra et/ou intermoléculaires.

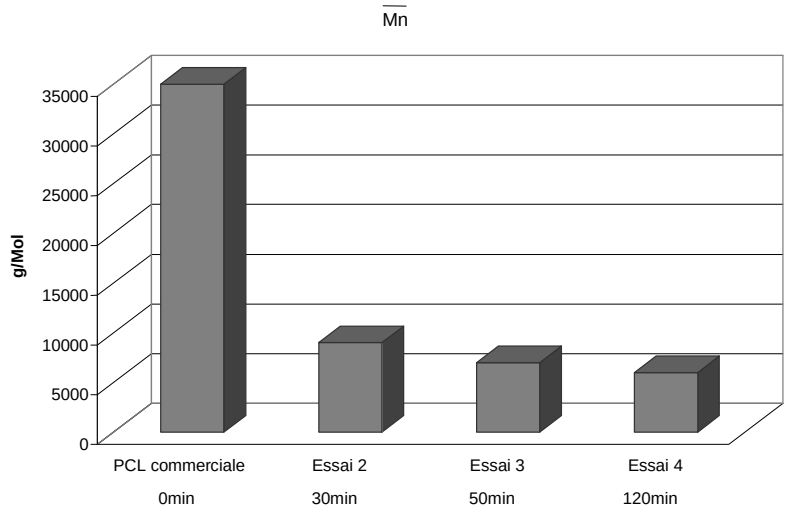


Figure 43 : Masses molaires des PCL iodées en fonction du temps de réaction de l'étape de substitution

**Remarque* : Chaque essai présenté sur la Figure 43 correspond à une réaction différente.*

- Cristallinité, Tf, Tv,(X Rays, DSC)

Les propriétés thermiques (point de fusion Tf, cristallisation Tc, et enthalpie de fusion ΔHf) des copolymères iodés ont été évaluées par DSC. Les résultats donnés dans le Tableau 18 et la Figure 44 correspondent à ceux obtenus lors du second cycle en température.

Tableau 18 : Propriétés thermiques de PCL iodées.

Echantillon	T_f (°C)	Tc (°C)	ΔH_f (J/g)
PCL	60	23	68
Iodo-PCL 2	47	8	30
Iodo-PCL 3	46	10	32

L'introduction d'un atome d'iode sur le squelette PCL entraîne des changements au niveau des propriétés thermiques du polyester. Les températures de fusion et de cristallisation ont des valeurs inférieures aux valeurs correspondantes pour PCL (environ 15°C de moins pour les deux). Le copolymère iodé est en outre moins cristallin qu'une PCL comme le prouvent les plus faibles valeurs de ΔH_f. La diminution de cristallinité été confirmée par diffraction des rayons X (taux de cristallinité de 50% pour la PCL contre 42% pour la PCL iodée).

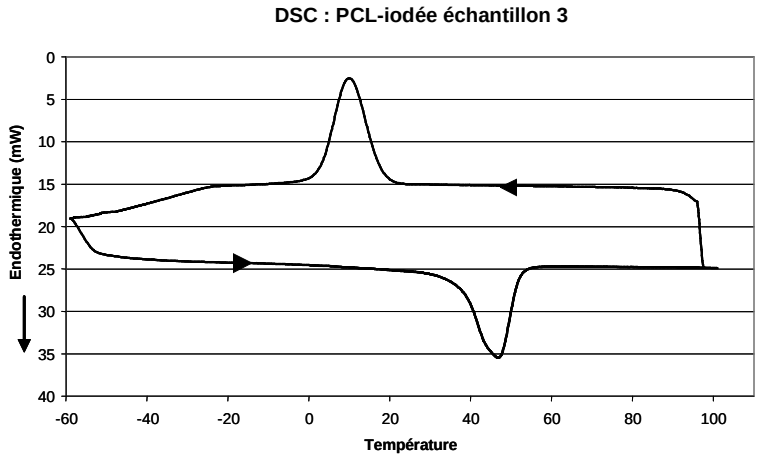


Figure 44 : Thermogrammes de montée et descente en température obtenus pour une PCL iodée lors du second cycle en température

- Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques ont été évaluées afin de vérifier si la modification du squelette affecte les caractéristiques d'une PCL. Les tests de compression et de traction ont été réalisés à 27°C (température ambiante) et à 38°C (≈ température physiologique) sur des plaques de copolymère soumises à une contrainte cyclique pour des fréquences comprises entre 15,2 et 500 Hz, la longueur de déformation imposée étant comprise entre 0,4 et 4 µm. Les éprouvettes ont été découpées dans des plaques de PCL commerciale ($\overline{M_n}$ = 42500) et de PCL iodée substituée à 14% moulées à chaud (100°C) sous pression (2.10^7 Pa) (longueur = 1,30cm, largeur = 5mm, épaisseur = 1,7mm).

La Figure 45 montre que le module de conservation (E') du copolymère iodé (13 MPa) est environ 6 fois plus faible que celui de PCL (60 Mpa). Dans un même temps, l'angle de perte reste relativement faible pour les deux types d'échantillons avec des valeurs allant de 1 à 10°, ce qui tend à montrer que le matériau est encore suffisament cristallin pour présenter un comportement élastique.

<u>Remarque</u> : (E' obtenu avec des contraintes dynamiques ≈ E obtenu par l'application de contraintes statiques de faibles intensités)

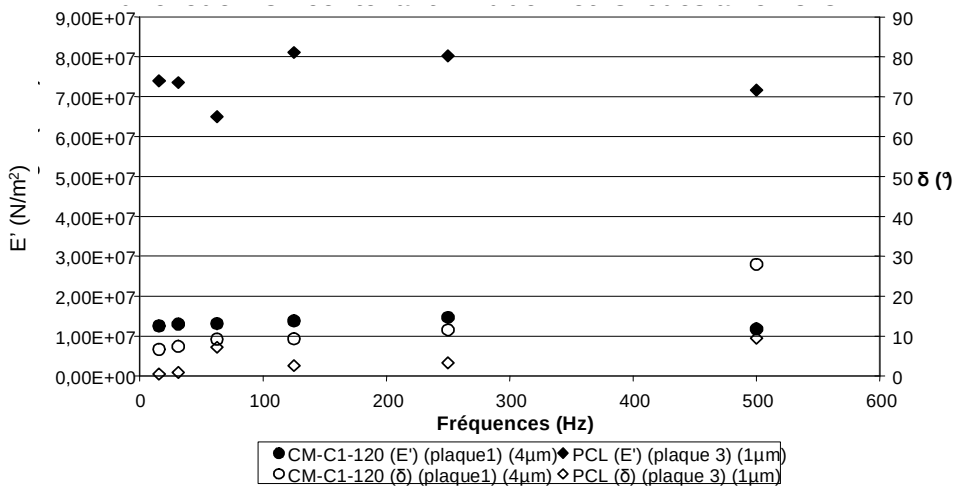


Figure 45 : Module de conservation (E') et angle de perte(δ) pour la PCL iodée à 14% et la PCL commerciale de départ

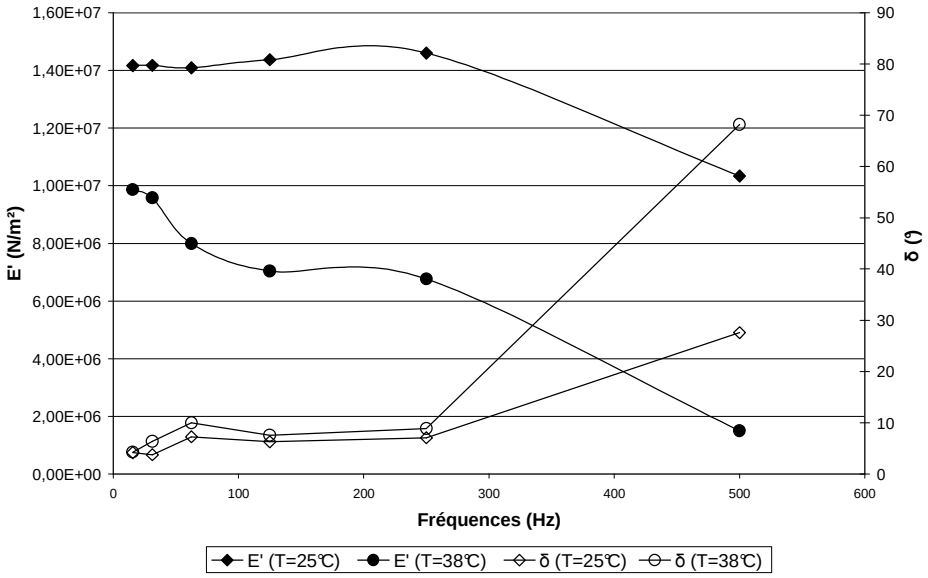


Figure 46 : Influence de la température sur le module de conservation (E)') et l'angle de perte (δ) d'une PCL-iodée à 14%

La Figure 46 illustre l'effet de la température sur le module actif et l'angle de perte de la plaque de PCL iodée à 14%. La même plaque a été utilisée pour les deux températures testées. Le module de conservation se trouve divisé par un facteur 1,5-2 lorsque la température passe de 25 à 38°C.

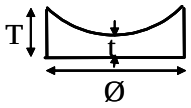
➢ Radio-opacité

Outre les possibilités de substitution de l'atome d'iode, un second intérêt potentiel d'une PCL iodée a émergé lors d'une étude bibliographique rapide sur les composés iodés à savoir leur radio-opacité intrinsèque. La synthèse d'un polymère radio-opaque présente un grand intérêt dans la visualisation d'implants synthétiques par simple radiographie X. Généralement le matériau est rendu radio-opaque par l'emploi d'additifs minéraux, en particulier des sels métalliques et des chélates[247-250]. Mais leur utilisation entraîne des problèmes : altération des propriétés mécaniques du matériau, toxicité des additifs vis-à-vis du milieu vivant[247-252], possibilité de relargage de ces additifs, d'où l'intérêt suscité par les matériaux polymères à radio-opacité intrinsèque, liée à la structure même des monomères utilisés. On peut en particulier citer les monomères de type acrylique porteurs de groupes aromatiques di- et triiodés[249,253-256] préparés en vue de leur utilisation dans des résines dentaires.

La radio-opacité été évaluée sur des pastilles obtenues par dissolution de 100 mg de polymère dans du chloroforme, puis évaporation du solvant. Les pastilles ont un diamètre de 11 mm et une épaisseur légèrement variable (Tab.19).

Tableau 19 : Dimensions des plaques de PCL et PCL-iodée radiographiée

Echantillon	Ø (mm)	T (mm)	t (µm)
PCL	11	2,45	620
PCL/Iodo-PCL (50/50 w:w)	11	2,09	370
Iodo-PCL	11	2,03	375



La radiographie de ces pastilles a été réalisée avec des paramètres d'irradiation de type radiographie dentaire. Ces conditions sont moins agressives que celles utilisées pour les radiographies osseuses "classiques".

a

b

c

Figure 47:Radiographie de PCL iodée

a) PCL (transparent),

b) mélange PCL/PCL iodée 50/50 (w:w),

c) PCL iodée.

(Pour les dimensions voir le tableau 16)

La Figure 47 montre que les pastilles contenant de la PCL-iodée, pure ou en mélange, possèdent une radio-opacité intrinsèque et que cette dernière est observée même pour des épaisseurs très fines, comme par exemple le centre de la pastille c. Une PCL substituée à hauteur de 10% en mole par de l'iode correspond à une PCL iodée à 11% en masse. Des auteurs ont montré qu'un matériau à base de poly(méthacrylate de méthyle) contenant 15% en mole d'iode est bien détecté[256]. Notre PCL iodée se trouve donc en limite basse de détection, cependant on observe une radio-opacité très nette du matériau susceptible d'être exploitable pour la localisation dans les milieux complexes.

- Dégradation hydrolytique

Afin d'estimer l'aptitude à la dégradation de ce nouveau copolymère, des plaques de PCL iodée ont été formées par évaporation de solution de polymère dans le chloroforme. La surface des plaques est d'environ 1 cm^2 avec une épaisseur de 610 µm.

Les plaques ont été individuellement immergées dans un tampon phosphate isoosmolaire à 37°C et à pH=7,4 afin de mimer les conditions *in vivo*. La dégradation a été évaluée en utilisant deux indicateurs:

i) L'absorption d'eau, qui reflète l'hydrophilie en masse du polymère, est définie par : $\frac{m_{d(t)} - m_{vd(t)}}{m_{d(t)}}$

où $m_{d(t)}$ est la masse du copolymère au temps t de dégradation après élimination de l'excès d'eau se trouvant en surface à l'aide d'un tissu absorbant, et $m_{vd(t)}$ est la masse du copolymère au temps t de dégradation après séchage sous vide poussé à 10^{-3} bar.

En utilisant cette définition, aucune absorption d'eau n'est constatée après 25 semaines pour la PCL iodée mais ce taux atteint 3% après 70 semaines ce qui est légèrement plus important que pour la PCL commerciale (0,5% d'eau en 60 semaines[67]). Ces résultats sont en accord avec les différences de cristallinité et d'hydrophobie entre les deux composés.

ii) La perte de masse des échantillons, qui reflète la libération dans le milieu de dégradation d'oligomères solubles issus de la dégradation du matériau, est définie comme suit: $\frac{m_{vd(t0)} - m_{vd(t)}}{m_{vd(t0)}}$ où $m_{vd(t)}$ est la même grandeur que celle définie ci-dessus et $m_{vd(t0)}$ est la masse du copolymère avant dégradation.

Aucune perte de masse significative n'est relevée pour la PCL après 60 semaines de dégradation[67] alors que 8% de perte de masse ont été mesurés pour les échantillons de PCL iodée après seulement 25 semaines et 13% après 70 semaines.

Les sous-produits de dégradation ont été étudiés par Electrophorèse Capillaire de Zone (ECZ). On note dans la solution de dégradation la présence d'un pic pouvant correspondre à des iodures ou des iodates. Deux hypothèses expliquent cette présence d'ions: soit de l'iode non lié au squelette se trouve pris dans l'enchevêtrement des chaînes et est libéré rapidement puis dismuté, soit la liaison C-I est rompue en cours de dégradation. L'utilisation d'un détecteur à barrette de diodes en sortie de colonne CES a permis de mettre en évidence le relargage d'iode initialement lié de manière covalente au squelette après 24 heures dans le THF comme nous le verrons dans le chapitre IV.

Les propriétés thermiques du copolymère dégradé sur une période de 25 semaines ont été évaluées par DSC. Comparées avec celles du produit de départ, les valeurs de Tf, Tc, et ΔHf ne sont pas affectées par la dégradation sur cette période de temps. Dans le même ordre d'idée, la composition du copolymère dégradé a été étudiée par RMN ^{1}H mais seul un changement minime de composition a été constaté avec un taux de substitution de 9,5% pour l'échantillon dégradé contre 11% pour le copolymère initial.

- Analyse visuelle de surface

Des clichés des plaques de PCL iodée utilisées pour les études de dégradation ont été pris avant et après 25 semaines de dégradation dans le tampon phosphate (Fig.48). En raison de la méthode de

préparation des plaques, une différence initiale d'aspect est constatée entre les deux surfaces que l'on définira comme suit :

- "v-surface", en contact avec le verre du récipient ayant servi à fabriquer les plaques de copolymère.
- "a-surface", en contact avec l'atmosphère environnante.

Les photos montrent les changements survenus sur les deux surfaces en cours de dégradation avec en particulier une modification plus importante de la rugosité de surface pour la v-surface. Ces changements comprennent l'apparition de trous, de porosité ainsi qu'une perte de coloration, celle-ci passant de marron à orangé. De tels changements ne sont pas observés pour des plaques de PCL commerciale. Cette étude visuelle de la dégradation des plaques de PCL-iodée est en accord avec les données de perte de masse. Il serait intéressant de doser I_2 ou HI pour vérifier ces aspetcs de décoloration.

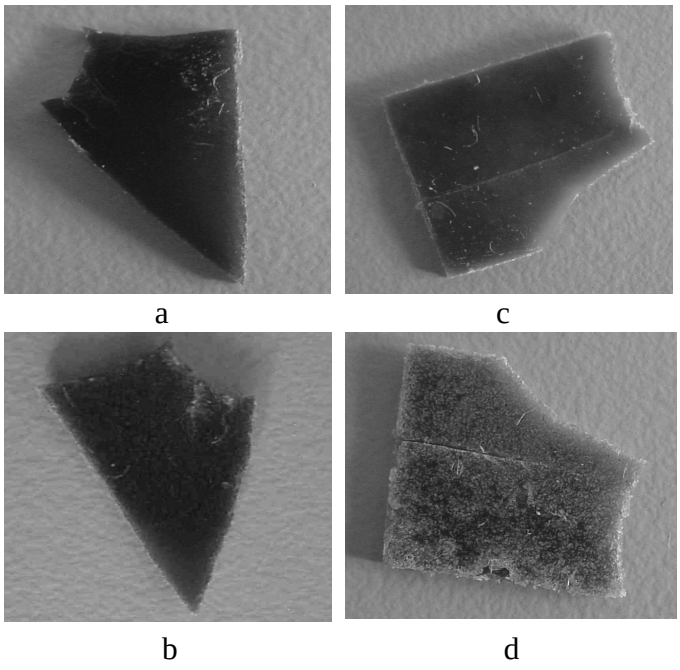


Figure 48 : a) a-surface t_0 ; b) a-surface à 25 semaines de dégradation in-vitro; c) v-surface t_0 ; d) v-surface à 25 semaines de dégradation in-vitro

iii. Conclusion

L'introduction covalente d'atomes d'iode sur le squelette PCL a été réalisée en utilisant la méthode de modification chimique par voie anionique du polyester dans les conditions standard en utilisant une solution d'iode dans le THF. Les taux de substitution atteints sont compris entre 10 et 25%.

La PCL iodée est un polyester aliphatique lentement dégradable, intrinsèquement radio-opaque, ne contenant pas d'additif radio-opacifiant et pouvant trouver des applications potentielles en imagerie.Ce nouveau type de matériau à base de PCL possède des propriétés intéressantes tant mécaniques que de

dégradation. Pour les premières, un comportement élastique et un module actif dynamique (E') plus faible que celui d'une PCL ont été trouvés (13-14 Mpa à température ambiante pour E'). Cette valeur peut être modulée en fonction des besoins par mélange de PCL et de PCL iodée. En ce qui concerne la dégradabilité, la vitesse de dégradation des PCL iodées semble plus grande que celle de la PCL avec en particulier une perte de masse de 10% environ après seulement 25 semaines. Il faut toutefois nuancer cette conclusion car les masses molaires des PCL iodées sont inférieures à celles des PCL utilisées pour les études de pertes de masses et cet écart pourrait être en partie responsable de la différence observée. Il faudrait en outre évaluer la quantité d'iode, liée ou non, qui est relarguée dans le milieu afin de déterminer la part relative de perte de masse du copolymère qui peut lui être attribuée. Son influence en terme de radio-opacité du matériau est également à vérifier.

c) Iodation d'une fonction allyle

Etant donné l'intérêt que représente la PCL iodée en tant que «synthon» et en tant que matériau radio-opaque, on s'est intéressé à la possibilité d'augmenter la teneur en iode du polyester. Une des méthodes envisageable est de synthétiser un dérivé acrylique di- ou triiodé analogue à ceux décrits dans la littérature[249,253-256] et de le polymériser de manière anionique en utilisant le macroamorceur $PCL^{\ominus}$. Cette voie n'a pas été prospectée étant donné que la synthèse du monomère iodé et sa purification représentent un travail secondaire par rapport aux objectifs de cette thèse.

On s'est donc tourné vers une réaction utilisant la grande réactivité des doubles liaisons vis-à-vis des halogènes. La perte de coloration d'une solution bromée lorsqu'elle est mise en présence d'un alcène constitue même un test classique de mise en évidence d'insaturations. L'idée est donc ici de substituer une PCL par un groupe porteur d'une double liaison puis d'additionner de l'iode sur cet intermédiaire. Cette démarche est analogue à celle décrite par Mecerreyes *et al.*[232] qui, après synthèse et polymérisation d'une ω-allyl-ε-caprolactone, ont fait réagir du dibrome sur le polymère et ont pu mettre en évidence la dibromation de la double liaison.

Dans notre cas, le macropolycarbanion $PCL^{\ominus}$ a été mis en réaction avec du bromure d'allyle pendant 1 heure à -50°C. Après dialyse dans le DMSO et précipitation dans Et_2O, le copolymère a été caractérisé par analyse par RMN ^1H réalisée dans $CDCl_3$. Le spectre obtenu montre la coexistence de trois types de motifs : 60 % de motifs PCL non substitués, 20% de motifs PCL α-allylés (signaux à 2,4 ; 5,0 et 5,5ppm) et 20% de motifs appartenant à des chaînes polyvinyliques issues de la polymérisation du bromure d'allyle (massifs à 1,5 ; 1,8 et 3,6 ppm).

Cet intermédiaire a ensuite été mis à réagir avec une solution d'iode. L'analyse par RMN ^1H a permis d'identifier les signaux caratéristiques du squelette diiodé, les intégrations relatives indiquant que la réaction est quantitative.

Bien qu'elle s'accompagne d'une réaction secondaire de polymérisation du bromure d'allyle, cette synthèse permet d'obtenir un polyester fortement iodé (40% molaire) pouvant trouver des applications dans les domaines précités. Une optimisation des conditions de réaction devrait permettre de diminuer l'importance de la réaction secondaire de polymérisation mais n'a pas fait l'objet d'une étude plus poussée dans le cadre de cette thèse.

6) PCL carbanionique en tant qu'agent nucléophile : conclusion

L'utilisation du macropolycarbanion en tant que réactif nucléophile mis en jeu dans des réactions de substitution nucléophile sur petites molécules permet d'introduire des groupes de natures diverses sur le squelette d'une PCL commerciale. A condition de se limiter à des fonctions protégées et non chargées afin de s'assurer un travail en milieu homogène sans réaction secondaire, il est possible d'obtenir des copolymères à base PCL porteurs de fonctions amine, alcool et même acide carboxylique. Un dérivé iodé a également été préparé et caractérisé afin d'évaluer son intérêt en imagerie RX ou en tant que synthon pour une suite de réactions utilisant la fragilité de la liaison carbone-iode.

Il faut cependant noter que la plupart des copolymères synthétisés ne présente qu'un taux relativement faible de substitution, compris entre 0 et 20%, ce qui est suffisant pour hydrophiliser la PCL de manière sensible, mais insuffisant pour la rendre soluble en milieu aqueux. Nous avons montré que les conditions de température et de durée de la réaction expliquent pour une grande partie le faible taux de substitution, mais leur modification dans un sens favorable à la substitution est néfaste pour le squelette polyester en terme de coupures de chaînes et de réactions secondaires (cas du chlorure de bromoacétyle). La stratégie de cationisation / amphotérisation de la PCL fondée sur la voie «macromolécule nucléophile » doit s'accompagner d'une étude au cas par cas pour chaque réaction ultérieure impliquant un nouveau réactif. Une telle stratégie est peu propice à la génération d'une diversité moléculaire importante. C'est la raison pour laquelle nous avons préféré aborder la voie « macroamorçage ».

CHAPITRE III

MACROAMORCAGE DE POLYMERISATION ANIONIQUE A PARTIR DU MACROPOLYCARBANION PCL$^{\Theta}$

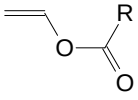
Le but de notre recherche étant la synthèse de copolymères greffés amphiphiles, de nombreux greffons cationisables et/ou hydrosolubilisants ont été considérés. On s'est en particulier intéressé à trois familles, les greffons polyvinyliques, les greffons polyacryliques et les greffons issus de la polymérisation de dérivés cycliques, la polymérisation des monomères correspondants étant amorcée par le macropolycarbanion PCL$^{\ominus}$.

I. Dérivés vinyliques :

Bien que cette classe de monomères soit rarement décrite comme étant polymérisable par voie anionique, nous l'avons retenue car elle permet d'introduire des fonctionnalités sur le squelette PCL tout en conservant un certain caractère dégradable. En effet, les dérivés de type poly(alcool vinylique) ou poly(vinyl pyrrolidone), par exemple, sont connus pour leur biocompatiblité et leurs propriétés hydrosolubilisantes mises à profit dans de nombreuses préparations galéniques. Le fait que ce type de monomère polymérise mal par voie anionique n'est pas un facteur limitant dans notre cas puisqu'il est intéressant de greffer de nombreux chaînons courts sur le squelette PCL afin de profiter de leur caractère hydrosolubilisant tout en assurant une bioexcrétion reposant sur les faibles masses molaires des chaînes vinyliques hydrosolubles non dégradables.

La préparation du macropolycarbanion amorceur a été réalisée dans les conditions classiques décrites dans le chapitre précédent avec en particulier des conditions de températures identiques. Les différences résident dans l'emploi d'un nombre d'équivalents de LDA inférieur (0,3-0,35 équivalent / motif ε-caprolactone) pour éviter l'homopolymérisation des monomères, et un nombre d'équivalents de monomère plus important (2 équivalents / motif ε-caprolactone) pour favoriser la propagation. Enfin la durée de l'étape 2 de la réaction (Fig.32) a été fixée à 2 heures au lieu de 30 minutes habituellement, pour augmenter le taux de conversion. Ces conditions ont été utilisées pour tous les monomères testés, qu'ils soient vinyliques ou non.

1) Acétate et pivalate de vinyle



R = Me ou *t*Bu

L'acétate de vinyle est le premier composé vinylique étudié car il est possible de passer au poly(alcool vinylique) (PVA) par simple hydrolyse de l'acétate et profiter ainsi d'un nombre important de fonctions hydroxyle hydrosolubilisantes et réactives, disponibles pour des modifications ultérieures.

Après plusieurs tentatives de synthèse, il est apparu nécessaire de modifier les conditions classiques de traitement du milieu réactionnel afin d'améliorer les rendements et de s'affranchir des problèmes dus à la fragilité de la liaison ester comme au caractère amphiphile de la structure formée par hydrolyse

incontrôlée des groupes acétate. En particulier, les conditions d'hydrolyse ont dû être adoucies et l'étape d'extraction remplacée par un simple lavage afin d'éviter la formation d'émulsions stables.

Quelles que soient les conditions utilisées, un produit insoluble dans tous les solvants a été obtenu, probablement un copolymère partiellement réticulé dont la caractérisation est difficile. Un spectre IR du produit sous forme pastille de KBr a permis de confirmer la présence des signaux caractéristiques de PCL (1734 cm^{-1}) et du poly(acétate de vinyle) (796cm^{-1}) ainsi que la présence d'un pic large vers 3500 cm^{-1} dû au PVA. Une température de fusion à 51 °C et de cristallisation à 10°C ont été mises en évidence (60°C et 25°C pour la PCL commerciale). Le polymère est donc partiellement réticulé mais présente des domaines semi-cristallins.

Afin d'évaluer de manière plus précise sa composition, le copolymère a été dégradé à température ambiante dans le TFA(d) . Après 3 mois passés dans ce milieu, le copolymère est devenu soluble dans le tube de RMN et une analyse en composition a pu être réalisée. Les signaux caractéristiques de la PCL (3,90 ; 2,20 ; 1,40 ; et 1,15 ppm) sont visibles sur les spectres RMN^{1}H et leurs intensités ont pu être comparées à celles des signaux de l'acétate et du PVA (5,10 et 1,65 ppm) issus de l'hydrolyse des motifs PVAc. Les intégrations correspondent à une composition molaire de 86 % de PCL et 14% de motifs polyvinyliques dont 57% sont sous forme acétate en fin de réaction (Fig.49). Les rendements molaires partiels de polymérisation sont définis comme suit :

- pour les monomères il s'agit du rapport entre le nombre de mole de motifs polymérisés sur le nombre de mole de monomères introduit.
- pour PCL, il s'agit du rapport entre le nombre de mole de motifs caproïques récupérés dans le copolymère sur le nombre de motifs caproïques contenus dans la PCL de départ.

En utilisant ces définitions, on remarque que la polymérisation anionique de l'acétate de vinyle à partir du squelette PCL$^{\Theta}$ est possible mais que le rendement de polymérisation est faible puisqu'il n'est que de 7% contre 82% pour le rendement en PCL.

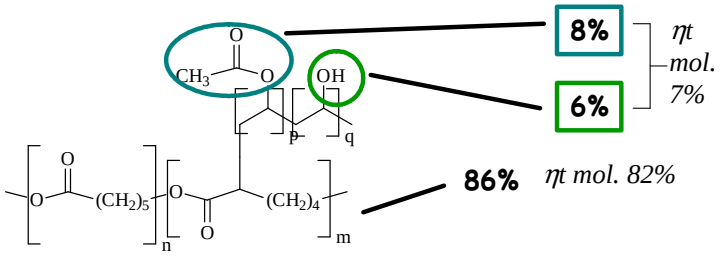


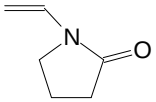
Figure 49 : Terpolymère PCL-g-(PVAc-co-PVA)

La polymérisation s'accompagne, en plus de l'hydrolyse, d'une réticulation partielle. Ces deux réactions confèrent une grande affinité pour les solvants organiques. Un test rapide a montré que du toluène peut être extrait de l'eau par simple mise en contact et agitation entre les phases liquides et le terpolymère PCL-*g*-(PVAc-*co*-PVA) précédemment décrit.

La stratégie précédente a été appliquée au pivalate de vinyle, choisi en raison du fort encombrement stérique de l'ester qui favorise l'hydrolyse simultanée des groupes pivalate et conduit directement à un copolymère PCL-*g*-PVA. Aucun gel ne s'est formé en cours de traitement alors qu'on s'y attendait compte tenu des structures amphiphiles visées. La caractérisation par RMN ^{1}H n'a pas fait apparaître de signaux de PVA mais un singulet à 1,15 ppm caractéristique du poly(pivalate de vinyle) (PPV). La comparaison des intégrations relatives des signaux indique une composition molaire de 7% de motifs PPV et 93% de PCL.

Comme pour l'acétate de vinyle, le rendement molaire du monomère pivalate de vinyle est faible (< 5%) et cette réaction n'a pas été étudiée d'avantage car la teneur en greffons PPV est très insuffisante pour espérer une hydrosolubilisation du squelette PCL. De tels copolymères peuvent cependant présenter un intérêt dans le cadre d'une post-modification sur les fonctions hydroxyle.

2) <u>N-Vinylpyrrolidone</u>



Le squelette PCL$^{\Theta}$ a été utilisé pour réaliser une structure originale greffée de type PCL-*g*-P(N-VP) (Fig.50). La polymérisation anionique de ce composé vinylique a déjà été rapportée[257,258]. Les conditions de polymérisation retenues sont celles décrites précédemment et deux fractions ont été isolées en fin de réaction. La première, obtenue par précipitation dans le méthanol, correspond à de la PCL non susbtituée. La seconde a été récupérée par évaporation de la phase méthanol, précipitation dans l'éther et lavage à l'heptane. Les spectres IR et RMN ^{1}H ont permis d'identifier cette fraction comme étant le copolymère attendu (signaux de P(N-VP) à 3,65 ; 3,45 ; 2,5 ; 2,0 et 1,85 ppm). Sa composition molaire est de 21% de P(N-VP) et 79% de PCL et sa masse molaire en nombre $\overline{Mn}$ = 4500 g/mol avec une polymolécularité importante (Ip = 3,2). Cette valeur, obtenue par analyse CES en milieur THF, est à considérer de manière critique étant donné le caractère amphiphile du copolymère. Ce dernier forme un gel en mileu aqueux.

En ne considérant que cette fraction substituée, le rendement molaire en PCL est de 25% et de 5% pour la N-VP. Mais contrairement aux deux premières réactions il serait intéressant de mener une étude plus poussée de la réaction afin d'augmenter le rendement car le produit obtenu présente un intérêt double :

- la formation d'un hydrogel potentiellement dégradable et biocompatible
- la possiblité de générer une structure amphotère par ouverture acido-catalysée du cycle pyrrolidone en sachant que la PCL résiste assez bien à ce type de traitements (cf . PCL-g-PLL et analyse dans le TFA III-3-e) (Fig.50)

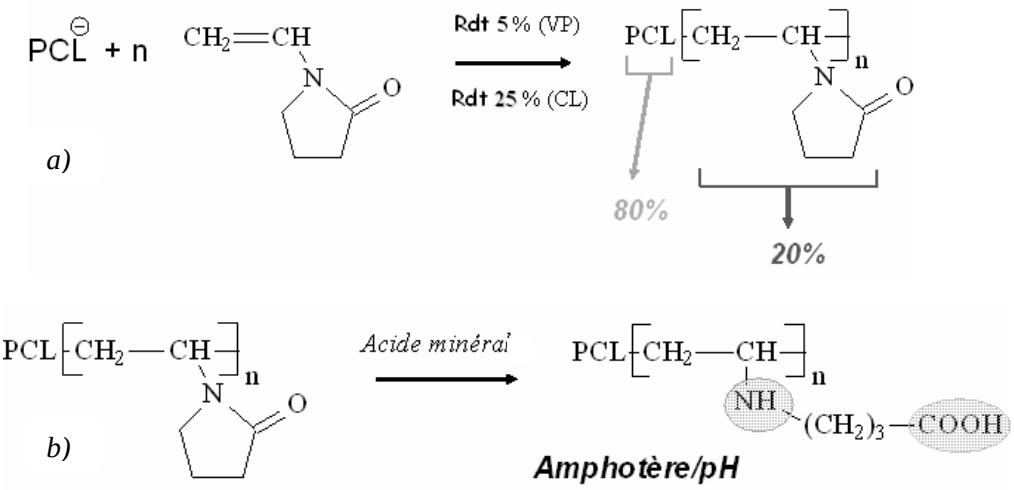
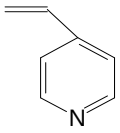


Figure 50 : Copolymère PCL-g-P(N-VP) a) synthèse b) potentialité

3) <u>4-Vinylpyridine :</u>



Ce monomère fonctionnel et son isomère 2-vinylpyridine, tous deux porteurs d'une amine tertiaire, sont eux aussi largement décrits dans la littérature. Leur caractère basique faible leur permet d'exister sous une forme protonée dans une large gamme de pH ce qui ouvre aux polymères qui en dérivent les applications classiques de polyélectrolytes cationiques. On trouve en particulier des applications dans les domaines des adhésifs, dans la coloration de fibres acryliques et dans tous les domaines où un caractère amphotère ou cationique est souhaité (échange d'ions, traitements anti-bactériens)[258]. Plus récemment des structures à base de poly(vinylpyridine) (PVP) ont été mises en jeu pour des transfections de gènes[259].

a) <u>Polymérisation anionique</u>

Comme pour la pyrrolidone, la polymérisation anionique de la 4-vinylpyridine amorcée par le butyllithium a été décrite dans la littérature[258]. Deux essais ont été réalisés avec des conditions de température et de traitements légèrement différentes (Tab.20)

Tableau 20 : Caractéristiques des copolymère PCL-g-PVP synthétisés

Essai	**Qté initiale de PCL**	**T**(°C)	**Fractions et masses**	**% PCL / PVP**	**Rdt.global PCL / PVP**	**Mn** (g/mol) **/ Ip**	**Tf / Tc** (°C)
1	2 g	[-70 ; -50]	F1 = 2,8g	50 / 50	87 / 74	9100 / 2,0*	51 / 17
			F2 = 1,6g	15 / 85		25 500 / 1,1*	Tg 106
2	6 g	[-40 ; -20]	F3 = 7,5g majoritaire	12 / 88	23 / 67	/	/

* *solubilité médiocre des copolymères dans le THF*

On constate tout d'abord que la température utilisée pour les deux étapes de réaction, la formation du macropolycarbanion et la polymérisation, a une influence importante sur la composition des fractions isolées ainsi que sur leurs poids relatifs. Lorsqu'une température plus élevée est utilisée (2ème essai) les fractions majoritaires récupérées sont soit très riche en PCL soit très riche en PVP. La composition intermédiaire, la plus intéressante en terme d'amphiphilie, ne représente qu'un produit minoritaire et n'a donc pas été étudiée.

Dans le cas où une température plus basse a pu être employée, on a retrouvé deux fractions, la fraction majoritaire étant alors composée d'un mélange équimolaire de PCL et de PVP (F1). Ces fractions ont été récupérées par précipitation directe dans l'eau, lavage du précipité à l'éthanol (F1) puis évaporation de cette phase et précipitation dans l'éther (F2). Les rendements molaires sont relativement élevés pour chacun des monomères avec 87 % pour la PCL et 74 % pour la PVP. En ce qui concerne les masses molaires, on remarque que le copolymère F1 (50/50) possède la plus large polymolécularité avec un indice de 2 et une masse molaire $\overline{Mn}$ = 9100 g/mol contre 1,6 et 34000 pour la PCL de départ. Ces résultats sont le signe de coupures et/ou d'un greffage important avec réarrangement conformationnel de la structure dans le THF. La fraction F2 de polymolécularité plus faible et de masse molaire plus élevée peut correspondre à un copolymère où la chaîne PCL a été peu substituée mais où la croissance des chaînes de PVP a été beaucoup plus importante. L'absence de fusion et de cristallisation et la transition vitreuse aux alentours de 106°C vont dans ce sens puisque l'homopolymère PVP présente une Tg à 140°C et ne possède de fusion que dans le cas où un polymère isotactique est obtenu.
Afin de confirmer ces hypothèses, nous avons dégradé le squelette PCL. Comme le montre la Figure 51, qui illustre l'hydrodispersabilité de la structure contenant 50% de chaque motif en milieu acide, le copolymère F1 semble être le plus intéressant en terme d'hydrosolubilisation et de balance hydrophile/hydrophobe et nous nous sommes donc intéressés à son étude et ses modifications.

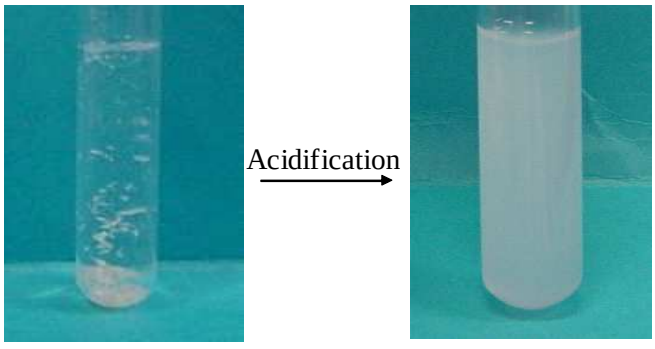


Figure 51 : Fraction F1 PCL-g-PVP (50/50) a) eau pH = 7 b) milieu acide pH = 2-3

b) Dégradation et étude structurale

Le copolymère F1 a été placé en milieu alcalin dans le THF. Après dégradation, la PVP a été récupérée par précipitation dans l'eau et des analyses par CES en milieux organique et aqueux ont été effectuées sur le polymère et la phase soluble. Par comparaison avec la masse molaire du copolymère non dégradé et en tenant compte de sa composition évaluée par RMN, une structure a été proposée. Le copolymère F1 se présente sous forme de peigne avec une chaîne principale PCL d'environ 41 motifs, greffée en moyenne par 8 greffons de 5 motifs de PVP (Fig.52).

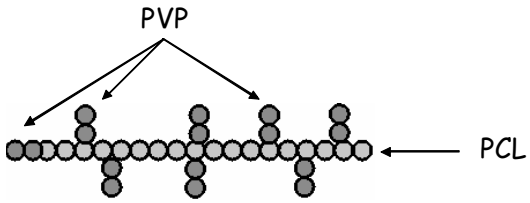


Figure 52 : Structure probable du copolymère PCL-g-PVP (50/50)

c) Quaternisation et hydrosolubilisation

Le copolymère PCL-*g*-PVP (50/50) n'est hydrodispersable qu'en milieu acide, lorsque les fonctions amine du cycle pyridine sont converties sous forme pyridinium (pKa du monomère à 5,6). Afin d'obtenir une hydrosolubilisation en milieu neutre, plusieurs voies ont été envisagées. La première consiste en une quaternisation de la structure par des réactions classiques utilisant l'iodométhane. La seconde est fondée sur l'hydrosolubilisation de la structure par des segments PEG greffés sur le copolymère après activation de la chaîne principale PCL d'une part et des greffons PEG d'autre part.

i. Quaternisation du copolymère PCL-g-PVP 50/50

La quaternisation a été effectuée en milieu DMF en présence de 10 équivalents d'iodométhane par groupe pyridine à une température d'environ 65°C. Après 24 heures de réaction, dialyse et lyophilisation, un solide cotonneux de couleur verte a été récupéré. Par rapport au copolymère de départ, les bandes caractéristiques des groupes ammonium ont été détéctées sur les spectres IR à 2760 et 2410 cm^{-1}. En RMN, les intégrations des résonances caractéristiques de la PCL sont comparées à celles des résonances des protons du pyridinium. On se sert en particulier des signaux à 4,2 ppm du méthyl de l'ammonium et aux signaux à 8,5 et 7,6 ppm des protons du cycle quaternisé, décalés par rapport à ceux du cycle pyridine (8,2 et 6,4 ppm). Ces résultats reflètent une quaternisation quantitative et une composition globale inchangée par rapport au produit de départ. Le rendement de réaction est de 90%.

L'analyse par DSC montre que le copolymère PCL-*g*-PVP quaternisée (notée PCL-*g*-PVP^{+}) est très peu cristallin avec une température de fusion à 46°C, inférieure à celle de la PCL et de la PCL-*g*-PVP, et un taux de cristallinité faible mais inchangé par rapport au copolymère précurseur (ΔHf de 8 J/g contre 44 pour la PCL). La plus grande différence concerne l'hydrosolubilité. La PCL-*g*-PVP^{+} est hydrodispersable spontanément dans l'eau à pH neutre (Fig.52). Des CES effectuées dans l'eau et dans un mélange eau/méthanol (90/10, v :v), plus adapté au caractère amphiphile de la structure, ont montré l'existence d'un produit principal de masse molaire 2000-3000 g/mol et d'un produit secondaire aux alentours de 40-50000 g/mol. Ce dernier pic correspond vraisemblablement à la formation d'agrégats ou de nanoparticules en solution. Etant donné la nature différente des solvants utilisés pour les CES de la PCL-g-PVP+ et la PCL-g-PVP il n'est pas possible de comparer leurs masses molaires.

La formation d'agrégats a été confirmée par les résultats d'une étude de diffusion dynamique de la lumière par une solution à 10 mg/cm^3 de copolymère. Des nanoparticules d'un diamètre moyen de 75 nm monodisperses ont été détectées (Fig.53b). La quaternisation de la PCL-*g*-PVP aboutit donc à un copolymère comportant 50% de motifs hydrophobes formant la chaîne dégradable, et 50% de motifs hydrophiles. Cette composition permet d'hydrosolubiliser le polymère qui forme des objets de dimension nanométrique.

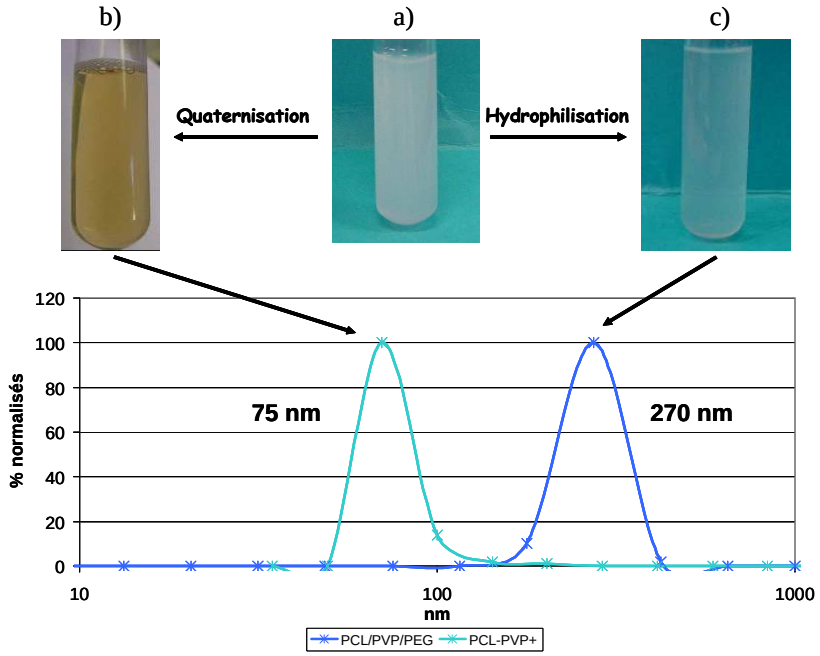


Figure 53 : Copolymères en solutions et caractérisation en diffusion dynamique de la lumière. a) Copolymère PCL-g-PVP (milieu acide) b) Copolymère PCL-g-PVP^{+} (eau pH=7) c) Terpolymère PCL-g-(PVP/PEG) (milieu acide)

ii. Hydrophilisation du copolymère PCL-g-PVP 50/50 :

Cette hydrophilisation non cationique a été réalisée par greffage de mono-méthoxyPEG de masse molaire 2000 g/mol. Ces chaînes ont été fonctionnalisées par un groupe bromoacétyle d'après la méthode décrite par Ponsart[57]. L'originalité de cette stratégie est de passer par une réactivation par le LDA de la chaîne principale PCL afin de faire réagir les carbanions formés sur les chaînes PEG activées. Les conditions de la réaction sont quasi identiques à celles utilisées classiquement pour les réactions de substitution sur la PCL décrites au chapitre II. La seule différence provient de l'utilisation de DMSO comme cosolvant pour aider à solubiliser le copolymère PCL-*g*-PVP. Le mélange de solvants est fait dans des proportions THF / DMSO (5 : 1).

Après un traitement rendu difficile par le caractère tensio-actif du produit synthétisé qui forme des émulsions relativement stables, le terpolymère a été isolé par précipitation dans l'éther, dialysé contre de l'eau (seuil de coupure 1000Da) et précipité par addition d'une solution basique permettant de fixer le pH à 10-11 valeur pour laquelle le produit précipite. Ce dernier a été caractérisé par RMN ^{1}H dans $CDCl_3$. La présence des trois types de motifs a pu être confirmée, en particulier par la présence d'un signal à 3,65 ppm caractéristique des segments PEG. La composition molaire du terpolymère a été évaluée à 65% PCL, 29% PVP et 6% de motifs PEG ce qui correspond à une chaîne de PEG greffée sur chaque copolymère PCL-*g*-PVP. On remarque que la teneur en PCL et PVP n'est plus équimolaire et que la réactivation du squelette PCL a entraîné une perte relative de motifs PVP. Cette perte a été confirmée par l'existence d'une seconde fraction, très minoritaire (5% en masse) et soluble en milieu aqueux basique, mais contenant 19% de PCL pour 75% de PVP et toujours 6% de PEG. On peut conclure que lors de l'activation anionique secondaire les coupures de la chaîne polyester se font préférentiellement au niveau des zones déjà substituées par les chaînons PVP. Les rendements spécifiques qui, pour l'ensemble de ces deux fractions, sont de 89% pour la PCL mais seulement 40% pour la PVP sont tout à fait en accord avec une perte préférentielle des motifs déjà substitués.

L'augmentation du pourcentage molaire de PCL dans le terpolymère se traduit, d'une part par une augmentation de la température de fusion par rapport au copolymère quaternisé (50°C contre 46°C), et par une enthalpie de fusion doublée (21 J/g) qui traduit un plus fort taux de cristallinité. En analyse par CES, on retrouve deux pics : un premier aux alentours de 5000 g/mol et un second, à l'exclusion totale, dû à la présence d'agrégats. Les nanoparticules correspondantes ont été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière et ont un diamètre moyen de 270 nm (Fig.53c).

On constate que malgré un pourcentage assez faible de motifs PEG introduits, l'hydrodispersion de la PCL-*g*-PVP est obtenue. Le terpolymère synthétisé représente une alternative non ionique à la structure amphiphile PCL-*g*-PVP^{+} et forme des objets de taille de légèrement supérieure mais toujours

nanométriques (270 nm contre 75 nm pour PCL-*g*-PVP^{+}). Ce nouveau composé montre qu'il est possible de réactiver les segments PCL pour introduire un autre type de substituant ou réamorcer une polymérisation par voie anionique à partir d'un copolymère déjà formé.

II. Dérivés acryliques :

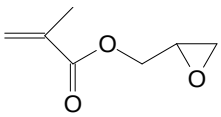
Le terme « acrylique » désigne ici l'ensemble des monomères possédant un carbonyl en α d'une double liaison ce qui englobe donc les dérivés acryliques, méthacryliques mais aussi leurs pendants acrylamides et méthacrylamides. Ces monomères sont commerciaux et existent sous de nombreuses formes, pour la plupart fonctionnalisées ou fonctionnalisables. Ils sont très largement utilisés dans les applications nécessitant des polyélectrolytes et plus particulièrement pour des détergents et des résines échangeuses d'ions. Bien que non dégradables, les polymères obtenus à partir de ces monomères trouvent naturellement leur place dans le cadre de notre recherche, à condition de garder à l'esprit que les structures copolymères synthétisées à partir des acryliques ne sont que partiellement dégradables.

On s'intéressera dans un premier temps aux esters acryliques avant d'illustrer le cas des acrylamides puis d'un macromonomère à base de PEG.

1) Dérivés acryliques :

Les conditions retenues sont celles décrites pour les dérivés vinyliques : un nombre d'équivalents égal à 0,3 pour le LDA et 2 pour le monomère par rapport aux motifs ε-caprolactone, une durée de l'étape de polymérisation (seconde étape), de 2 heures environ contre 30 minutes normalement.

a) Méthacrylate de glycidyle (GMA)



Ce monomère est intéressant car le groupe époxyde peut être mis en jeu dans des réactions de post-modification du copolymère afin de faire apparaître soit des fonctions alcool, soit des fonctions amine voire des groupes ammonium[104,105,260-263].

i. Polymérisation :

Dans les conditions de réaction définies ci-dessus, un copolymère PCL-*g*-PGMA a été obtenu avec de bons rendements alors qu'un essai préliminaire avec 1 équivalent de LDA avait abouti à la formation d'un gel et un rendement très faible.

Les rendements spécifiques pour chaque monomère sont élevés avec en particulier une polymérisation quasi-quantitative du GMA, signe que la propagation s'est produite de manière efficace dans le milieu. Ce résultat est intéressant en terme de mécanisme mais s'avère pénalisant en terme de dégradabilité du copolymère obtenu. La dégradabilité est en effet à nuancer car les segments dégradables PCL ne représentent plus que 25% de la structure. Ce pourcentage a été calculé à partir du spectre RMN ^{1}H de la Figure 54 qui montre qu'aucune ouverture du cycle époxyde n'a eu lieu dans les conditions de la polymérisation (température très basse).

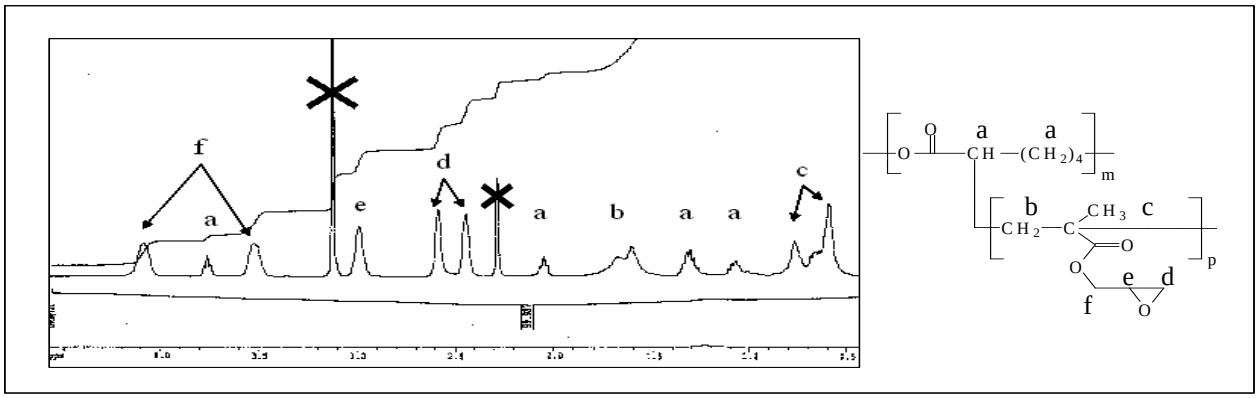


Figure 54 : RMN ^{1}H ($CDCl_3$) du copolymère PCL-g-PGMA

Le copolymère a une masse molaire 10 fois inférieure à celle mesurée pour la PCL de départ (Tab.21). Il faut noter ici que le copolymère PCL-*g*-PGMA s'est révélé difficile à solubiliser dans le THF, solvant de CES, ce qui a entraîné des problèmes de filtration des solutions avant injection. Le résultat obtenu correspond donc seulement à une fraction du copolymère. Nous ne le commenterons pas plus en l'absence d'une étude plus approfondie.

Tableau 21 : Caractéristiques physico-chimiques du copolymère PCL-g-PGMA

Produit	**% molaires PCL/PGMA**	**Rdt. spécifiques PCL/PGMA**	**Mn** (g/mol) **/ Ip**	**Tf / Tc** (°C)	**ΔHf** (J/g)
PCL	/	/	35500 / 1,6	61 / 23	50
PCL-*g*-PGMA	25 / 75	76 / 93	3400 / 1,2	48 / 21	5

La faible valeur de l'enthalpie de fusion ΔHf = 5 J/g, traduit une perte de cristallinité du copolymère par rapport à la PCL de départ. Cette perte était attendue étant donné la non cristallinité de l'homopoymère PGMA et la structure greffée du copolymère qui ne favorise pas les réarrangements des segments PCL. A titre de comparaison, en considérant que la cristallinité du copolymère n'est due qu'à la PCL, on peut estimer que l'enthalpie de fusion des segments PCL dans le PCL-*g*-PGMA ne serait que de 25 J/g de PCL contre 50 pour la PCL commerciale ce qui reflète la difficulté de réorganisation des chaînons PCL une fois greffés.

ii. Ouverture de l'époxyde

Le groupe époxyde peut être ouvert par un grand nombre de réactifs. On trouve par exemple des amines comme la diéthylamine[262], l'ethylène diamine[105] et l'ammoniaque[260], des diols[261] ou encore des composés halogénés permettant des quaternisations par réaction avec des amines tertiaires[261,263].

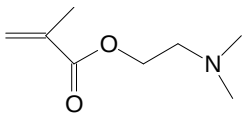
Plusieurs réactions de fonctionnalisation du copolymère PCL-*g*-PGMA ont été testées. Dans tous les cas, la fragilité des liaisons ester de la chaîne principale et la présence de réactions secondaires ont été observées. Parmi les réactions testées, citons :

- une réaction d'aminolyse inspirée de celle décrite par Smigol *et al.*[262], utilisant la diéthylamine comme solvant et un chauffage à reflux, a entraîné une coupure des liaisons ester de la PCL avec seulement une ouverture partielle de l'époxyde. La formation de fonctions amides et la disparition des esters du motif acrylate ont été mises en évidences par IR.
- une réaction d'aminolyse fondée sur la réaction décrite par Horak *et al.*[260] en milieu THF à 50°C pendant 9 heures et utilisant 10 équivalents d'ammoniaque par époxyde. Cette réaction a probablement entraîné une réaction secondaire de réticulation du copolymère car le produit récupéré était insoluble dans tous les solvants.
- un dernier essai d'hydrolyse du cycle par de l'acide sulfurique suivi du greffage d'un groupe bromoacétyle selon un protocole inspiré du travail de Kenawy *et al.*[261] a aboutit à une ouverture partielle du cycle après la première étape, puis à un nombre important de coupures et de réactions secondaires interdisant toute analyse du produit final.

Ces échecs ont motivé l'arrêt de ce type de réactions incompatibles avec la fragilité du squelette PCL. Il existe cependant un grand nombre de réactions décrites dont certaines sont suffisamment douces pour être utilisées avec le copolymère PCL-*g*-PGMA[258] mais nous ne les avons pas toutes testées dans le cadre de cette thèse.

Afin de s'affranchir des étapes de fonctionnalisation, la stratégie de polymérisation de monomères déjà fonctionnalisés et porteurs de groupes neutres vis-à-vis de l'environnement anionique a été abordée.

b) N,N-(α–Diméthylaminoéthyl)méthacrylate



Comme on l'a vu dans le paragraphe II, l'utilisation de dérivés ioniques en tant que réactifs n'est pas possible dans les conditions de réaction utilisées en raison de leur insolubilité dans le THF. C'est le cas de monomères cationiques classiques comme le méthyl sulfate de [2-(acryloyloxy)éthyl] triméthylammonium (ADAM quat). Afin de s'approcher de ce type de composé, on s'est intéressé à

un dérivé commercial équivalent mais porteur d'une amine tertaire à la place de l'ammonium, le méthacrylate de N,N-(diméthylaminoéthyl) (DMAEM = MADAM). L'intérêt de ce monomère réside dans la possibilité de quaternisation de l'amine tertiaire par divers agents alkylants et dans la protonation des groupes amine du polymère résultant en fonction du pH du milieu (pKb du polymère = 6,9)[258].

i. Polymérisation

Plusieurs copolymères ont été synthétisés dans des conditions de réactions globalement identiques, sauf en ce qui concerne le nombre d'équivalents de DMAEM (essais 1 à 3) ou de PCL (essai 4) utilisés et la température de l'étape de polymérisation (plus élevée dans l'essai 4). Ces variations ont entraîné la formation de copolymères de compositions différentes présentant chacun une balance hydrophile/hydrophobe spécifique. Chaque fraction isolée a subi un traitement propre succinctement décrit dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Synthèses et caractéristiques principales des fractions PCL-g-PDMAEM

Essai	**Qté. PCL** (g)	**Nbr. Eq. DMAEM**	**T. E2** (°C)	**Traitement**	**Fractions** (g)	**% mol. PCL et PDMAEM**	**Rdt mol. PCL et DMAEM**	**Mn** (g/mol) **et Ip**	**Tf/Tc** (°C)	**ΔHf** (j/g)
1	4	1,5	-55	H.I. ; E.C. ; P.C.	F1 = 9,5 non sec	80 / 20	/	27400 2,0	58 / 28	32
2	4	2,5	-65	H.C.; E.C.; Em.; P.C.+ addit° HCl **F2** puis C. **F3**	F2 = 1,8	80 /20	62 et 82	15400 2,8	51 / 7	34
					F3 = 1,8	70 / 30		/	49	/
3	4	5	-65	H.C.; E.C.; Ev. reprise ds Et_2O : - **F6** sol. ds Et_2O - **F4** insol. ds Et_2O et ds H_2O - **F5** insol. ds Et_2O sol. ds H_2O	F4 =3,0	80 / 20	100 et 42	6300 2,9	/	/
					F5 = 5,0	0 / 100		1500 1,0	/	/
					F6 = 7,5	30 / 70		1650 1,0	/	/
4	6	2,5	-35	H.C.; E.O.; Em.; Ev.S; P.C. **F7**, surnageant Ev. repris acétone + HCl et C. **F8**	F7 = 2,9	60 / 40	55 et 100	/	/	/
					F8 = 24,0	10 / 90		5500 1,5	/	/

H.C. : Hydrolyse classique et H.I. : Hydrolyse inverse (cf. partie expérimentale)
E.C. : Extraction classique (CH_2Cl_2 puis H_2O) et E.O. : Extraction organique (CH_2Cl_2)
Em. : Emulsion cassée à l'éthanol
Ev. : évaporation à sec du milieu (évaporation de la phase organique)
P.C : Précipitation classique dans MeOH (précipitation de la phase organique)
C. : Centrifugation et D. : Dialyse

L'analyse des polymères obtenus par CES a été effectuée dans le THF ou dans un mélange eau/méthanol (90 :10 ; v :v) en fonction de la solubilité de la fraction étudiée.

D'après les résultats rassemblés ci-dessus, l'augmentation du nombre d'équivalents de monomère DMAEM ne permet pas de contrôler la composition finale du copolymère. En effet, en passant de 1,5 à 2,5 équivalents par motifs PCL, la composition varie de 80/20 à 70/30 (PCL/PDMAEM) mais pour une partie seulement du copolymère. L'essai 3 qui utilise 5 équivalents confirme cette constatation puisque l'accroissement de la proportion de DMAEM entraîne l'apparition de fractions très pauvres en PCL, voire d'homopolymère PDMAEM (F5). L'augmentation de la température de polymérisation a le même effet avec une tendance à former des fractions riches en DMAEM (F8). On remarque également que l'augmentation du nombre d'équivalents de DMAEM s'accompagne d'une diminution de la masse molaire moyenne en nombre comme semble l'indiqué la comparaison des trois fractions F1, F2 et F4. Cette constatation pourrait s'expliquer par la nature du monomère qui possède une fonction amine pouvant réagir avec les groupes esters du squelette PCL. Il faut toutefois noter que ce type de réaction n'est pas favorisé par les basses températures de réaction utilisées.

Les rendements sont variables en fonction des conditions avec pour la PCL, comme pour le DMAEM, des valeurs comprises entre 50 et 100%. Le rendement le plus faible de polymérisation du DMAEM correspond à l'essai pour lequel la plus grande quantité de monomère a été utilisée. Des réactions secondaires de type transfert au monomère conduisant à des oligomères d'homopoly(DMAEM) non isolés se produisent probablement.

Malgré les problèmes de fractionnement en composition, il faut noter que la synthèse de copolymère PCL-*g*-PDMAEM donne accès à des structures amphiphiles organosolubles pour des teneurs de 60 à 80 % en PCL, et hydrosolubles lorsque le copolymère contient plus de 70% de DMAEM.

ii. Dégradation et étude structurale

Des fractions riches en PCL étant obtenues le plus fréquemment, une dégradation partielle du copolymère F1 (80/20) a été réalisée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le copolymère PCL-*g*-PVP afin d'évaluer la longueur des chaînons PDMAEM. Si on suppose que les rayons hydrodynamiques du copolymère et du PDMAEM sont voisins et que les masses molaires obtenues par CES dans le THF sont proches des masses molaires réelles, la dégradation de la chaîne principale PCL et l'analyse en CES des chaînons PDMAEM restants permet de proposer une structure de type T ou « quasi-dibloc » pour le copolymère (Fig.55). La chaîne principale PCL de la fraction F1 a un dégré de polymérisation en nombre $\overline{DPn}$ de 105 et est greffée en moyenne par une chaîne DMAEM de $\overline{DPn}$ 22. Cette chaîne relativement courte ne permet pas l'hydrosolubilisation du copolymère en milieu aqueux neutre. Une solubilisation partielle est toutefois observée en milieu acide à bas pH.

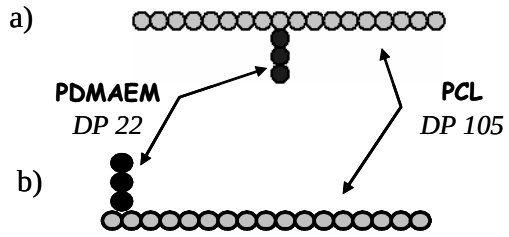


Figure 55 : Structures probables du copolymère PCL-g-PDMAEM (F1) (80/20) a) architecture de type greffée b) architecture à rapprocher d'un dibloc

Afin de rendre ce type de copolymère hydrosoluble, nous avons réalisé la quaternisation des fractions les plus riches en PCL.

iii. Quaternisation

L'homopolymère PDMAEM possède un pKb de 6,9, ce qui signifie qu'à pH neutre le copolymère n'est que très partiellement protoné. Pour des proportions élevées de DMAEM la protonation et le caractère hydrophile du PDMAEM suffisent à hydrosolubiliser le copolymère. Sur les copolymères majoritaires en PCL, la quaternisation des chaînons méthacryliques a été effectuée. Les conditions utilisées sont proches de celles décrites pour la PCL-*g*-PVP : solvant DMF, température de 65°C, durée de réaction 24h. Seul le nombre d'équivalents d'agent alkylant iodométhane a été augmenté avec 50-100 équivalents par fonction amine tertiaire. Trois polymères ont été quaternisés puis caractérisés en solution à 10 mg/cm^3 par CES aqueuse et diffusion dynamique de la lumière (Tab.23 ; Fig.56). La quaternisation est dans tous les cas quantitative comme le montrent les spectres de RMN ^{1}H effectuée dans D_2O ou DMSO(d_6). La quaternisation se traduit par un changement de déplacement chimique qui passe de 2-2,5 ppm (en fonction du solvant) pour le signal des groupes méthyle des fonctions amine tertiaire à 3-3,25 ppm pour les groupes méthyle des fonctions ammonium.

Tableau 23 : Caractéristiques des copolymères PCL-g-PDMAEM quaternisés

Essai de quaternisation	**Composition du copolymère de départ**	**Composition du copolymère quaternisé**	**Mn** (g/mol)*	**Ø moyen en nombre** (nm)*
1	80 / 20	80 / 20	2000	123
2	80 / 20	80 / 20	1400	90
3	70 / 30	45 / 55	1300	64
4	60 / 40	50 / 50	/	/

** CES et diffusion dynamique de la lumière effectuées en milieu aqueux à pH neutre*

La taille des nanoparticules obtenues est directement liée à la composition du copolymère avec un repli d'autant plus important de la structure que la teneur en DMAEM est importante. Il n'est cependant pas possible de conclure car le nombre de points à notre disposition est faible. De plus, les

architectures exactes ne sont pas connues (dibloc, mono- ou multi-greffage), hormis pour le copolymère 1 (F1).

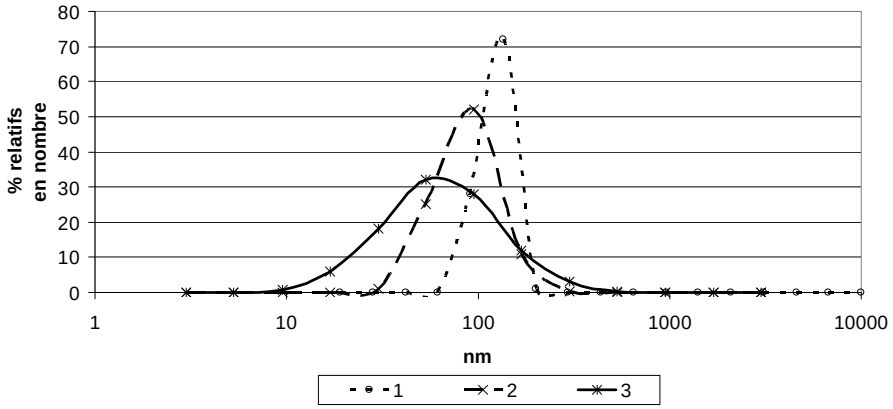


Figure 56 : Distribution en nombre des diamètres des nanoparticules formées en solution par auto-organisation des copolymères PCL-g-PDMAEM^{+}

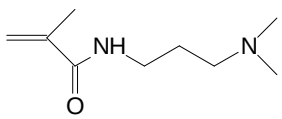
On peut néammoins conclure que la polymérisation par macroamorçage anionique du monomère DMAEM permet d'obtenir des structures cationiques et hydrosolubles greffées à chaîne principale PCL ce qui est novateur par rapport aux structures inverses décrites dans la littérature et en particulier le copolymère PDMAEM-*g*-PCL synthétisé par Mespouille *et al*.[208]

2) Dérivés acrylamides

Nous nous sommes ensuite intéressés à la réalisation de structures greffées à chaînes latérales acrylamide. Les polymères porteurs de groupes amide primaire sont généralement très hydrosolubles et il existe un grand nombre de monomères commerciaux. Deux monomères ont été utilisés, l'un N-monosubstitué, l'autre N,N'-disubstitué.

Dans un cas comme dans l'autre, la polymérisation par voie anionique de ces composés est décrite dans la littérature[264] même si les mécanismes mis en jeu sont différents. Pour les acrylamides N-monosubstitués, la polymérisation passe par un transfert d'hydrogène avec dans la plupart des cas une dimérisation puis une condensation, alors que dans le cas de dérivés N,N'-disubstitués la propagation se fait par attaque directe de la double liaison.

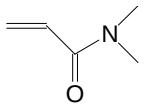
a) [(N,N'-diméthyl)aminopropyl]-méthacrylamide



Ce monomère N-monosubstitué, noté DMAPMA, a été polymérisé dans les conditions classiques en présence du macroamorceur PCL$^{\ominus}$ en faisant varier le nombre d'équivalents et la température du milieu de polymérisation.

Comme on pouvait s'y attendre, la quasi-totalité du monomère méthacrylamide homopolymérise suite à l'extraction de l'hydrogène de l'amide secondaire par le macropolycarbanion qui est ainsi inactivé. Seule une fraction minoritaire réagit par ouverture de la double liaison et conduit à la formation d'un copolymère PCL-*g*-PDMAPMA dont l'analyse par RMN ^{1}H a montré qu'il est composé à 95% de PCL et 5% de motifs méthacrylamide. Ce copolymère n'étant qu'un produit secondaire, le composé N-monosubstitué a été abandonné au profit du monomère amide tertiaire.

b) <u>N,N'-diméthylacrylamide</u>



Un seul essai a été effectué pour lequel la polymérisation a été réalisée dans les conditions classiques à partir du macropolycarbanion PCL$^{\Theta}$. Le traitement classique par hydrolyse et extraction au dichlorométhane a entraîné la formation d'émulsions stables et a donc nécessité de passer par des étapes de démixion ou « salting out » au NaCl et des traitements des différentes phases par lavage au dichlorométhane et/ou à l'éthanol. Ces traitements ont permis d'extraire des phases organiques un solide se présentant sous la forme d'une poudre blanche. Ce solide a été purifié par dialyse en milieu aqueux ce qui a permis d'isoler deux copolymères en quantités égales après centrifugation de l'hydrodispersion contenue dans le tube de dialyse. Le premier, localisé dans le culot de centrifugation, était partiellement soluble et hydrodispersable (F1). Le second, totalement hydrosoluble a été isolé par lyophilisation du surnageant (F2).

Les caractéristiques de ces deux fractions sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 24 : Copolymères PCL-g-PDMA

Fraction	% molaire		Mn (g/mol)	Ip	Tf/Tc (°C)	ΔHf (J/g)	Solubilité			Rdt.molaire PCL et PDMA
	PCL	PDMA					Eau à pH		THF	
							7	2-3		
F1	50	50	18000	2,8	55 / 17	19	-	±	±	59 et 76 %
F2	10	90	39000	2,1	/	/	+	++	±	

<u>Remarque</u> : les CES ont été effectuées dans le THF qui n'est pas un bon solvant des structures synthétisées, les résultats sont donc à considére comme indicatifs.

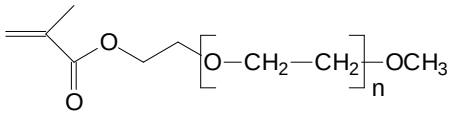
Le rendement de polymérisation du DMA est d'environ 80% par rapport au monomère introduit. La différence de composition, et de solubilité, entre les deux fractions sont le résultat d'une longueur de chaîne plus importante sur le produit F2. En effet, la masse molaire mesurée est deux fois plus élevée pour ce dernier.

La fraction F1 ayant une composition équimolaire en motifs hydrophiles et hydrophobes, son aptitude à former des objets colloïdaux en milieu aqueux a été évaluée. Une solution aqueuse à 10 mg/cm^3 et à pH 2 a été étudiée par diffusion dynamique de la lumière. Cette solution n'est pas limpide et on note

l'absence d'objets de petite taille. Seule une population ayant un diamètre moyen de l'ordre du micron est observée. Il est probable que ces objets sont des particules pluri-macromoléculaires dont le cœur est formé par les squelettes hydrophobes PCL environnés d'une couronne hydrosolubilisante de PDMA.

Cet essai montre qu'un choix judicieux du monomère, qui doit être porteur d'un amide tertiaire, permet d'obtenir des structures de type polyester-*g*-poly(acrylamide) partiellement hydrodispersables et formant spontanément des structures agrégées de grande taille et dispersées dans l'eau.

3) <u>Macromonomères méthacrylate de PEG :</u>



La polymérisation de macromonomères à base de PEG a été envisagée comme alternative au greffage de monométhoxy-PEG activé. Comme on l'a vu au paragraphe I-3-c, les segments PEG greffés au squelette PCL sont très hydrophilisants, même pour des proportions faibles. En se servant de la bonne polymérisabilité des doubles liaisons méthacrylique vis-à-vis de la PCL$^{\Theta}$, le macroamorçage de monométhoxy-méthacylate-PEG (MAPEG) devait permettre d'obtenir un taux de motifs éthylène glycol beaucoup plus important que celui obtenu par substitution, et donc d'atteindre l'hydrosolubilité recherchée (Fig.57).

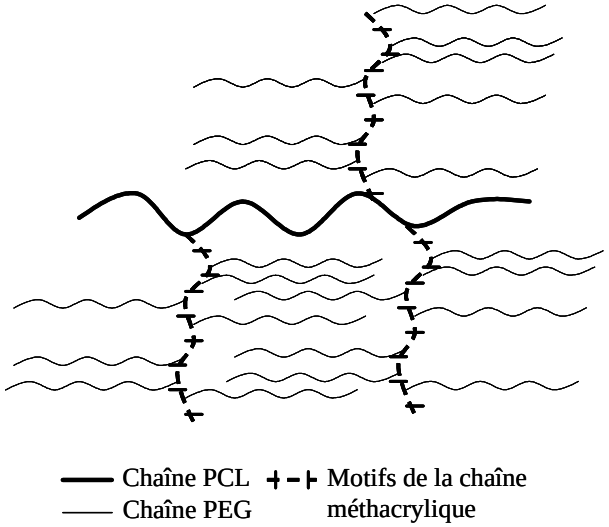


Figure 57 : Représentation schématique du copolymère PCL-g-P(MAPEG)

Deux types de macromonomères monofonctionnels méthacrylate-PEG, ou MAPEG, ont été polymérisés. Le premier possède une chaîne PEG de masse molaire d'environ 1100g/mol , le second est plus court avec un PEG de seulement 300g/mol (notés 1100 et 300).

a) Méthacrylate-PEG (1100)

i. Polymérisation et caractéristiques

Trois polymérisations ont été réalisées avec des quantités en macromonomère variables, choisies pour permettre la visualisation de la présence de PCL par RMN ^{1}H et surtout pour tenter d'équilibrer la balance hydrophobe/hydrophile des copolymères synthétisés.

Le Tableau 25 reprend les principales caractéristiques des polymérisations et des structures obtenues. Dans tous les cas, on a récupéré trois fractions au cours du traitement : une fraction de PCL n'ayant pas réagi qui est précipitée dans le méthanol, une fraction très minoritaire de copolymère contenu dans la phase méthanol, soluble dans l'éther diéthylique et qui n'a donc pas été étudiée, et une fraction de copolymère récupérée par précipitation dans l'éther diéthylique, hydrosoluble et très majoritaire. Ce sont ces dernières fractions qui sont décrites dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Caractéristiques des copolymères PCL-g-poly(MAPEG) (1100)

Essai	**Eq. de monomère**	**T** (°C)	**Prise en masse**	**Mn** (g/mol)	**% molaire**		**Rdt. PCL / méthacrylate**
					PCL / méthacrylate	**PCL / PEG**	
1	1	-70	Oui	/	35 / 65	2,3 / 97,7	/
2	0,5	-70 ; -55	Oui	20000	35 /65	2,3 / 97,7	10 / 36
3	0,25	-60 ; -45	Oui	24500	47 / 53	3,9 / 96,1	13 / 56

Malgré une diminution importante du nombre d'équivalents de monomère par rapport aux motifs PCL (de 1 à 0,25) il n'a pas été possible d'obtenir des pourcentages molaires de PCL supérieurs à 50% (par rapport aux motifs méthacryliques). Cela montre que, lorsqu'elle a lieu, la polymérisation se fait relativement bien avec une bonne croissance de la chaîne méthacrylique. Les rendements en PCL et macromonomère calculés par rapport à la quantité de copolymère récupéré dans la fraction « intéressante » sont toutefois faibles, en particulier pour PCL (10%).

Contrairement à ce qui est normalement observé lors du macroamorçage de monomères, on assiste ici à une prise en masse du milieu réactionnel lors de l'ajout du macromonomère. Deux facteurs peuvent expliquer ce phénomène. Le premier est lié à la présence possible de macromonomères bifonctionnels dans le MAPEG commercial utilisé ce qui entraînerait l'apparition de nœuds de réticulation. Le second facteur est la température de réaction qui est peut-être trop basse pour permettre une bonne solubilisation du MAPEG. Pour cette raison, le 3ème essai a été réalisé à une température supérieure ce qui n'a pas empêché la prise en masse, mais a permis d'améliorer le rendement de polymérisation (Tab.25). Une augmentation des masses molaires a été constatée par analyse par CES en milieu eau/méthanol (90/10). Les chromatogrammes obtenus pour les essais 2 et 3 montrent un pic principal, large à partir duquel les masses ont été calculées, et des signaux secondaires qui forment des

épaulements vers les faibles masses et sont de plus faible intensité. En raison de leur présence, une discussion de la polymolécularité du pic principal est sans fondement.

ii. Etude par diffusion dynamique de la lumière

Les copolymères PCL-*g*-poly(MAPEG) des essais 2 et 3 ont été mis en solution dans l'eau afin de vérifier la présence de nanoparticules. Il faut remarquer ici que l'homopolymère poly(MAPEG) a lui-même tendance à former spontanément des agrégats dans l'eau. Ceci a été vérifié par homopolymérisation radicalaire du monomère et analyse en diffusion dynamique de la lumière d'une solution à 10 mg/cm^3 du polymère obtenu ($\overline{DPn} \approx 10$). Cette analyse a montré la présence de nanoparticules d'un diamètre moyen de 34 nm.

Dans le cas des copolymères plusieurs analyses ont été effectuées sur des solutions à 10 et 1 mg/cm^3 afin d'évaluer l'influence de la concentration sur la taille des objets obtenus et préciser leur nature (micelles, agrégats, nanoparticules monomacromoléculaires…). Dans tous les cas, une fluctuation très importante des valeurs mesurées a été observée avec pour une même solution des diamètres allant de 1,5 à 100nm. Pour éliminer ces variations, la filtration des solutions a été remplacée par une centrifugation à 8000tr/min pendant 30 minutes, et les échantillons ont été étudiés directement afin d'éliminer toute possibilité de dégradation du copolymère. Dans ces conditions les résultats obtenus sont les suivants.

Tableau 26 : Tailles des objets formés en solution aqueuse par les copolymères PCL-g-poly(MAPEG 1100)

Copolymère	**% PCL / motifs méthacryliques**	**% PCL / motifs PEG**	**Ø moyen à 10 mg/cm^3** (nm)	
			Distribution en nombre	**Distribution en intensité et part relatives d'intensité diffusée**
2	35	2,3	1,6	1,6 (9%) et 115 (81%)
3	47	3,9	1,6	1,6 (9%) et 145 (81%)

On constate que les copolymères forment bien des objets colloïdaux nanométriques en solution (Tab.26). Dans les deux cas il y a une bimodalité de la distribution avec une population ayant un diamètre de 1,6 nm, et une seconde population ayant un diamètre environ 100 fois supérieur. La comparaison des distributions en nombre et en intensité diffusée permet de conclure que les objets de petite dimension correspondent à une population de macromolécules condensées et isolées en solution. Les objets de grande dimension sont des agrégats plurimoléculaires de diamètre supérieur à 100 nm. Ces agrégats résultent de l'agrégation des chaînes isolées et sont peu nombreux, ce qui explique qu'il n'apparaissent pas dans la distribution en nombre. Ils contiennent cependant la majorité du copolymère mis en solution ce qui se traduit par une part de l'intensité diffusée très importante (81%).

b) Méthacrylate-PEG (300)

i. Polymérisation et caractéristiques

Les essais basés sur l'emploi de MAPEG 1100 ont permis d'obtenir des amphiphiles hydrosolubles à base de PCL et répondent donc partiellement aux objectifs fixés. Mais en raison de la trop importante teneur en motifs PEG de ces copolymères, on s'est intéressé à des PEG de plus petite taille afin de conserver une balance hydrophile/hydrophobe plus équilibrée.

Une réaction similaire à celle décrite pour l'essai 1 du Tableau 23 a été réalisée avec un macromonomère MAPEG de masse molaire 300 g/mol. La première conséquence est l'absence de prise en masse du milieu réactionnel observé précédemment. Après un traitement évitant toute extraction et fondé sur des cycles précipitation dans l'éther diéthylique-reprise dans le chloroforme, un solide cireux a été récupéré. Les rendements respectifs de chaque motif sont faibles, avec 19% pour la PCL et 27% pour le monomère.

Le copolymère obtenu est soluble dans la plupart des solvants (eau, chloroforme...). Il a été analysé par CES et RMN ^{1}H. En solution dans le THF, la masse molaire mesurée est de 31600 g/mol avec une polymolécularité de 2. Les analyses de composition par RMN en milieu DMSO et chloroforme deutérié ont toutes deux montré que le copolymère contient 37% de motifs PCL et 63% de motifs MAPEG 300 ce qui est semblable aux teneurs obtenues avec le MAPEG 1100. La différence apparaît lorsque l'on se rapporte aux motifs PEG avec cette fois-ci 10 % de PCL contre 2-3% avant. Bien qu'on soit encore loin de l'équimolarité des motifs, ce copolymère possède un caractère hydrophobe plus prononcé et il est vraisemblablement possible de continuer dans cette voie en diminuant le nombre d'équivalents MAPEG utilisés (1 par motif PCL dans le cas présent).

ii. Etude par diffusion dynamique de la lumière

Un premier indice de la présence d'objets nanométriques dans les solutions de copolymère a été fourni par un test de solubilisation d'un colorant très hydrophobe, le Yellow OB (noté YOB) dans une solution de PCL-*g*-poly(MAPEG 300). Ce colorant présente la particularité d'être totalement insoluble en milieu aqueux mais de colorer en jaune-orangé intense une solution aqueuse contenant des structures amphiphiles possédant un cœur ou des poches hydrophobes dans lequel le YOB se solubilise.

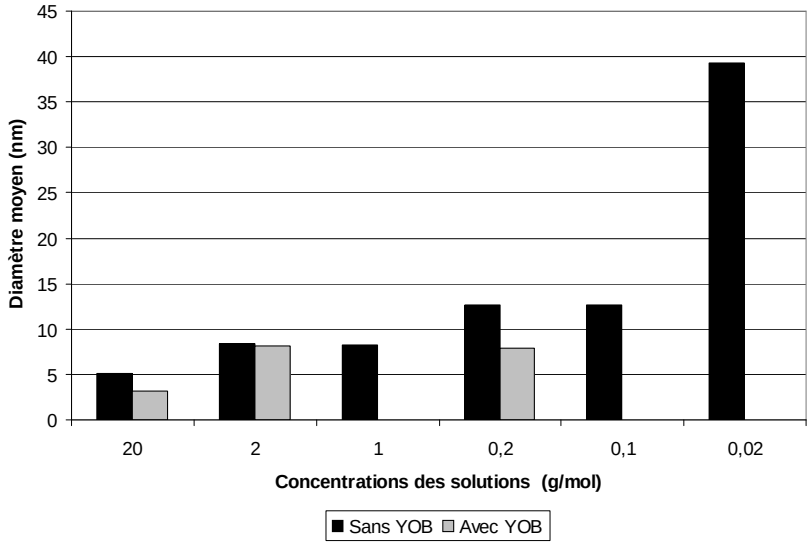


Figure 58: PCL-g-poly(MAPEG 300) : Diamètre moyen des nanoparticules en solution en fonction de la concentration et de la présence de Yellow OB

Suite à ce premier test, une série de solutions aqueuses ayant des concentrations de 0,02 à 20 mg/cm^3 a été préparée. Les résultats de l'étude de ces solutions par diffusion dynamique de la lumière confirme la présence de nanoparticules en solutions dont les diamètres sont compris entre 5 et 50 nm environ, en fonction des concentrations (Fig.58) .

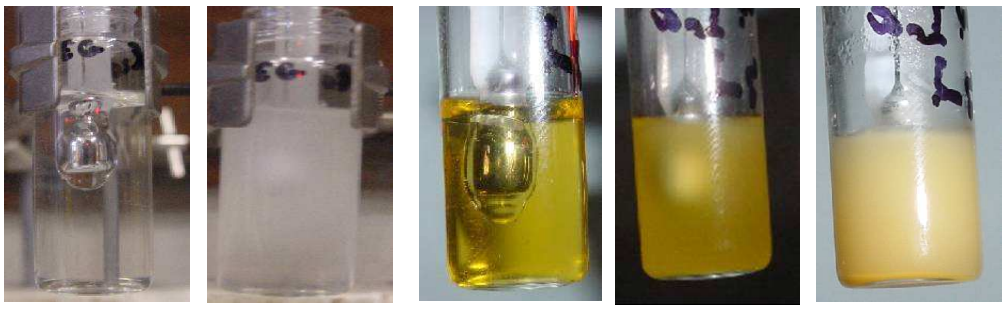
On constate un phénomène peu courant, à savoir, une augmentation de la taille des nanoparticules quand la concentration diminue. On observe normalement l'inverse dans le cas où des agrégats macromoléculaires se forment avec une tendance à l'augmentation du diamètre avec la concentration. Dans notre cas on passe de 40 nm pour 0,02 mg/cm^3 à 5 nm pour 20 mg/cm^3. La structure particulière de nos copolymères, qui présentent un double greffage, est peut-être en cause. Une étude plus approfondie serait à envisager pour tenter d'expliquer ce phénomène (influence de la température…) mais n'a pas été entreprise dans le cadre de cette thèse.

iii. Détermination du point trouble

Les solutions de PEG présentent un phénomène intéressant lorsqu'elles sont chauffées : la solubilité de ces molécules diminue avec la température. La température à laquelle les chaînes de PEG se ségrègent est la température de point trouble.

Ce phénomène est dû à la désolvatation des chaînes de PEG. En effet, à température ambiante les motifs éthylène glycol sont complètement solvatés par les molécules d'eau par l'intermédiaire d'interactions faibles telles que les liaisons hydrogène. Le fait de chauffer permet de rompre ces interactions et donc d'éliminer la couche de molécules d'eau responsable de la solvatation. Le polymère devient alors totalement insoluble et précipite. Cette précipitation, si elle est thermo-réversible, peut être intéressante pour des applications de dépollution où un polluant, après avoir

migré vers les cœurs hydrophobes des objets en solution, peut être éliminé par simple précipitation de ces derniers. Sur nos solutions à 20 mg/cm^3, on a constaté l'existence d'une température de point trouble à 70°C pour les solutions sans YOB, et 65°C pour les autres (Fig.59).



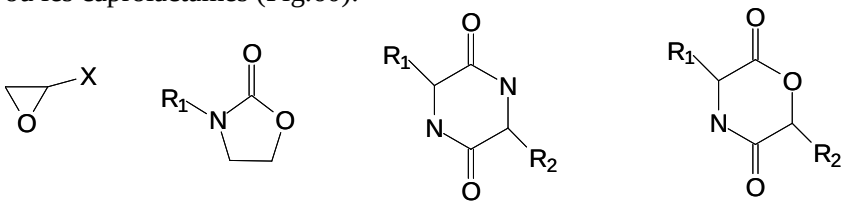
a) **Tamb** **80°C** b) **Tamb** **65°C** **95°C**

Figure 59 : Température de point trouble de solution 20 mg/cm^3 de PCL-g-P(MAPEG 300) a) sans YOB ; b) en présence de YOB

Dans notre cas, le phénomène est réversible mais aucune précipitation franche n'a été constatée.

III. Dérivés cycliques et polymérisation par ouverture de cycle :

La polymérisation par ouverture de cycle est une méthode très utilisée qui peut donner accès à des polymères fonctionnalisés et/ou dégradables. Des hétérocycles fonctionnalisés sont susceptibles de polymériser par cette voie en donnant des copolymères porteurs de fonctions variées. On trouve parmi ces composés des cycles à 3 atomes de type époxyde et thiirane, à 5 atomes comme, par exemple, les N-carboxyanhydrides (NCA), ou d'ordre supérieur avec, par exemple, les dilactames, les depsipeptides ou les caprolactames (Fig.60).



a) b) c) d)

Figure 60 : Monomères cycliques a) Epoxyde b) N-Carboxyanhydride c) Dilactame d) Depsipeptide

Dans le cas des NCA et des depsipeptides, outre l'obtention de polymères fonctionnalisés, l'intérêt des structures synthétisées est qu'elles sont dégradables voire métabolisables puisque les unités de bases sont des acides aminés et des esters aliphatiques. Ces monomères suscitent donc un grand intérêt pour la synthèse de biomatériaux et surfactants dégradables où on les trouve associés par exemple au PLA[134,140,265] ou à la PCL[266].

La polymérisation anionique par ouverture de cycle étant décrite dans la littérature pour ce type de dérivés,[139,267] nous nous sommes intéressés à la possibilité de polymérisation d'époxydes, de dilactames et de NCA à partir du macroamorceur PCL$^{\Theta}$.

1) Epoxyde et dilactame

Le premier dérivé cyclique est l'éther isopropyl glycidique, testé dans les conditions classiques de macroamorçage par la PCL$^{\Theta}$ avec 0,33 et 1 équivalent de LDA par motif PCL et à des températures de polymérisation comprises entre -70 et -50 °C puis -60 et -35 °C. Quelles que soient les conditions retenues, aucune polymérisation n'a été observée.

Compte tenu de la plus grande réactivité des thiiranes, il pourrait être intéressant de tester la polymérisation de ces dérivés.

Le second hétérocycle testé est la piperazine-2,5-dione. Ce dérivé est intéressant car sa structure donne accès à une polyglycine. Les conditions de polymérisation par voie anionique décrites dans la littérature sont plus agressives en terme de température, les réactions étant réalisées à chaud (T>100°C)[268,269]. Une réaction test a été effectuée dans un mélange 50/50 de THF et DMSO à une température comprise entre -40 et -20°C afin de déterminer si un dilactame fonctionnalisé pourrait être ultérieurement utilisée. Dans ces conditions aucune polymérisation n'a été mise en évidence.

Ces essais préliminaires ayant restreint le choix des monomère cycliques aux NCA et depsipeptides, nous nous sommes concentré sur l'étude de la polymérisation anionique par ouverture de cycle des NCA.

2) NCA dérivé d'alanine

Bien qu'aucune fonctionnalité particulière ne soit présente sur l'alanine, un premier essai de macromamorçage par la PCL$^{\Theta}$ a été réalisé à partir d'un NCA d'alanine protégé par un groupe fmoc (Fig.61). Ce dernier nous a été gracieusement fourni par le docteur J-A.Fehrentz (Laboratoire des Aminoacides, Peptides et Protéines, UMR-CNRS 5810, Universités de Montpellier I et II).

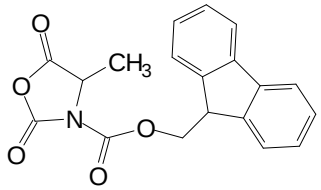


Figure 61 : N-carboxyanhydride de Fmoc-Alanine

Un spectre IR du produit fourni a révélé la présence d'impuretés résultant de réactions de dégradation fréquemment observées lors du stockage des NCA qui sont très sensibles à l'hydrolyse. Une purification a donc été réalisée afin d'éliminer toute trace d'acide aminé non cyclisé, dont les fonctions amine et acide carboxylique sont incompatibles avec un mécanisme de polymérisation anionique. Cette purification passe par des lavages successifs d'une solution froide de (NCA + acide aminé) dans l'acétate d'éthyle par des solutions aqueuses froides de carbonate de sodium. L'extraction est complète lorsque le pH des phases aqueuses est à nouveau basique. Nous avons vérifié par analyse IR du solide récupéré la disparition de la bande à 1735 cm^{-1} de l'acide. Le rendement de la purification est de 50%.

Le NCA purifié a été utilisé comme monomère dans les conditions classiques de polymérisation anionique amorcée par PCL^{Θ}. Le mécanisme de cette polymérisation est donné plus loin pour illustrer la polymérisation d'un second NCA à base de lysine (Fig. 65). Compte tenu de la quantité de NCA purifié obtenu, le nombre d'équivalent de NCA est de 0,6 contre 2 normalement. Malgré cela, un copolymère PCL-*g*-poly(Fmoc-Alanine) a été obtenu. L'analyse par CES avec détection fluorimétrique (λ excitation = 270nm, λ émission = 320nm), a révélé un pic intense dû à des groupes fmoc liés à des composés de petite masse molaire. Pour les éliminer, une reprécipitation dans le méthanol a été effectuée suivie d'une nouvelle analyse par CES. Le copolymère obtenu a une de masse molaire $\overline{Mn}$ =13000 g/mol et est visible en détection fluorométrique et réfractive, ce qui indique la présence de fmoc lié à la PCL. Sa composition a été évaluée par RMN du proton. L'intégration des signaux à 7,5 et 7,7 ppm dûs à la résonance des protons des groupes fmoc comparée à celle des signaux caractéristiques de PCL indique que le pourcentage molaire de motifs fmoc-alanine est de 20%.

Des essais de déprotection du fmoc par la pipéridine ont été réalisés après vérification préalable de l'insensibilité du squelette PCL à ce réactif. L'efficacité de la méthode s'est avérée bonne avec plus de 90% de déprotection. Toutefois, la réaction principale s'accompagne de réactions secondaires d'autant plus importantes que la déprotection est longue. Il y a alors apparition de dérivés de type urée et de coupures au niveau des segments poly(acide aminé).

Cette réaction a néanmoins permis la synthèse d'un copolymère greffé totalement dégradable à chaîne principale polyester et chaînes latérales poly(acide α–aminé). Cette structure ne possède cependant aucune fonction hydrosolubilisante. Pour cette raison nous nous sommes intéressé à la lysine comme monomère source de groupes cationiques.

3) Lysine :

a) Synthèse d'un NCA de lysine

La méthode de synthèse et de purification utilisée dérive de celle décrite par Poché *et al.*[270,271] fondée sur l'utilisation de triphosgène. Ce composé présente l'avantage d'être solide et donc facilement manipulable par rapport au phosgène gazeux, historiquement utilisé pour la synthèse de NCA. La réaction se fait entre 1 équivalent de N-ε-Z-Lysine et 0,33 équivalent de triphosgène dans l'acétate d'éthyle (AcOEt) sous courant d'argon à une température de 90°C (Fig.62). La fin de réaction est matérialisée par le changement d'aspect du milieu avec passage d'une suspension laiteuse à une solution quasi limpide. La durée totale de réaction est d'environ 4h à chaud, puis une heure pour le retour à température ambiante.

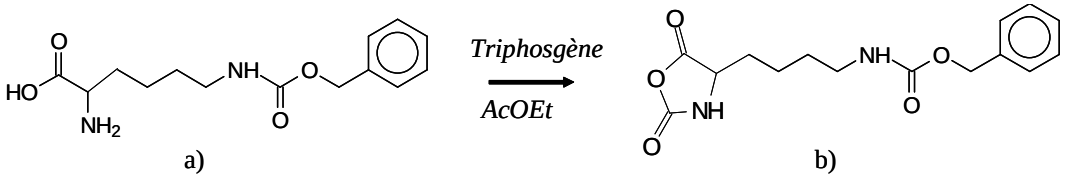


Figure 62 : a) N-ε-Z-Lysine b) NCA de N-ε-Z-Lysine

Remarque : La présence du groupe protecteur CBz (=Z) est a priori nécessaire puisque la présence d'une amine libre dans le milieu réactionnel empêche toute polymérisation par voie anionique et que le triphosgène réagit sur cette amine.

Le traitement est effectué sous argon avec une évaporation partielle de l'AcOEt et addition d'un excès d'heptane dans lequel le NCA de la N-ε-Z-Lysine précipite. Les quantités solvant/non solvant sont ajustées de telles sorte que la précipitation soit la plus lente possible afin d'obtenir un NCA pur. Le mélange est placé une nuit à 4°C, puis le solide est filtré et séché sous vide poussé avant d'être conservé sous argon au congélateur.

Le solide est caractérisé par infra-rouge avec l'apparition des bandes d'absorption de l'anhydride à 1850 ; 1820 et 1775 cm^{-1}. Le carbamate du groupe protecteur Z est caractérisé par des bandes à 1690 et 1530 cm^{-1}. Deux analyses par RMN du proton ont été effectuées, l'une dans $CDCl_3$, l'autre dans TFA. Dans $CDCl_3$ les signaux caractéristiques du NCA sont visibles avec les C$\underline{H}_2$ de la chaîne latérale à 1,42-1,49-1,81 et 1,92 ppm, le C$\underline{H}_2$ en α du carbamate à 3,18 ppm, le C$\underline{H}$ du cycle à 4,24 ppm, le N$\underline{H}$ du carbamate à 4,92 ppm, le C$\underline{H}_2$ du benzyle à 5,08 ppm, le N$\underline{H}$ du cycle à 6,91 ppm et les atomes d'hydrogène du cycle benzylique à 7,32 ppm (Fig.63).
D'après les spectres RMN, le produit récupéré est pur et le rendement de réaction est élevé, avec 90% de la lysine protégée mise en réaction étant récupérée sous forme de NCA de N-ε-Z-Lysine (noté NCA(N-Z-Lys).

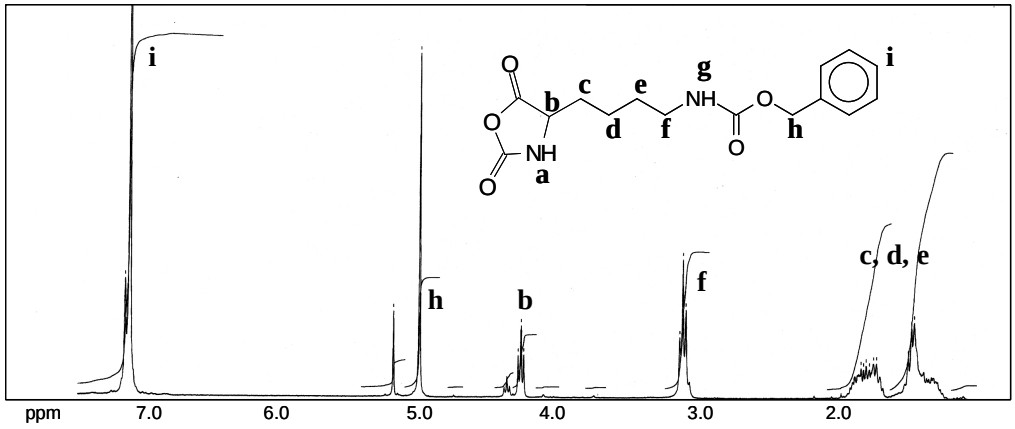


Figure 63 : RMN^{1}H dans TFA(d) de NCA(N-Z-Lys)

Deux stratégies ont été envisagées pour synthétiser des structures du type PCL-*g*-PLL. En effet, le NCA peut être mis à réagir directement sur le macroamorceur PCL$^{\Theta}$, ou être homopolymérisé en présence d'une amine pour former une poly(N-Z-Lysine) qui peut ensuite être activée et greffée sur le squelette carbanionique PCL$^{\Theta}$.

b) <u>Homopolymérisation du NCA(N-Z-Lys)</u>

Les NCA sont susceptibles de polymériser suivant différents mécanismes en fonction des amorceurs utilisés. Dans le cas où des amines sont utilisées c'est le caractère basique et/ou nucléophile qui oriente le mécanisme avec deux évolutions possibles:

- si le caractère basique l'emporte, la première étape est l'attaque de l'hydrogène porté par l'azote du cycle avec apparition d'un anion sur le cycle. C'est à partir de cet anion que la propagation se fait ensuite suivant un mécanisme dit du « monomère activé » (Fig.65a)
- si le caractère nucléophile l'emporte, l'attaque se fait sur le carbone 5 du cycle. Après ouverture et perte de CO_2, la propagation a lieu par l'amine terminale de la chaîne en croissance. C'est le mécanisme dit « mécanisme amine » (Fig.65b-c)

Dans notre cas, l'amine secondaire utilisée, la diéthylamine, est connue pour réagir suivant le deuxième type de mécanisme. Les conditions de polymérisation retenues sont relativement classiques et sont inspirées des travaux de Tewksbury *et al.*[272], Wendelmoed *et al.*[273], et plus particulièrment Yaron *et al.*[274] qui ont relié les conditions de polymérisation (nature de l'amine, solvant) au degré de polymérisation visé. Ces conditions sont données dans le Tableau 27.

Tableau 27 : Conditions de réaction de synthèse du NCA de N-Z-Lysine

Solvant	Dioxane
Amorceur	Diéthylamine
Température	Température ambiante
Durée	60 heures
[NCA]	5% (w,v)
DP visé	≈ 100

Le dégagement de CO_2 accompagnant la croissance de la chaîne a permis de suivre la polymérisation. En fin de réaction, le polymère est récupéré par précipitation dans le méthanol puis séché. La bande caractéristique des groupes CO portés par les polypeptides à 1650 cm^{-1} est présente dans le spectre IR. Une analyse par RMN dans TFA(d) a permis de vérifier qu'il s'agit bien de l'homopolymère poly(N-Z-Lysine) dont tous les groupes amine sont protégés. Le rendement de réaction est bon avec un peu plus de 80 % de N-Z-Lysine introduite récupérée.

Le polymère présente en DSC une Tg à 28°C ce qui correspond à la Tg de la PLL. Les CES ont été réalisées dans le THF et $CHCl_3$. Les résultats diffèrent en fonction du solvant utilisé, avec dans le THF $\overline{Mn}$ = 23500 et $\overline{Mw}$ = 110000 g/mol contre 60000 et 105000 dans le chloroforme. Si l'on considère que le $\overline{DPn}$ visé peut être approximé par la relation $\overline{DPn}$ = [NCA]/[Amine], les résultats se situent dans l'ordre de grandeur attendu avec un $\overline{DPn}$ expérimental compris entre 85 et 215, selon le solvant d'analyse, au lieu de 100 visé.

Une fois isolé et caractérisé, l'homopolymère poly(N-Z-Lys) a été utilisé pour la seconde phase de synthèse du copolymère greffé PCL-*g*-PLL à savoir le greffage sur le squelette PCL carbanionique.

c) Activation de P(N-Z-Lys) et greffage sur PCL

i. Synthèse du copolymère

Le polymère synthétisé possède une extrémité de chaîne amine tertiaire résultant de l'amorçage à la diéthylamine, et d'une autre extrémité amine primaire. C'est cette dernière qui nous intéresse ici puisqu'elle permet d'activer le chaîne poly(N-Z-Lys) de manière analogue à celle décrite pour le greffage du MeO-PEG (Chap.III-I-3-c-ii).

L'homopolymère est dissous dans le dioxane, puis les fonctions amine primaire terminale sont mises à réagir avec du chlorure de bromo acétyle (70 équivalents par amine) à température ambiante. Après 3 heures de réaction, le milieu réactionnel est évaporé à sec puis le polymère activé est repris directement dans du THF anhydre, solvant de la réaction de greffage.

La poly(N-Z-Lysine) activée en solution dans le THF est ensuite utilisée comme réactif dans le seconde étape de modification chimique par voie anionique de la PCL. L'étape de greffage dure une heure et la température est comprise entre -50 et -40°C. Etant donné la nature polymère du substituant introduit sur la chaîne PCL, le nombre d'équivalent de chaîne activé est faible (0,1 équivalent) afin de ne pas rencontrer les problèmes de solubilité décrits auparavant pour les macromonomères MAPEG (Chap.III-III-3). Après purification, une poudre blanche est récupérée par précipitation dans le méthanol sans trace de polymère non précipité dans le surnageant. Le rendement massique global est de 61%.

ii. Caractérisation

Différentes analyses ont été réalisées afin de démontrer le greffage, en particulier par CES (Fig.64). Deux détecteurs ont été utilisés, un détecteur sensible aux variations d'indices de réfraction (RI) et un fluorimètre (λ excitation = 255 nm, λ émission = 265 nm).

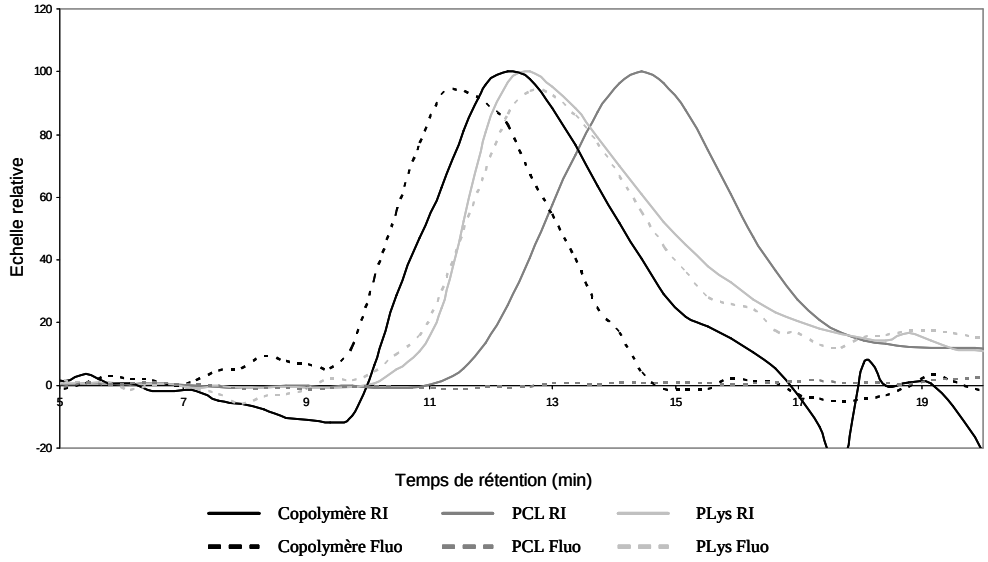


Figure 64 : CES avec détection réfractométrique et fluorométrique des homopolymères PCL et P(N-Z-Lys) et du copolymère PCL-g-P(N-Z-Lys)

Les chromatogrammes mettent en évidence l'augmentation de la masse molaire du composé récupéré par rapport à celles des homopolymères de départ (Fig.64 et Tab.28). Le chromatogramme correspondant est monomodal avec une concordance entre les temps de rétention observés par détection RI et fluorométrique. Il s'agit bien du même polymère détecté par les deux méthodes. La PCL ne fluoresçant pas, le signal fluorométrique indique que le composé contient bien des segments poly(N-Z-Lys). C'est donc un copolymère. La masse molaire estimée en milieu $CHCl_3$ est de 137000 avec un indice de polymolécularité Ip = 1,44.

Tableau 28 : Masses molaires des homopolymères et du copolymère

Polymère	**Mn** (g/mol)	**Mw** (g/mol)	**Ip**
PCL	39900	57600	1,44
poly(N-Z-Lys)	63300	104200	1,65
PCL-*g*-poly(N-Z-Lys)	136600	196700	1,44

Bien que les valeurs des masses molaires soient relatives, leur comparaison permet d'estimer à environ 2 le nombre de chaînes poly(N-Z-Lys) greffées par chaîne PCL. Sur cette base la composition molaire serait : 44% de PCL et 56% de poly(N-Z-Lys).

Une analyse du copolymère par RMN dans le TFA(d) a mis en évidence la présence des deux types de motifs (spectre semblable à la Fig.66) et la comparaison des intégrations des signaux caractéristiques

confirment l'ordre de grandeur de la composition donnée ci-dessus avec 36% de PCL et 64% de poly(N-Z-Lys). Les rendements spécifiques en motifs ε–CL et N-Z-Lysine sont de 35 et 74% respectivement.

Il est donc possible d'obtenir un copolymère greffé à base de PCL porteur de greffons PLL protégée. L'hydrosolubilité dépend de la déprotection des fonctions amine primaire des chaînes PLL.

d) Macroamorçage du NCA(N-Z-Lys) par PCL$^{\ominus}$

La stratégie de macroamorçage, déjà utilisée pour l'alanine, constitue la seconde voie d'accès au copolymère PCL-*g*-poly(N-Z-Lys). Les conditions classiques avec 0,5 et 1,3 équivalents de LDA et de NCA respectivement ont été utilisées.

La réaction attendue est normalement de type monomère activé avec attaque du macropolycarbanion sur l'hydrogène porté par l'azote du NCA (Fig.65a). Si c'est le cas, l'extraction de l'hydrogène labile par l'intermédiaire PCL$^{\ominus}$ conduit à l'inactivation du macroamorceur et l'homopolymérisation du NCA. On compte donc sur la compétition qui existe toujours entre ce mécanisme et le mécanisme amine pour obtenir une copolymérisation. Cette dernière passe obligatoirement par l'attaque nucléophile sur le carbone 5 du cycle suivant un schéma donné sur la Figure 65 (b et c).

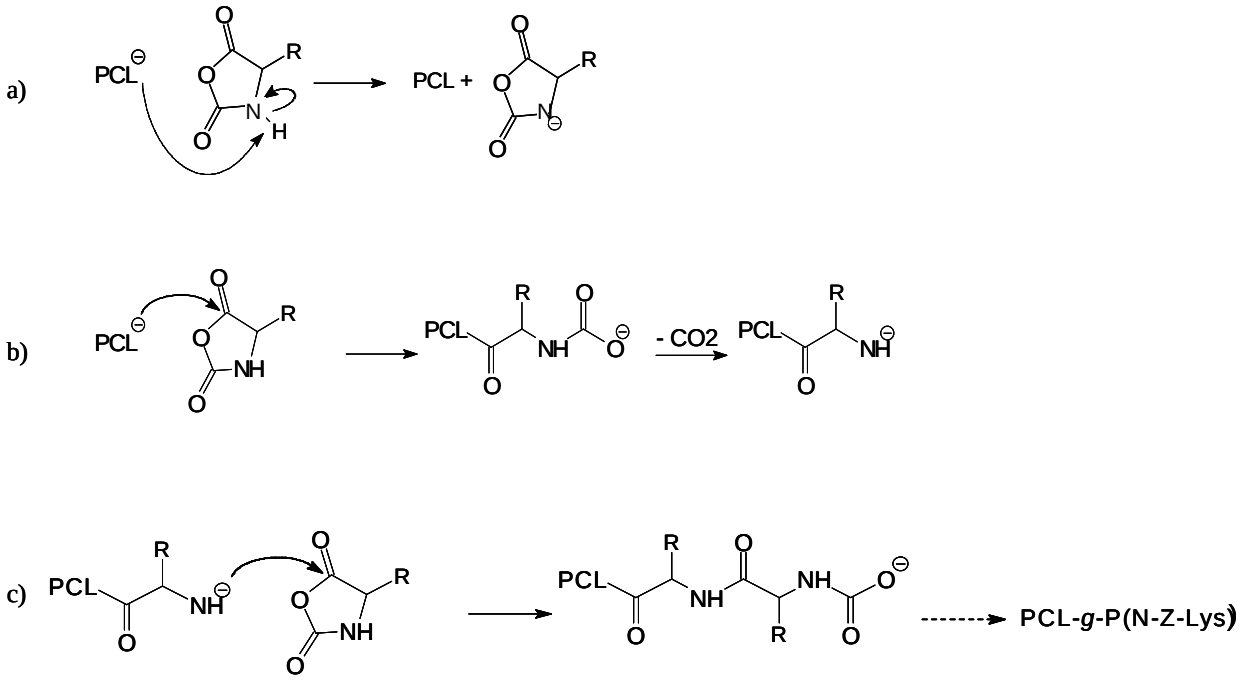


Figure 65 :a) Début du mécanisme du « monomère activé » et mécanisme d'attaque nucléophile du macroamorceur PCL$^{\ominus}$ sur NCA : b) amorçage c) propagation

En fin de réaction un traitement classique permet de récupérer un solide blanc ayant l'aspect d'une poudre. Ce solide, une fois séché, a été analysé par spectrométrie infra-rouge. Le spectre comporte la bande caractéristique des polypeptides à 1650 cm^{-1}, celles de l'amide à 3290 cm^{-1} et de l'ester de la PCL à 1730 cm^{-1}. Le spectre obtenu par analyse RMN dans le TFA(d) a permis de déterminer une composition molaire de 45% de PCL et 55% de poly(N-Z-Lys) (Fig.66).

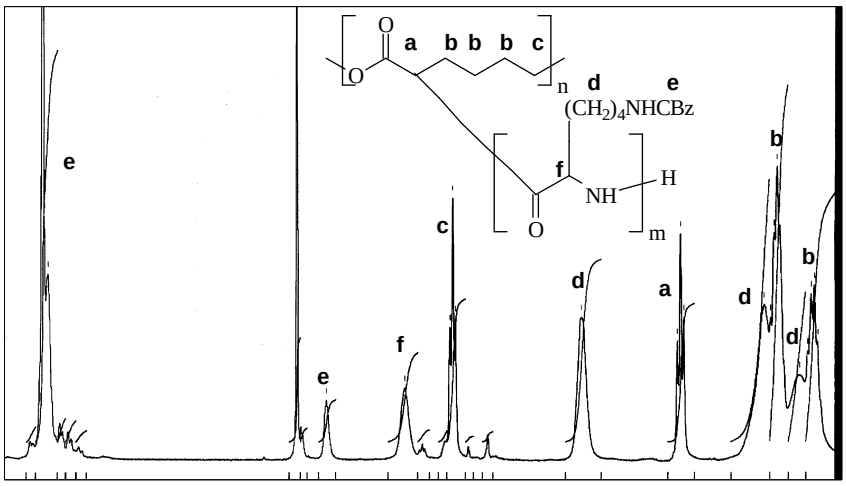


Figure 66 : RMN ^{1}H du copolymère PCL-g-P(N-Z-Lys) 45/55 (TFA(d))

Le chromatogramme CES monomodal, correspondant à $\overline{Mn}$ = 7200 g / mol et à un indice de polymolécularité Ip = 1,4, a démontré l'absence d'homopolymère. Enfin, l'étude des thermogrammes DSC a révélé l'existence d'une température de fusion à 50°C, typique des PCL modifiées, et une température de transition vitreuse à 28°C, valeur déjà observée pour l'homopolymère poly(N-Z-Lys). Les rendements molaires spécifiques sont de 55% en ε–CL et 52 % en N-Z-Lysine.

Le macroamorçage de NCA ayant un hydrogène labile porté par l'azote du cycle est donc possible. Le mécanisme dit du « monomère activé » semble secondaire, ou alors n'a conduit qu'à des oligomères solubles non récupérés dans le traitement.

Les deux méthodes, greffage d'homopolymère et macroamorçage direct du NCA, ont permis la synthèse de copolymères PCL-*g*-poly(N-Z-Lysine) avec des teneurs en PCL de 36% et 45% respectivement. La différence majeure entre les deux méthodes concerne les masses molaires. Cette différence peut être reliée au fait que, dans le cas du macroamorçage, on s'attend à avoir un nombre de chaînes latérales plus important que par greffage, mais ces chaînes sont plus courtes en raison de la compétition avec l'homopolymérisation.

e) Déprotection des copolymères et étude en solution

i. Déprotection

La méthode de déprotection utilisée sur les deux copolymères PCL-*g*-poly(N-Z-Lysine) est fondée sur une hydrolyse du groupe CBz en milieu TFA en présence d'un mélange d'acide bromhydrique dans l'acide acétique (30% w :w). Ces conditions sont issues de la littérature[275] avec un nombre d'équivalent d'acide légèrement augmenté puisque 8 équivalents d'HBr ont été utilisés par groupe CBz. Après 16 heures de réaction, les copolymères déprotégés ont été récupérés par précipitation directe dans l'éther froid puis séchés sous vide poussé.

La déprotection a été vérifiée par spectrométrie RMN dans le TFA(d). Dans les deux cas, le rendement de réaction est compris entre 95 et 100% et les copolymères obtenus ont les compositions molaires suivantes : 40% PCL, 60% de PLL. Cette méthode est donc intéressante puisqu'elle est quantitative et qu'elle permet de déprotéger totalement les fonctions amine primaire des chaînes latérales de la PLL tout en conservant l'intégrité du squelette PCL.

Les légers changements de composition observés avec passage de 36 à 40% en PCL pour le copolymère obtenu par greffage et de 45 à 40% pour celui issu du macroamorçage sont peu significatifs. Ils peuvent être dus à la formation de domaines moins visibles en milieu TFA(d). En milieu D_2O, dans lesquels les copolymères déprotégés sont solubles, les spectres obtenus ne présentent aucun des signaux caractéristiques de la PCL, les segments correspondants étant vraisemblablement engagés dans des microdomaines hydrophobes de structures micellaires ou agrégées.

Les masses molaires des copolymères déprotégés n'ont pas été évaluées car ces composés cationiques ont tendance à interagir sur les colonnes en milieu aqueux. Par ailleurs, les copolymères déprotégés sont peu solubles dans le THF ou le choroforme pour les mêmes raisons, ce qui rend les déterminations en solvant organique inconsistantes.

ii. Etude physico-chimique de PCL-g-PLL en milieu aqueux

La polylysine est une polybase hydrosoluble à pH neutre car les fonctions amine primaire y sont protonées. Les chaînes latérales de ce poly(α-amino acide) possèdent un pKa de 10,2 qui confère un caractère cationique fort au polymère, et ce dans une vaste gamme de pH.

Dans notre cas, les copolymères greffés synthétisés contiennent 60% de motifs lysine ce qui est suffisant pour assurer l'hydrosolubilité de la structure et étudier les solutions par diffusion dynamique de la lumière. Les solutions ont été préparées dans l'eau et le tampon phosphate à des concentrations allant de 10 à 0,05 mg/cm^3. Des solutions préparées dans le tampon isoosmolaire permettent d'évaluer

l'influence de l'écrantage des charges du copolymère à un pH physiologique puisque la présence de sels dans le milieu a normalement pour effet de masquer les interactions électrostatiques entre les macromolécules chargées.

Les résultats sont présentés dans la Figure 67. D'une manière générale, que ce soit pour le copolymère obtenu par macroamorçage (A) ou par greffage (B), la dilution des solutions entraîne une diminution de la taille des nanoparticules. Pour le copolymère (A) on passe d'un diamètre moyen de 165 nm à 60 nm lorsque la concentration passe de 5 à 0,05g/mol. On est donc a priori en présence d'agrégats ou micelles plurimoléculaires.

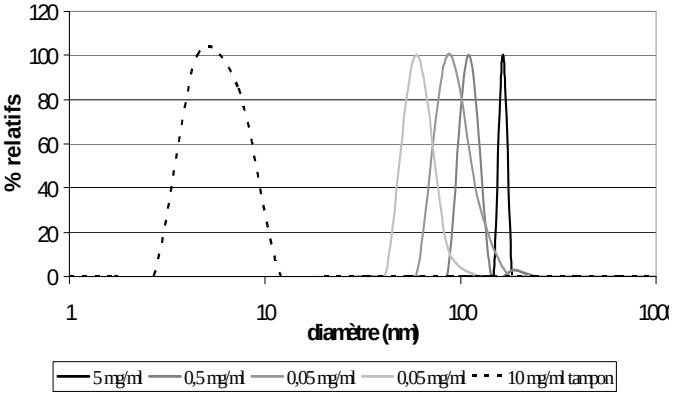


Figure 67 a : Solutions de PCL-g-PLL obtenu par macroamorçage

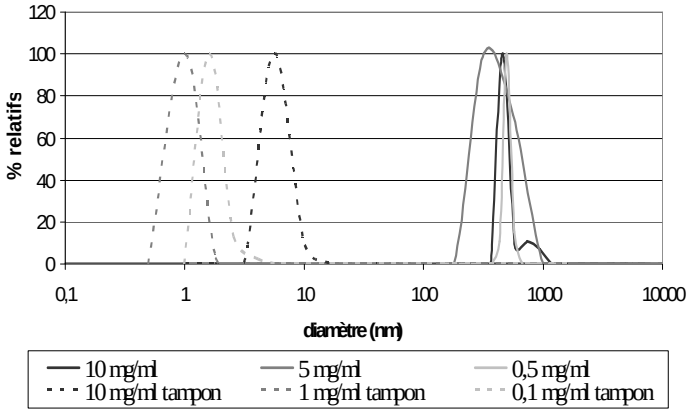


Figure 67 b : Solutions de PCL-g-PLL obtenu par greffage

L'effet de l'écrantage de charge sur l'agrégation des macromolécules est visible sur les courbes en pointillé qui correspondent aux solutions préparées dans le tampon phosphate. On constate qu'à 10 mg/cm^3 on a une forte contraction avec des objets d'environ 10 nm de diamètre. A des concentrations inférieures (1 et 0,1 mg/cm^3), l'effet d'écrantage augmente et les copolymères sont isolés en solution.

Les objets colloïdaux formés par le copolymère (B) ont des diamètres de 3 à 8 fois plus importants que ceux mesurés pour les objets formés par le copolymère (A) (Fig.67 a et b). Cette différence peut s'expliquer par les différences d'architectures attendues pour ces structures. Dans le cas du greffage (B), le copolymère est probablement formé par un squelette principal PCL substitué par un petit nombre de longues chaînes PLL, probablement deux (Fig.68). Le caractère amphiphile du copolymère PCL-g-PLL où quelques chaînes PCL s'agrègent conduit à la formation d'agrégats de taille relativement grande dans l'eau en raison de l'expansion des longues chaînes PLL chargées. En présence de sel, ces chaînes se contractent ainsi que toute la structure PCL-*g*-PLL ; d'où les faibles dimensions mesurées.

Pour le copolymère synthétisé par macroamorçage (A), la situation est différente. Un nombre plus grand de chaînons latéraux courts est présent sur une même chaîne PCL. On se trouve alors en présence d'un squelette dont les charges sont réparties plus régulièrement et dont le comportement est à rapprocher de celui d'un polyélectrolyte pour lequel les interactions hydrophobes sont contrebalancées par les répulsions électrostatiques ce qui conduit à la formation de particules plus petites dans l'eau et en milieu salin ne faisant intervenir qu'un nombre limité de macromolécules (Fig. 68).

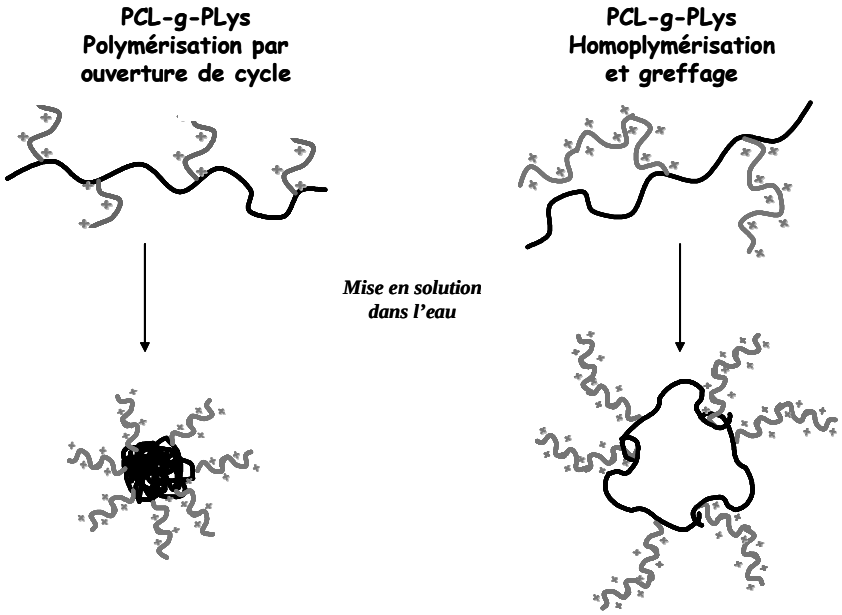


Figure 68 : Représentation des objets formés dans l'eau par les copolymères PCL-g-PLL en fonction de la stratégie de synthèse retenue

L'absence d'objets de grande taille en milieu tampon a été confirmée par l'utilisation de YOB, déjà employé pour les PCL-g-poly(MAPEG), qui a été mis en présence de solutions à 10 mg/cm^3 de copolymère dans les conditions suivantes :

Tableau 29 : Test au Yellow OB sur des solutions aqueuses de PCL-g-Lys

	PCL-*g*-PLL (macroamorçage)		**PCL-*g*-PLL (greffage)**	
	Tampon PO_4^{3-}	H_2O	Tampon PO_4^{3-}	H_2O
pH	7	2	7	2-3
Filtration (0,45µm)	/	légère coloration	/	légère coloration
Aucune filtration	/	coloration	/	coloration

On remarque en outre que la filtration des solutions élimine sans doute une partie des gros objets en solution puisque la coloration est plus intense sur des solutions non filtrées.

Ces études en solution confirment que les copolymères PCL-*g*-PLL forment spontanément des nanoparticules en solution aqueuse. Les caractéristiques de ces produits (taille des objets, dégradabilité et caractère cationique) nous ont amené à envisager l'utilisation de ces nouvelles structures dans un domaine innovant déjà évoqué en introduction, la transfection de gènes.

f) Nouveaux vecteurs dégradables pour la transfection de gènes

i. Introduction

La transfection, mise au point dès le début des annés 70, est une technique permettant l'introduction de matériel génétique viral dans une cellule. Par extension, ce terme est actuellement employé pour l'introduction de tout matériel génétique étranger dans la cellule. De nombreuses recherches concernant les traitements de cancers et de maladies génétiques reposent aujourd'hui sur le développement de ces techniques par le biais desquelles il est possible d'internaliser et de faire exprimer au sein du noyau le code génétique porté par un brin d'ADN « thérapeutique » importé par vectorisation. La transfection est donc à mettre en parallèle avec les vectorisations « classiques » de principe actif, à la différence près que le matériel vectorisé est un matériel génétique devant être internalisé par les cellules.

Historiquement ce sont les vecteurs viraux qui ont été développés, mais leur utilisation pose de nombreux problèmes liés principalement à la présence d'anticorps préexistants dans l'organisme, à la possibilité de stimulation d'une réponse immunitaire anti-virale, aux risques de recombinaison virale et à la production en grande quantité de tels vecteurs. Ces nombreux inconvénients ont conduit au développement de vecteurs synthétiques et plus particulièrement polymères.

L'une des approches principales réside dans l'utilisation de polyplexes formés spontanément sous l'effet d'interactions électrostatiques entre les charges anioniques de l'ADN et les charges cationiques d'un polycation. De nombreux polymères ont été testés et certains sont commercialisés pour les transfections de routine effectuées en laboratoire : des poly(bromure de N-éthyl-4-vinyl pyridinium), des poly(éthylène imine) linéaires (ExGenE 500™, SuperfectE™) et branchés (25kDa), des dendrimères de polyamidoamine (SuperfectE™) et de poly(propylène imine) (AstramolE™) , des conjugués à base de Pluronic® P123 et PEI (P123-g-PEI(2K)) présentant une structure greffée et bien sûr les poly(lysine).

Ces structures, et en particulier les PEI, sont toutes relativement efficaces *in vitro*, mais la plupart d'entre elles ne sont pas dégradables. En outre, des études ont démontré leur cytotoxicité[276,277] d'où l'intérêt des recherches visant à l'obtention de vecteurs cationiques dégradables utilisables *in vivo*. De nombreuses équipes travaillent actuellement dans ce domaine avec deux stratégies distinctes :

- diminuer la toxicité des polycations à fort pouvoir transfectant existants (PEI et PLL principalement),
- synthétiser de nouvelles structures remplissant ce cahier des charges.

Pour les premiers, le PEI est associé principalement au PEG et à des polyesters aliphatiques avec des structures en réseau synthétisées par Cheol Hee[278] ou greffées comme les PEI-*g*-PLA de Wang[143]. En ce qui concerne la lysine, on retrouve les mêmes comonomères associés dans des structures variées. On peut citer les copolymères à bloc PEG-*b*-PLL de Malavosklish[99], les multiblocs (PEG-*b*-PLL)$_n$ de Ahn[100] et les structures greffées PLL-*g*-PEG de Lee[279]. Plus en adéquation avec nos copolymères PCL-*g*-PLL, on trouve des exemples de PLL et de polyesters aliphatiques décrites par Jeong[152] qui a synthétisé et évalué les propriétés d'un copolymère PLL-*g*-PLAGA ou encore le terpolymère Hystidine-PEI-*g*-(PCL-*b*-PEG) de Xintao[209].
La seconde stratégie, qui consiste en la synthèse de nouveaux polymères, peut être illustrée par les travaux sur les polyphosphazènes et polyphosphoesters modifiés par des amines de Linen[280] et Zhao[54] ou les poly(amino éthyl phosphate) de Li[281].

C'est dans cette optique que la potentialité des PCL-*g*-PLL en tant qu'agent de transfection a été testée. Il faut noter que toutes les recherches citées ci-dessus sont très récentes et que l'originalité de la structure proposée dans notre cas est d'être composée d'un squelette hydrophobe alors que c'est généralement l'inverse qui est observé.

ii. Mécanisme de la transfection et facteurs à étudier :

Plusieurs étapes sont à considérer lors de l'utilisation d'un vecteur polymère en tant qu'agent de transfection. Ces différentes étapes sont représentées sur la Figure 69. On trouve dans l'ordre :
- la formation du polyplexe par mélange du matériel génétique et du polycation (a)
- le ciblage du polyplexe vers le site d'action, c'est-à-dire la cellule à traiter (b)
- l'internalisation du polyplexe dans la cellule par endocytose (c)
- la libération hors de la vésicule d'endocytose (d)
- la migration et l'entrée dans le noyau (e)
- la transcription du gène transfecté et la synthèse de protéine correspondante

Dans le cas où l'agent de transfert est dégradable il faut en outre ajouter l'étape de biodégradation du vecteur (f).

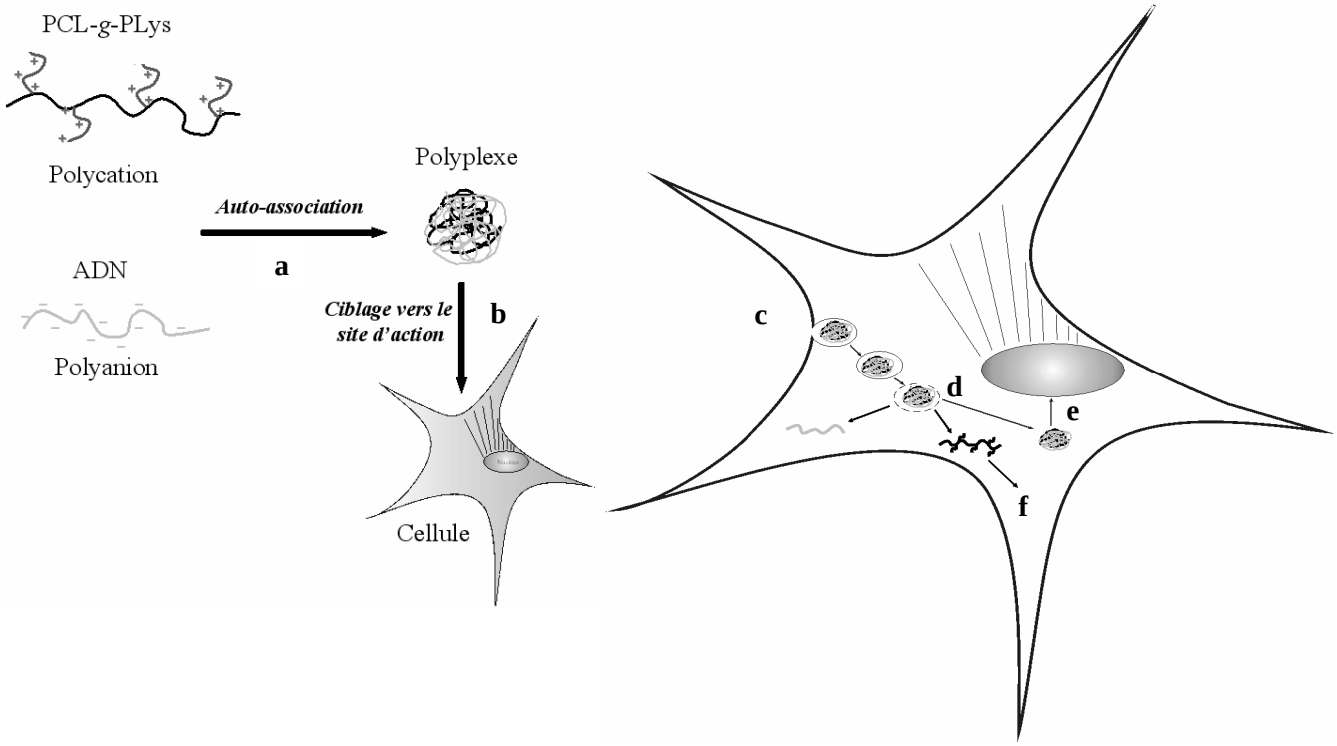


Figure 69 : Etapes successives de transfection de gène par polyplexe (librement adapté de [282])

L'un des facteurs principaux pour la réalisation de polyplexes stables en milieu vivant est le rapport N/P où N représente le nombre de mole de motifs cationiques (ammoniums de PLL) et P le nombre de mole de motifs anioniques (phosphate de l'ADN). Outre la stabilité du polyplexe, cette grandeur définit également la taille du complexe et le type de surface, neutre ou ionique, visible pour les éléments présents dans le flux sanguin (protéines, marqueurs immunologiques…) et sur la cellule. La taille et la charge du complexe ont une grande influence sur le type d'interactions et les mécanismes de défense mis en place contre ce corps étranger. Suivant les polycations utilisés le ratio N/P optimum se situe entre 1 et 10 avec généralement une amélioration de l'efficacité de transfection avec ce ratio jusqu'à atteindre une limite au-delà de laquelle la cytotoxicité du polyplexe l'emporte.[259]

Un autre facteur important est lié à la nature même du polycation qui facilite ou non la libération hors de l'endosome. C'est par exemple le cas pour la PEI dont l'efficacité en transfection est supposée liée à son caractère basique faible. L'endosome étant acide, la PEI tamponne le milieu ce qui entraîne une entrée de protons et d'eau qui à terme fait éclater la paroi endosomiale et libère le vecteur : c'est l'effet dit « éponge à proton». Dans le cas où le polycation n'est pas capable de produire cet effet, comme c'est le cas pour la PLL, des peptides endosomolytiques[16], des histidines[99,209] voire des adénovirus sont parfois liés de manière covalante à la structure. In vitro, des agents de lyse sont généralement ajoutés comme la chloroquine qui joue un rôle tampon. Il faut ici noter qu'une hypothèse récemment émise par Brown *et al.*[283] voudrait que le fait d'hydrophobiser la PLL et d'introduire un caractère amphiphile doit à lui seul faciliter la libération endosomiale.

Ayant à notre disposition la PCL-*g*-PLL on s'est intéressé à la transfection *in vitro* du gène Luciférase lors d'une étude visant à déterminer la toxicité éventuelle de notre produit, l'influence du taux N/P, et celle de la structure même du copolymère en comparant les produits obtenus par macroamorçage et par greffage.

iii. Transfection par les copolymères PCL-g-PLL

α) Plan d'expérience

Tous les essais décrits dans ce qui suit ont été réalisé en collaboration avec J.Vendrel et P.Cohen (Centre de Pharmacologie et Biotechnologie pour la Santé, UMR-CNRS 5160, Université de Montpellier I).

Les conditions de transfection ont été adaptées à partir de celles décrites par Blessing *et al.*[284]. Les cellules utilisées sont des cellules mammaires adhérentes cancéreuses de type MCF7. Deux types de plasmides ont été utilisés : le PRL-TK, permettant d'exprimer la *Luciférase Rénilla,* le PGL-Base servant de témoin et n'exprimant pas le gène *Luciférase Rénilla*. La *Luciférase Rénilla* est généralement utilisée puisqu'elle permet d'exprimer une protéine qui en présence de substrat devient luminescente et donc détectable à des concentrations nanomolaires.

Deux valeurs de taux N/P ont été retenues : 5 et 10 ce qui est relativement élevé mais permet pour un premier essai de s'assurer d'une bonne complexation.

Les polymères testés sont :
- la lipofectamine qui est un vecteur lipidique de routine servant ici de témoin
- la PEI 25kDa classiquement utilisée comme référence lors d'essais avec des polycations de synthèse
- les copolymères PCL-*g*-PLL (A) et (B) définis précédemment, après liophylisation afin d'éliminer toute trace d'acide résiduel pouvant interférer avec le milieu vivant (cf. III-3-e-β).

Chaque polymère a été solubilisé dans le tampon adéquat (Cf. partie expérimentale) et les pH ont été mesurés. Dans tous les cas cette valeur est comprise entre 7,2 et 7,3.

Le milieu de culture est changé une heure avant transfection. Les complexes sont formés juste avant utilisation, chaque solution est agitée doucement afin de favoriser la formation des complexes puis les solutions sont incubées 15-20 minutes à température ambiante. Les différents mélanges sont effectués d'après le protocole donné en annexe. Les puits sont ensuite transfectés par addition de 100µL de solution d'après le plan d'expérience donné dans le Tableau 30.

Tableau 30 : Plan d'expérience de transfection

Vecteur	Plasmide	Qté Plasmide (µg)	Conditions	Nbre puits	Rôle
Lipofectamine	PRL-TK	2	Voir partie expérimentale	2	témoin +
Lipofectamine	PGL-B	2		2	témoin -
PEI 25K	PRL-TK	2	N/P = 5	2	témoin +
PEI 25K	PRL-TK	2	N/P =10	2	témoin +
PEI 25K	PGL-B	2	N/P =10	2	témoin -
PCL-*g*-PLL(A)	PRL-TK	2	N/P = 5	2	
PCL-*g*-PLLA)	PRL-TK	2	N/P = 10	2	
PCL-*g*-PLL(A)	PGL-B	2	N/P = 10	2	témoin -
PCL-*g*-PLL(B)	PRL-TK	2	N/P = 5	2	
PCL-*g*-PLL(B)	PRL-TK	2	N/P = 10	2	
PCL-*g*-PLL(B)	PGL-B	2	N/P = 10	2	témoin -

Les cellules sont transfectées 4h30, lavées puis replacées en milieu de culture. L'expression est assurée par une incubation supplémentaire de 24h00.

Une lyse des cellules est effectuée. Chaque puits est nettoyé et la totalité du contenu, lysat et surnageant, est récupérée puis centrifugée. Seul le surnageant est analysé au luminomètre.

β) Discussion

- Cytotoxicité :

Au bout de 2h30 de transfection les cellules sont tout à fait normales, sans mortalité particulière observée pour les copolymères PCL-g-PLL et PEI. Des cellules en division sont même observées ce qui constitue un signe de bonne santé. On voit à proximité des cellules des complexes qui se présentent sous forme de petit points noirs d'un diamètre au moins 10 fois inférieur à celui des cellules. Ces complexes sont plus visibles dans le cas des copolymères qu'avec la PEI.

Au bout de 4h30 de transfection aucune différence significative n'est observée. Un changement de milieu est effectué afin de garantir une incubation optimale de 24h. En fin d'incubation les cellules ayant été en contact avec les polymères ne semblent pas affectées par l'étape de transfection. On constate même une augmentation de la surface couverte par ces dernières, signe qu'il n'y a toujours pas de toxicité aigüe des copolymères étudiés.

- Transfection :

Une étude des lysats au luminomètre a permis de comparer l'efficacité de transfection des différents vecteurs utilisés. La grandeur mesurée est exprimée en unité relative de luminescence (RLU) et traduit la quantité de protéines *Luciférase Rénilla* produite suite à l'internalisation et l'expression du plasmide transfecté.

On constate sur la Figure 70 qu'il y a une très bonne reproductibilité des blancs (PGL-2B) avec une RLU de base à environ 1.10^2. Comme cela a déjà été signalé dans la littérature, on constate que les

polyplexes formés à partir de PEI sont les plus efficaces avec plus de trois décades de RLU supplémentaires par rapport aux témoins. Cette efficacité est d'autant plus grande que l'excès de polycation est important avec une décade d'écart entre N/P = 5 et N/P = 10.

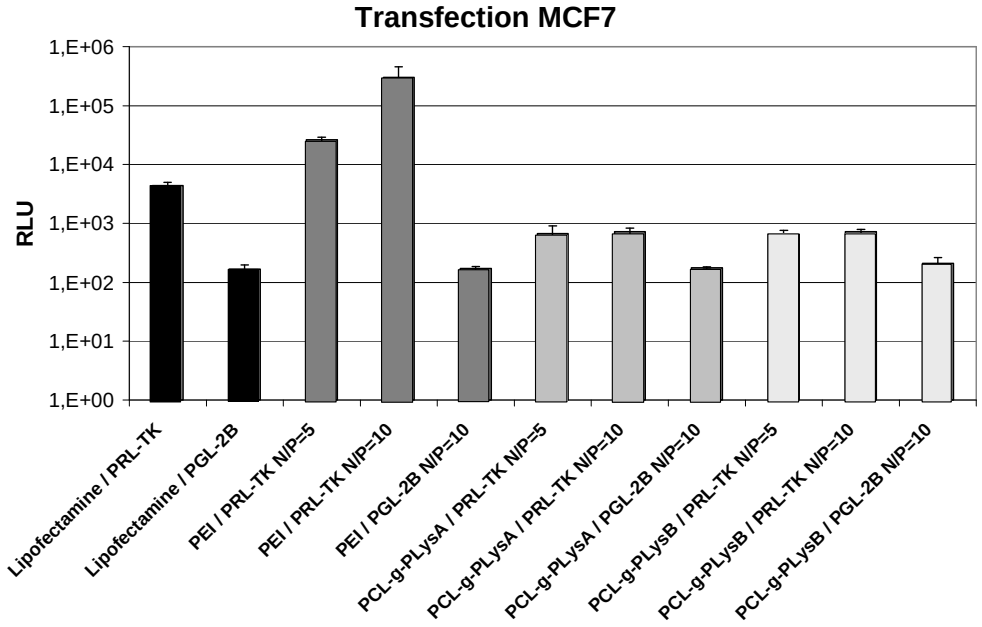


Figure 70 : Efficacités comparées de la transfection de cellules MCF7 par les témoins lipofectamine et PEI et les polyplexes PCL-g-PLL/plasmides

En ce qui concerne les polyplexes PLC-*g*-PLL/plasmide on ne note qu'une faible amélioration de la transfection par rapport aux témoins avec moins d'une décade de RLU supplémentaire ce qui rend nos copolymères moins efficaces que la lipofectamine malgré leur caractère cationique qui les rapproche de la PEI. Etant donné le peu de transfection observé, il n'est pas possible de conclure quant à l'influence de l'architecture même des copolymères sur l'efficacité de transfection.

Le facteur principal pouvant expliquer cette faible efficacité de transfection est l'absence d'effet tampon de nos structures en raison du pKa élevé des chaînes latérales de la lysine ce qui empêche tout mécanisme d'éclatement de l'endosome lié à l'entrée massive de protons, puisque les structures sont internalisées sous une forme déjà protonée. On constate donc que malgré l'hypothèse émise selon laquelle le caractère amphiphile d'un copolymère à base de lysine suffirait à améliorer la libération endosomale, notre structure a vraisemblablement tendance à rester piégée dans l'endosome. Afin de vérifier cette hypothèse il serait intéressant de recommencer ce test en présence de chloroquine. Ce composé est en effet utilisé dans tous les tests *in vitro* utilisant la lysine pour améliorer son efficacité de transfection. Son utilisation permettrait en outre de comparer nos produits aux autres structures à base de lysine existantes.

Ce résultat reste cependant encourageant puisqu'il démontre la possibilité d'utiliser des structures dérivées de la PLC-*g*-PLL en tant qu'agent de transfert (absence de cytotoxicité, complexation,

expression du gène et synthèse de *Luciférase Rénilla* …). Des modifications sont envisageables à partir de ce copolymère de base avec en particulier l'introduction de motifs PEG préconisée par de nombreuses équipes pour apporter un caractère furtif au polyplexe ou le greffage de motifs à activité endosomolytique de type hystidine.

Les méthodes de modifications de PCL décrites dans cette thèse permettent la synthèse de telles structures ce qui ouvre un champ prospectif important d'autant plus que d'autres copolymères préparés au cours de ce travail de thèse peuvent présenter un intérêt en transfection comme la PCL-*g*-PEI (Chap.V).

IV. Conclusion

Cette seconde partie nous a permis de démontrer la grande souplesse de la méthode de greffage de chaînes latérales par une technique de type « grafting from » basé sur la polymérisation anionique de monomères à partir du macroamorceur PCL$^{\ominus}$. Les synthèses décrites ont permis de montrer que le macropolycarbanion peut agir suivant différents mécansimes avec les monomères (ouvertures de doubles liaisons, de cycles…). Un autre point remarquable est la possibilité de réactivation, par le LDA, des segments PCL d'un copolymère déjà formé pour introduire un second type de substituant ou réamorcer une polymérisation. Enfin le potentiel de la polymérisation anionique de macromonomères à partir du squelette PCL$^{\ominus}$ a été illustré (MAPEG) ce qui a permis de montrer qu'en ajustant les conditions de polymérisation, il est vraisemblablement possible d'obtenir des caractères amphiphiles intéressants tout en profitant à la fois des propriétés de dégradabilité de la PCL et des propriétés propres des macromonomères greffés

De nombreuses structures hydrosolubles partiellement ou totalement dégradables de type copolymère greffé à chaîne principale hydrophobe polyester ont ainsi été préparées. Les chaînes hydrosolubilisantes sont de nature variée avec des chaînes neutres hydrophiles (greffage de PEG, macromonomère MAPEG), des chaînes cationiques vinyliques (PCL-*g*-PVP^{+}), méthacryliques (PCL-*g*-PDMAEM^{+}) et polypeptidiques (PCL-*g*-PLL).

Toutes ces structures forment en outre des objets en solution aqueuse dont les dimensions nanométriques les rendent potentiellement intéressants pour un grand nombre d'applications que ce soit dans les domaines industriels classiques ou biomédicaux (vectorisation, transfection).

CHAPITRE IV

POLYMERISATION PAR TRANSFERT D'IODE A PARTIR DE PCL IODEE

La polymérisation anionique amorcée par le macropolycarbanion $PCL^{\ominus}$ permet donc de polymériser plusieurs familles de monomères, tels des dérivés acryliques et des dérivés cycliques d'acides aminés, ce qui donne accès à des structures nouvelles et originales greffées, à chaîne principale hydrophobe. Mais cette stratégie de synthèse présente des inconvénients. Les conditions de réactions sont assez contraignantes, avec en particulier l'obligation de travailler en milieu anhydre, à des températures très basses et dans un solvant ne permettant pas d'utiliser tous les types de monomères. Ce mécanisme est en outre sensible à la présence de fonctions réactives sur les monomères (Chap.III-II-2-a) ce qui restreint les possibilités de greffage d'un squelette PCL par des chaînes cationiques.

Une alternative aux polymérisations ioniques vivantes est de passer par un mécanisme radicalaire qui présente l'avantage de permettre de travailler à des températures comprises entre 0 et 100°C, en milieu aqueux et avec des dérivés fonctionnalisés, en particulier vinyliques. Les dernières études en polymérisation radicalaire ont abouti au développement de techniques dites de polymérisation radicalaire contrôlée. Toutes ces techniques visent à la réalisation de polymérisations vivantes, sans transfert ni terminaison, et sont basées sur un équilibre dynamique entre un radical responsable de la propagation et une espèce dormante. Ce contrôle repose sur un mécanisme d'activation-désactivation réversible entre ces deux espèces, qui passe soit par une réaction de terminaison réversible (Nitroxide et Polymérisation Radicalaire par Transfert d'Atome ATRP), soit par une réaction réversible de transfert de chaîne (Iodine Transfert Polymerization ITP, Transfert de Chaîne par Addition-Fragmentation Réversible RAFT). Ces techniques se caractérisent par une augmentation linéaire de la masse molaire avec le taux de conversion et par des polymolécularités faibles.

La modification par voie anionique de la PCL en présence d'une solution d'iode a conduit à un squelette poly (ε-caprolactone)-*co*-poly (α-iodo-ε-caprolactone) (Chap.II-5-b). La présence de liaisons carbone-iode sur le copolymère permet d'envisager d'effectuer des réactions de polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'iode en utilisant ce squelette polyiodé comme agent de transfert. Cette approche est novatrice et ce type de transfert à partir de macromolécules polyiodées n'a pas, à notre connaissance, été décrit dans la littérature où l'on ne trouve que des exemples de transfert dégénératif d'iode à partir de petite molécules de type iodure d'alkyle[285-288] ou de polymères et télomères ayant un ou deux groupes iodés en extrémité de chaîne[289-291]. L'utilisation d'un squelette polyiodé constitue une stratégie de synthèse de copolymères d'autant plus intéressante que le composé iodé est stable en comparaison des agents de transferts utilisés jusqu'ici. Une autre originalité réside dans le fait que c'est un squelette PCL qui est utilisé pour réaliser une polymérisation radicalaire contrôlée. Très peu d'auteurs se sont intéressés à ce type de réaction et les exemples sont très récents. On trouve des études réalisées sur des polymérisations par ATRP[189,289,292-298] fondées sur l'utilisation d'une ω-bromo PCL , et des polymérisations par NMRP[299,300] (Nitroxide Mediated Radical Polymerization). Une publication fait référence à l'existence d'une ω-iodo PCL qui pourrait

potentiellement être utilisée comme macro-agent de transfert en polymérisation par transfert dégénératif d'iode (ITP)[301]

On se propose dans ce paragraphe d'évaluer la faisabilité de polymérisations par transfert réversible d'iode en présence du macro-agent de transfert PCL iodée. Une première partie décrira les essais préliminaires qui nous ont conduit à étudier de manière plus poussée ce mécanisme. On s'intéressera ensuite à une étude plus systématique de la polymérisation en utilisant d'une part un monomère classique pour lequel ce type de réaction est décrit dans la littérature, puis un monomère fonctionnel donnant accès aux structures amphiphiles cationiques à base PCL qui sont l'objet de cette thèse.

I. Etudes préliminaires :

Le schéma réactionnel d'une polymérisation par transfert d'iode macroamorcée par la PCL iodée est le suivant :

$$AM_j\cdot + PCL-I \rightarrow AM_j-I+PCL\cdot$$
$$PCL\cdot + M \rightarrow PCL-M\cdot$$
$$PCL-M\cdot + (i-1)M \rightarrow PCL-M_i\cdot$$
$$PCL-M_i\cdot + PCL-I \rightarrow PCL-M_i-I+PCL\cdot$$

} Réactions de transferts et propagation

$$PCL-M_i-I+PCL-M_j\cdot \rightarrow PCL-M_i\cdot + PCL-M_j-I$$

} Transfert Dégénératif

$$AM_j\cdot + PCL-M_i\cdot \rightarrow PCL-M_{i+j}-A$$
$$PCL-M_j\cdot + PCL-M_i\cdot \rightarrow PCL-M_{i+j}-PCL$$

} Terminaisons

Figure 71 : Mécanisme de polymérisation radicalaire par transfert dégénératif d'iode

L'étape de transfert dégénératif met en évidence la forme radical activé et la forme dormante de la PCL iodée qui assurent le caractère contrôlé de l'ITP. Ce mécanisme ITP fait en outre apparaître une coexistence inévitable des trois espèces PCL iodée, homopolymère (l'étape de terminaison correspondante n'est pas représentée ici), et copolymère greffé dont la présence a été constatée dans les réactions qui suivent.

Les polymérisations par ITP décrites dans ce premier paragraphe constituent les tous premiers essais réalisés et avaient deux buts principaux. Le premier était de mettre en évidence l'existence d'un greffage sur le squelette polyiodé, ce qui a été réalisé avec l'acétate de vinyle. Le second était de

transposer cette polymérisation à un monomère hydrophilisant et non polymérisable par la voie anionique. Certaines des conditions retenues pour ces essais ne sont donc pas classiques compte tenu de celles décrites dans la littérature (température élevée, temps de réaction long), mais ont été choisies afin de faciliter la mise en évidence du greffage, que celui-ci passe par un mécanisme contrôlé ou non.

1) Acétate de vinyle

Les premiers essais ont été réalisés dans les conditions décrites par Iovu et Matyjaszewski[287] qui ont appliqué ce type de mécanisme à la polymérisation de l'acétate de vinyle. On s'est donc naturellement tourné vers ce monomère. Cette synthèse est en outre d'autant plus intéressante qu'elle permettrait d'aboutir à la structure PCL-*g*-PVAc qui n'a pas pu être obtenue de manière satisfaisante par macroamorçage anionique (Chap.III-I-1).

La polymérisation a été réalisée en présence de PCL iodée à 13 % utilisée comme macro-agent de transfert, ou en présence de PCL commerciale qui joue le rôle de témoin. Les conditions et résultats sont réunis dans le Tableau 31 :

Tableau 31 : Polymérisation de l'acétate de vinyle en présence de PCL iodée

Essai	**Rapport des concentrations [Acétate de Vinyle] / [C-I] / [AIBN]**			**T** (°C)	**Durée de réaction**	**% molaire PCL/PVAc**	**Mn et Ip** (g/mol)
Iovu[287]	500**	0,5*	0,3	60-80°C	24h	/	5-10000
Témoin PCL		/	0,3	75°C	18 h***	/	65000 / 3,0
Essai PCL-I		0,5*	0,7****	75°C	3 jrs	57 / 43	14000 / 2,7

* *rapport de concentration en liaisons C-I présentes sur le copolymère et jouant le rôle d'agent de transfert.*
** *polymérisation en masse*
*** *prise en masse*
**** *obligation de réamorcer après 24 heures car pas de polymérisation.*

La comparaison entre la réaction témoin et l'essai utilisant la PCL iodée montre qu'il existe une influence de l'iode sur la polymérisation. Le premier effet remarquable est un effet retard, avec une obligation de réamorçage dans le cas où le squelette polyiodé est présent. Ceci est en accord avec ce qui avait été observé par Iovu *et al.*[287]. Le second effet est une certaine inhibition de la réaction puisqu'une prise en masse du milieu a été constatée après 18 heures dans le cadre de la réaction témoin alors que le milieu reste homogène avec la PCL iodée (degré d'avancement faible). On constate également qu'un greffage a été obtenu puisque l'analyse par RMN ^{1}H du produit de réaction avec la PCL iodée a montré qu'il s'agit d'un copolymère contenant 57% de motifs PCL et 43% de motifs poly(acétate de vinyle). Il faut enfin noter les différences importantes qui existent entre les masses molaires et indices de polymolécularité des différents polymères. On observe une masse élevée et un indice grand en absence de PCL iodée, alors que dans un même temps le copolymère greffé obtenu a une masse molaire et un indice de polymolécularité proches de ceux de la PCL iodée de

départ ($\overline{Mn}$ =14000 et Ip = 2,7 contre $\overline{Mn}$ =13800 et Ip = 2,5 respectivement) ce qui indiquerait que les greffons de PVAc sont courts et que l'on a un certain contrôle de la polymérisation.
Tous ces indices vont dans le sens d'un mécanisme ITP, plus ou moins contrôlé, dans lequel la PCL iodée jouerait le rôle d'un macro-agent de transfert et suite à ce premier essai encourageant un monomère fonctionnel hydrophile a été testé.

2) N,N-(diméthylaminopropyl) méthacrylamide :

a) Synthèses et analyses

Notre but étant de synthétiser des copolymères greffés amphiphiles à base de PCL, on s'est intéressé au monomère N,N-(diméthylaminopropyl) méthacrylamide qui lui non plus n'a pu être copolymérisé avec la PCL par macroamorçage anionique en raison de la présence de la fonction amide secondaire.
Afin de favoriser la solubilisation de la PCL iodée la réaction a été effectuée dans le toluène avec des rapports de concentrations en monomère, liaisons C-I et AIBN de 40 ; 0,5 et 0,35 respectivement. Le milieu a été agité 90 heures à 95°C, température permettant d'améliorer la solubilité du squelette iodé, mais qui peut entraîner une déstabilisation de la liaison C-I. Les résultats des analyses par RMN ^{1}H et CES (en phase organique et en phase aqueuse) sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 32 : Caractéristiques du copolymère PCL-g-PDMAPMA

Durée de réaction (h)	**% molaire PCL/PDMAPMA**	**Masse molaire / Ip Tampon phosphate**	**Masse molaire / Ip THF**
24	20 / 80	/	/
90	25 / 75	3000 / 1,75	6500 / 1,55

On constate que les compositions n'évoluent pas entre 24 et 90 heures de réaction avec une majorité de motifs méthacrylamide dans le copolymère. Cette forte teneur en monomère hydrosolubilisant explique la solubilité du copolymère en milieu aqueux. Une analyse IR d'un film réalisé par évaporation d'une solution de polymère dans l'eau a présenté la bande à 1734 cm^{-1} caractéristique de l'ester du squelette PCL ce qui prouve que le squelette a été greffé puisque même les oligomères de PCL sont normalement non hydrosolubles. Les analyses CES soulignent le caractère amphiphile de la structure synthétisée avec en particulier une impossibilité à définir clairement la masse molaire de ces macromolécules. Elles sont en effet susceptibles de s'accrocher sur les colonnes (cas classique pour les polyamines), de changer de conformation en fonction du milieu, voire même de s'organiser pour former des objets colloïdaux dans l'eau. Cette hypothèse a été confirmée par étude d'une solution aqueuse du copolymère (10 mg/cm3) par diffusion dynamique de la lumière après filtration de la solution sur des filtres 0,45µm. Le copolymère PCL-*g*-PDMAPMA forme des objets d'un diamètre de 57 nm environ avec une bonne monodispersité (Fig.72).

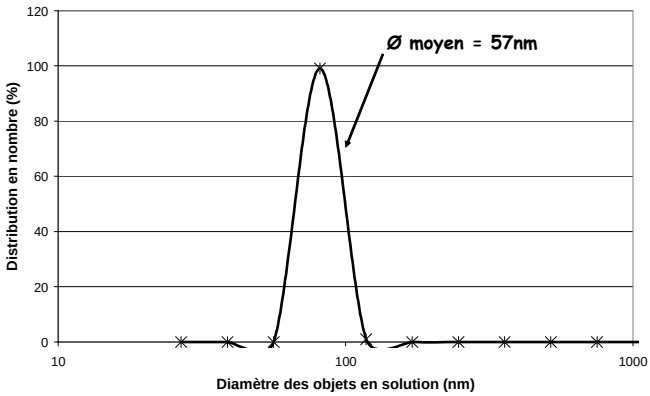


Figure 72 : Diffusion dynamique de la lumière d'une solution de PCL-g-PDMAPMA

b) Analyse du spectre UV du copolymère

Tous les résultats vont dans le sens d'un greffage de chaînes PDMAPMA sur le squelette PCL-I. Afin de confirmer cette tendance, un détecteur à barrette de diodes (PDA) a été couplé au détecteur RI en sortie de colonne CES. Ce type de détecteur permet d'obtenir à chaque instant le spectre complet d'absorption UV du produit pour toutes les longueurs d'ondes comprises entre 220 et 450 nm, et donc de déterminer la composition d'un produit dont le signal en UV présente plusieurs pics caractéristiques d'absorption.

Les produits de départ ont été analysés par cette méthode afin d'établir leurs spectres caractéristiques. Pour la PCL-iodée on observe des bandes à λ_{max} = 240-250 nm et $\lambda_{secondaire}$ = 310-320 nm (Fig.73), pour PCL une absorption très faible à λ_{max} = 235 nm. Le toluène utilisé comme solvant de polymérisation absorbe quant à lui à λ_{max} = 260 nm.

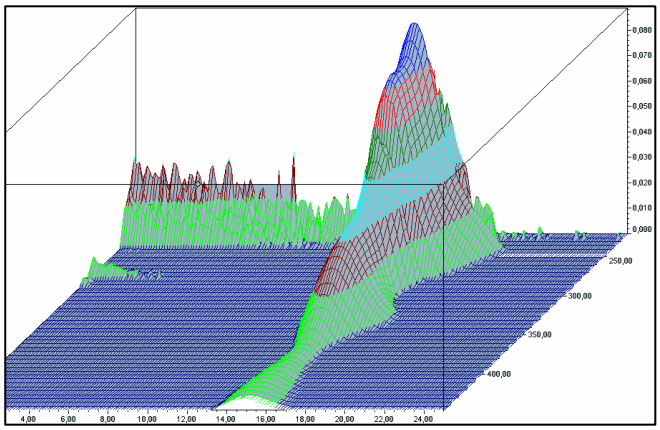
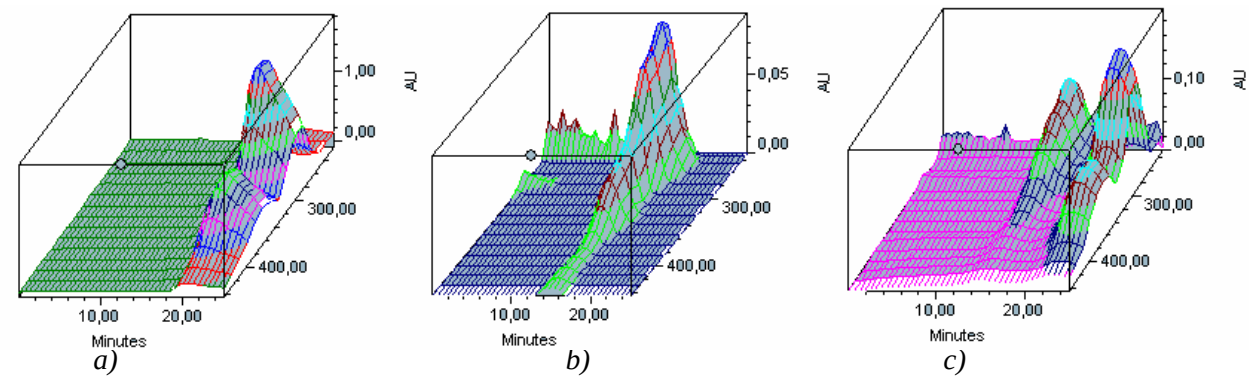


Figure 73 : Chromatogramme 3D (UV) de PCL iodée à 13%

D'après la Figure 74, une solution de PCL iodée dans le THF libère de l'iode dans le milieu assez rapidement puisque après 24 heures seulement on observe l'apparition des pics d'absorption dus à l'iode, alors que ces derniers étaient absents dans la solution fraîche. Il y a donc a priori soit libération d'iode pris dans la matrice polymère, soit dismutation de la liaison C-I dès que le copolymère iodé est

mis en solution. Dans le cadre d'une utilisation de la PCL iodée en tant qu'agent de transfert pour polymérisations radicalaires il faudra n'utiliser que des solutions fraîchement préparées.



a) *b)* *c)*

Figure 74 : Etude de la libération d'iode en solution
a) I_2 dans THF ; b) PCL-I dans THF (0 min) ; c) PCL-I dans THF 24h

L'analyse par CES d'une solution de polymère PCL-*g*-PDMAPMA donne un chromatogramme comportant 3 pics (Fig.75) :

- le premier pic correspond à une PCL iodée non greffée puisque le pic ne traîne pas sur la colonne et sort au même temps de rétention (1).

- le second pic, aux alentours de 19 minutes, semble être celui du copolymère puisqu'il présente les absorptions d'une PCL iodée (λ_{max} = 245 nm et $\lambda_{secondaire}$ = 300 nm) et d'un autre motif qui absorbe à λ= 260 nm. Ce dernier peut correspondre aux greffons PDMAPMA porteur d'iode en extrémité de chaîne (2).

-enfin un troisième pic totalement hors calibration pourrait correspondre à des oligomères de PDMAPMA non iodés (3).

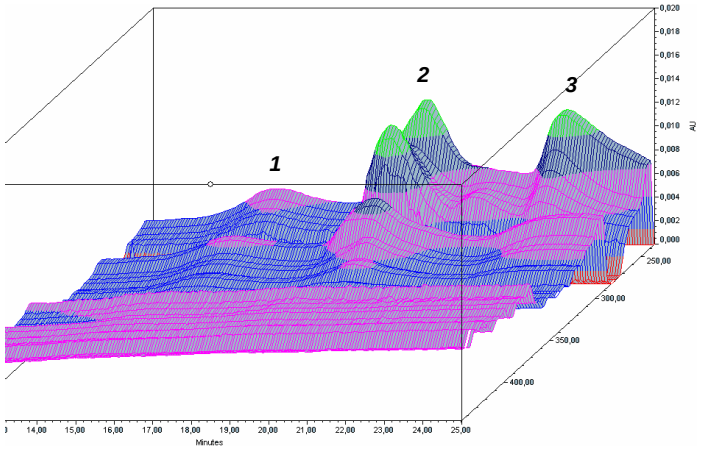


Figure 75 :Chromatogramme3D (UV) obtenu pour le copolymère PCL-g-PDMAPMA

La coexistence de ces trois produits a déjà été évoquée en introduciton et n'est pas surprenante au vu du mécanisme attendu.

Il est très difficile de conclure clairement étant donné la structure même du copolymère qui est à la fois amphiphile et polyaminé ce qui rend les déterminations par CES relativement aléatoires. Il semble cependant d'après toutes les analyses effectuées qu'un copolymère hydrosoluble PCL-*g*-PDMAPMA ait été obtenu par amorçage radicalaire et polymérisation par transfert d'iode de la PCL iodée.

D'autres essais, que l'on ne développera pas ici, sont résumés dans le Tableau 33. Des monomères de divers types ont été testés, avec en particulier deux dérivés vinyliques, deux dérivés méthacryliques, un composé acrylamide et un composé méthacrylamide. Ces essais de polymérisation ont conduit aux même conclusions que celles données ci-dessus, ce qui a motivé l'étude plus poussée du mécanisme de polymérisation par transfert d'iode à partir de PCL iodée. Cette étude est l'objet de la partie qui suit.

Tableau 33 : Monomères testés en ITP à parti de la PCL iodée dans les conditions décrites par Iovu[287]

Comonomères (M)	**[M] / [C-I] / [A]**	**T** (°C)	**Durée** (jours)	**Composition mol. PCL/M**	**Remarques**
Acétate de vinyle	500 / 0,5 / 0,7	75	3	57 / 43	Cf. I-1
Pivalate de vinyle	500 / 0,5 / 0,5		7	95 / 5	Rdt faible en pivalate
MMA	500 / 0,5 / 0,3		0,17	2 / 98	Pas de contrôle, homopolymérisation ?
ADAM quat	500 / 0,5 / 0,6	95	8	?	Impossibilité de conclure en raison du caractère amphiphile, réaction en milieu eau/DMSO
DMA	125 / 0,5 / 0,35		4	75 / 25	Réaction semble fonctionner
DMAPMA	40 / 0,5 / 0,35		4	25 / 75	Cf. I-2, hydrosoluble

II. Etude systématique de la polymérisation par transfert dégénératif d'iode à partir de PCL iodée

1) Conditions

Les expériences qui suivent ont été effectuées dans des conditions proches de celles décrites par Gaynor *et al*[285] avec en particulier une concentration en amorceur radicalaire [AIBN] = 0,03 M et en agent de transfert, ici représenté par la liaison carbone-iode, [C-I] = 0,1 M. La différence se situe au niveau de l'utilisation d'un solvant et d'une température plus élevée. En effet, l'agent de transfert étant un polymère (PCL iodée), la réaction de polymérisation n'est pas effectuée en masse, mais dans du toluène afin de permettre, d'une part, la solubilisation de l'agent de transfert macromoléculaire, et, d'autre part, de limiter l'augmentation de température due à l'exothermie de la réaction de polymérisation. La température retenue est 65°C, elle est volontairement supérieure à celle indiquée car l'agent de transfert utilisé est un polymère ce qui entraîne des problèmes de mobilité du réactif dus

à l'encombrement stérique. Les monomères utilisés ont été au préalable distillés afin d'éliminer toute trace d'inhibiteur.

Les concentrations ont été ajustées en se fondant sur la formule suivante qui relie le degré de polymérisation aux concentrations initiales.

$$\overline{DP_{visé}} = \frac{[M]_0}{[AT]_0 + [AIBN]_0}$$ *(AT = Agent de Transfert, les liaisons C-I dans cette étude)*

<u>Rq</u> : Il s'agit d'une approximation puisque le facteur d'efficacité f est ici pris égal à 1 et que l'on néglige les dismutations ce dernier point étant généralement vrai pour le styrène et les acrylates.

Les réactions ont été effectuées sous agitation magnétique dans des tubes à essais bouchés par un septum.

Des prélèvements (0,2 ml) ont été effectués au cours de la réaction afin de déterminer les compositions molaires (par RMN) et les masses molaires (par CES) des copolymères formés. Ces derniers ont été isolés par prélèvement direct du milieu réactionnel, élimination du solvant et des monomères résiduels par évaporation sous vide, puis précipitation de l'huile obtenue dans de l'éther diéthylique :

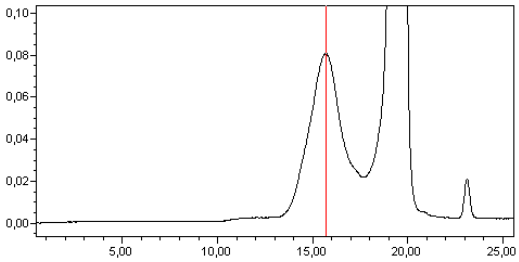
- en cas de précipitation directe, le produit a été décanté puis lavé avec ce même solvant avant d'être séché sous vide.
- en absence de précipitation, l'éther diéthylique a été éliminé par évaporation et le résidu solide (voire cireux) restant a été soumis à un vide poussé (environ 1.10-3 bar) pour éliminer toute trace de monomère et sécher le produit.

2) <u>Styrène</u>

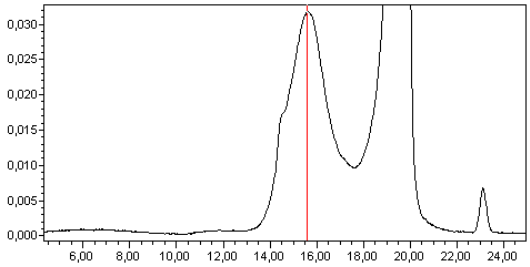
La première réaction a été réalisée avec le styrène sans distillation préalable, ce qui a été compensé par l'utilisation d'un léger excès d'AIBN pour inhiber le stabilisant. Après 64 heures de réaction, deux fractions ont été récupérées, l'une solide (F1) minoritaire, l'autre huileuse (F2) majoritaire. Ces produits ont été analysés par RMN ^{1}H et CES couplée à un détecteur mesurant les variations d'indice de réfraction (RI).

Les analyses effectuées sur l'huile F2 montrent qu'elle est composée à 93% de PS (signal à 7,3 ppm) et 7% de PCL. L'analyse par CES ne fait apparaître qu'un pic correspondant à des oligomères.

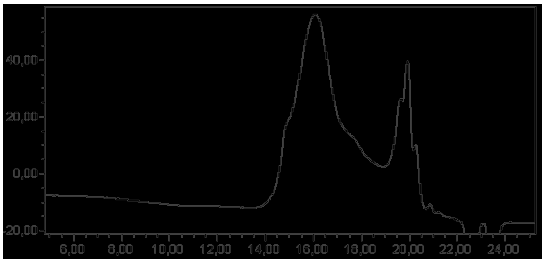
La fraction F1 est composée de 75% de PCL et 25% de PS. Afin de vérifier que le produit récupéré est bien un copolymère greffé, une CES a été effectuée avec un détecteur PDA. La détection réfractométrique révèle un pic majoritaire de polymère et un petit pic hors calibration. La détection UV révèle une absorption forte à 240 nm qui peut correspondre à des oligomères de PCL iodée puisqu'elle est observée pour le produit de départ. Le pic majoritaire est composé de deux fractions mises en évidence en faisant varier les longueurs d'onde d'absorption (Fig.76).



a) Chromatogramme à 240 nm



b) Chromatogramme à 261 nm



c) Chromatogramme détecteur RI

Figure 76 : Analyses par CES du copolymère PCL-g-PS

A 240 nm, le chromatogramme semble monomodal avec un temps de rétention équivalent à celui de la PCL iodée, il s'agit du polymère de départ non substitué (Fig.76a). En se plaçant à 261 nm, maximum d'absorption du polystyrène, un épaulement apparaît vers les fortes masses (Fig.76b). On en déduit qu'il existe une population de chaînes PCL greffées par des chaînons de PS et que ces derniers sont suffisamment longs pour avoir un effet sur le temps de rétention.

L'existence de ces deux fractions s'explique par la coexistence de deux mécanismes de polymérisation : le premier est une homopolymérisation du styrène limitée à la formation d'oligomères en raison de la présence d'iode, le second est la polymérisation radicalaire par transfert dégénératif d'iode du PS sur la squelette PCL iodé. Ce premier essai a donc permis l'obtention d'un copolymère PCL-*g*-PS par le mécanisme ITP attendu. Ce produit est cependant minoritaire et d'autres essais doivent confirmer ce mécanisme.

3) Acrylate de Butyle : concentration faible en amorceur

a) Réaction

L'utilisation de ce monomère doit permettre de se rapprocher des conditions décrites par Gaynor[285]. La PCL iodée de départ présente un taux de substitution de 13% environ.

Afin d'établir l'influence du monomère, deux $\overline{DPn}$ différents ont été visés : 10 et 50. Les deux réactions ont été effectuées en parallèle avec des conditions résumées dans le Tableau 34.

Tableau 34 : Conditions de polymérisation de l'acrylate de butyle

Concentrations (mol/L)	**DP 10**	**DP 50** *
$[C\text{-}I]_0$	0,1	0,06**
$[AIBN]_0$	0,03	0,02**
$[ABu]_0$	1,2	3,4

* *DP = 40 en fait d'après la formule donnée*

** *les concentrations calculées par la formule du DP visé sont légèrement différentes de celles décrites dans la publication, mais le rapport $[C\text{-}I]_0/[AIBN]_0$ est le même dans les deux cas*

Comme on le verra, après deux jours de réaction la polymérisation n'ayant pratiquement pas eu lieu, (cf. pourcentages molaires d'ABu dans les copolymères) un réamorçage a été effectué. Ce retard, voire cette inhibition de la réaction peut être expliquer par la présence d'iode dans le milieu[289]. Une quantité d'amorceur égale à la quantité initiale a été ajoutée au milieu réactionnel. L'AIBN a été solubilisé dans la quantité de toluène nécessaire pour maintenir le volume de départ (compensation des prélèvements). Les concentrations sont donc mal connues en fin de compte.

b) Résultats

i. Masses molaires :

Les masses molaires des copolymères formés ont été déterminées par utilisation d'une colonne CES THF couplée à un détecteur RI. Les chromatogrammes obtenus sont donnés ci-dessous (Fig.77 et 78). On constate que dans les deux essais les pics obtenus sont monomodaux. Les masses molaires obtenues sont données dans le Tableau 35. Pour les derniers échantillons prélevés, le milieu réactionnel a pris en masse dans le cas du $\overline{DPn}$ 50 visé, tandis que seule une viscosité élevée a été observée pour le $\overline{DPn}$ 10 visé.

ii. RMN ^1H :

Les analyses par RMN ont été effectuées dans $CDCl_3$. Les pourcentages molaires observés sont donnés dans le Tableau 35.

Tableau 35 : Caractéristiques des copolymères PCL-g-PABu obtenus

DP 10	**Réaction** (h)	**PABu %**	**Mn** (g/mol)	**Mw** (g/mol)	**Ip**
PCL-I	0	0	8150	21850	2,7
Copo 1	2	0	11900	39850	3,3
Copo 2	17	0	13250	32050	2,4
Copo 3	22	0	9650	28650	3,0
Copo 4	45	3	8150	16900	2,1
Copo 5	113	11	10700	27300	2 ,6

DP 50	**Réaction** (h)	**PABu %**	**Mn** (g/mol)	**Mw** (g/mol)	**Ip**
PCL-I	0	0	8150	21850	2,7
Copo 1	2	5	9900	26600	2,7
Copo 2	20	6,5	14600	33300	2,3
Copo 3	27	5	11150	36800	3,3
Copo 4	48	11	18700	41900	2,2
Copo 5	116	86	13100	40750	3,1

Les tendances observées ne semblent pas identiques en fonction du $\overline{DPn}$ visé au départ pour les greffons de poly (acrylate de butyle).

Pour l'essai visant un $\overline{DPn}$ 10, les masses molaires tendent à diminuer avec la durée de réaction après une augmentation nette par rapport à la PCL-I dans les toutes premières heures (Fig. 77). L'augmentation initiale ne s'accompagne pas d'une augmentation de la teneur en ABu et traduit vraisemblablement l'existence d'une réaction de couplage intermoléculaire due à la réactivité de la liaison C-I. La diminution qui suit est continue et est accompagnée de très faibles taux d'ABu dans le copolymère jusqu'au réamorçage, on observe alors une augmentation de la teneur en ABu dans le copolymère avec des taux passant de 0-3% à 11% (Fig. 79). Dans le même temps la masse molaire augmente. A priori, la quantité initiale d'AIBN est trop faible puisque le réamorçage permet de greffer le comonomère sur le squelette PCL (taux et masses augmentent).

Dans le cas de l'essai visant l'obtention de greffons dotés d'un $\overline{DPn}$ 50, les conclusions sont différentes. Là encore les pourcentages molaires en ABu restent faibles avant réamorçage avec des valeurs allant de 5 à 11%, mais même si la propagation est lente, la réaction de polymérisation a lieu et s'accompagne d'une augmentation nette des masses molaires (Fig.78 et 79).

Le réamorçage entraîne une augmentation significative de la teneur en ABu dans le copolymère puisqu'on passe de 11% à 86%. Il se peut que le contrôle de la polymérisation ne se fasse pas à partir du moment où le rapport [C-I]/[AIBN] est trop différent de celui préconisé par Gaynor[285].

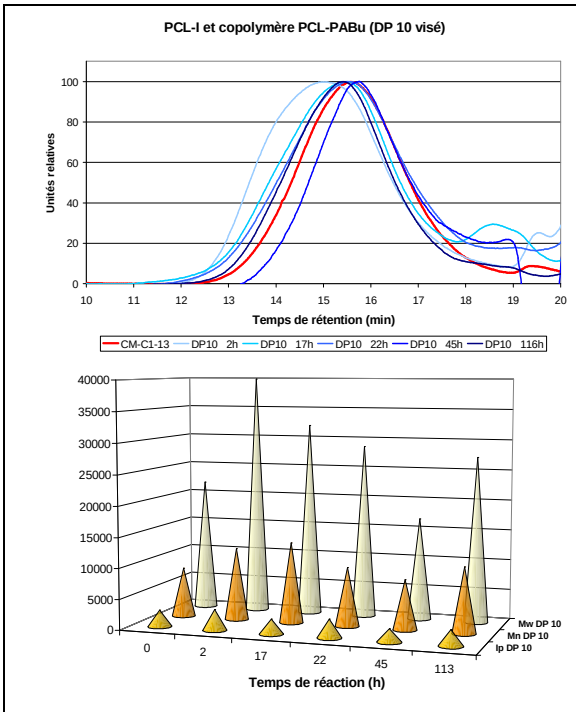


Fig. 77 : PCL-g-PABu DPn visé 10, évolution des

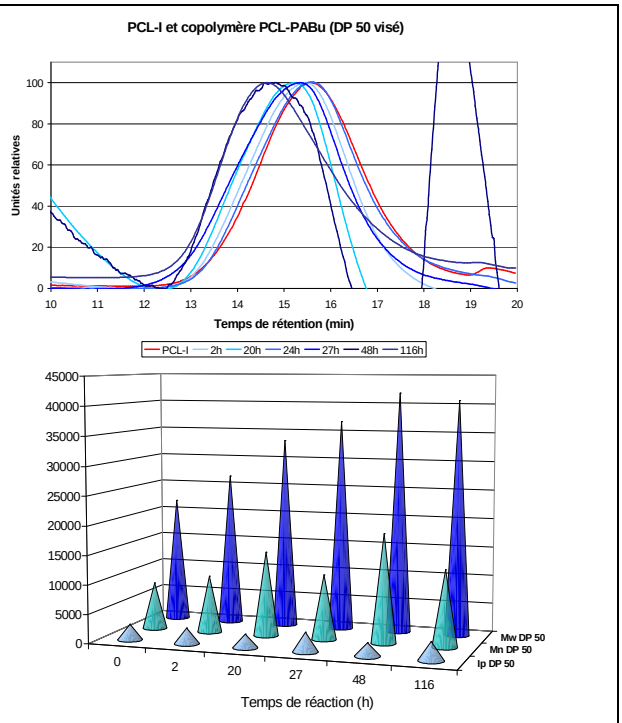


Fig. 78 : PCL-g-PABu DPn visé 50, évolution des

masses molaires	*masses molaires*

Cette hypothèse semble être confirmée par l'apparation d'un pic correspondant à des oligomères sur le chromatogramme post-réamorçage (Fig.78 116h). Ces oligomères sont vraisemblablement de courtes chaînes de PABu non greffées ce qui explique que l'on n'observe pas d'augmentation de masses molaires avant et après réamorçage alors que dans un même temps une augmentation brusque de la teneur en PABu est constatée en RMN.

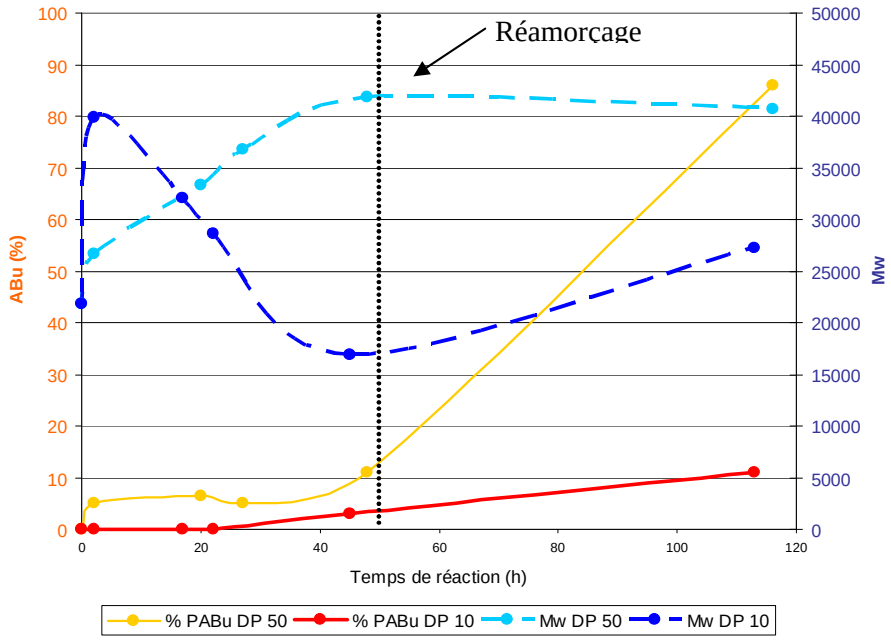


Fig. 79 : PCL-g-PABu : Composition et masse molaire en fonction du temps de réaction

c) Conclusion

Les pics observés en CES (Ip forts, monomodalité) ainsi que les compositions obtenues par RMN indiquent que des chaînes de poly (ABu) sont effectivement greffées sur le squelette PCL. Il y a donc polymérisation, mais le fait que cette dernière passe par un mécanisme de type transfert dégénératif, avec en particulier un contrôle des masses molaires des chaînes en croissance et un caractère vivant des extrémité de chaînes (liaison C-I), reste à démontrer. Le réamorçage effectué après 48h, en amorçant l'homopolymérisation d'oligomères d'ABu, n'a pas permis de conclure au contrôle. Afin d'éviter cette homopolymérisation de l'ABu, un second essai avec l'acrylate de butyle a été réalisé en utilisant une quantité suffisante d'AIBN pour ne pas réamorcer en cours de réaction.

4) Acrylate de butyle : concentration élevée en amorceur

a) Réaction

La polymérisation est effectuée à 75°C avec une concentration initiale en AIBN doublée par rapport au premier essai.

Tableau 36 : Conditions de polymérisation de l'acrylate de butyle

Concentrations (mol/L)	**DP 7**	**DP 32**
$[C\text{-}I]_0$	0,1	0,065
$[AIBN]_0^*$	0,063	0,039
$[ABu]_0$	1,17	3,4

b) Résultats

Le milieu réactionnel dans le cas du $\overline{DPn}$ 32 est visqueux dès le premier prélèvement effectué après 2h de réaction. Ce n'est pas le cas du $\overline{DPn}$ 7 dont l'augmentation de viscosité n'est remarquée qu'au dernier prélèvement (30 heures de réaction).
Les conditions d'analyse sont les mêmes que dans le premier essai, et les masses molaires ainsi que les compositions obtenues sont données dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Copolymères PCL-g-PABu obtenus

DP7	**Réaction** (h)	**PABu %**	**Mn** (g/mol)	**Mw** (g/mol)	**Ip**
PCL-I	0	0	6100	16400	2,7
Copo 1	2	3	8550	22200	2,6
Copo 2	6	67	4000	16550	4,1
Copo 3	22	67	4300	16100	4,0
Copo 4	30	62	4250	17200	3,8

DP32	**Réaction** (h)	**PABu %**	**Mn** (g/mol)	**Mw** (g/mol)	**Ip**
PCL-I	0	0	6600	18300	2,8
Copo 1	2	92	7700	39300	5,1
Copo 2	6	64	8350	45150	5,4
Copo 3	22	92	8100	41400	5,1
Copo 4	30	85	/	/	/

La première remarque est que dans les deux cas, $\overline{DPn}$ 32 et $\overline{DPn}$ 7, la teneur en ABu dans les copolymères est maximale après 2 heures de réaction avec environ 90% d'ABu dans le premier cas, et 65% dans le second (Fig.80). En considérant les quantités initiales de PCL et d'acrylate de butyle, et en admettant que tout le monomère est consommé, on s'attend à avoir 87% d'ABu dans le copolymère où un $\overline{DPn}$ 32 est visé, et 60% dans le cas d'un $\overline{DPn}$ 7. Ces chiffres sont en accord avec les compositions calculées d'après les RMN.

Tout le monomère est donc consommé très rapidement, mais ceci ne remet pas forcèment en question le contrôle de la réaction de polymérisation par notre macro-agent de transfert. Il semble par contre que la quantité d'amorceur utilisé est suffisante (voire en excès), puisque dans le premier essai, pour 40 heures de réaction les taux atteints ne sont que de 3 et 11% (à 65°C contre 75°C ici).

La forte teneur en ABu des polymères analysés par RMN doit cependant être relativisée étant donné qu'il est possible que, comme dans le cas du polystyrène, et du réamorçage décrit précédemment, de l'homopolymère PABu soit présent.

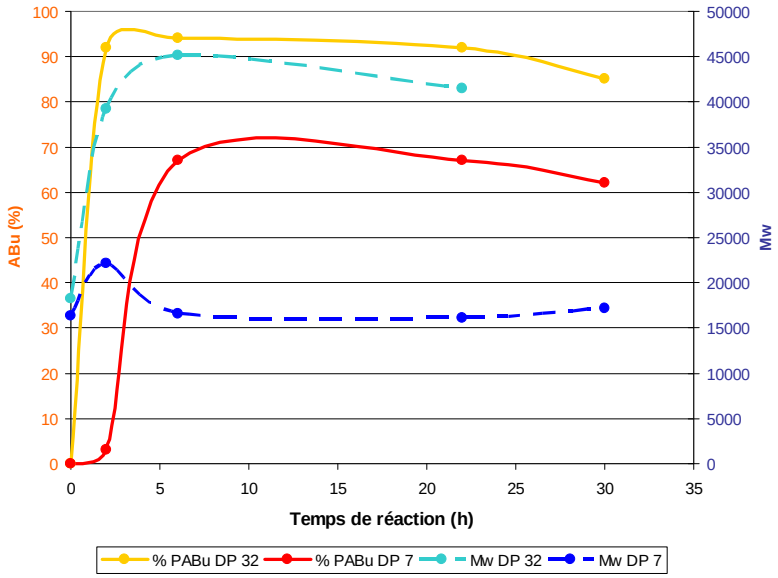


Figure 80 : PCL-g-PABu : Composition et masse molaire en fonction du temps de réaction

Afin de vérifier que les produits obtenus sont bien des copolymères greffés, la technique de CES couplée au PDA a été utilisée. L'homopolymère PABu possède un maximum d'absorption à λ_{max} = 240 nm comme la PCL iodée (Fig.81b). Cette dernière possède cependant une absorption secondaire à $\lambda_{secondaire}$ = 310-320 nm (Fig.73) qui permet de différencier les deux polymères et de conclure quant à la nature des produits obtenus.

Les copolymères n'ont pas tous été étudiés par cette méthode. On ne s'est intéressé qu'à l'échantillon noté « copo 2 » pour le $\overline{DPn}$ 32 (95% de PABu) (Fig.81 et 82).

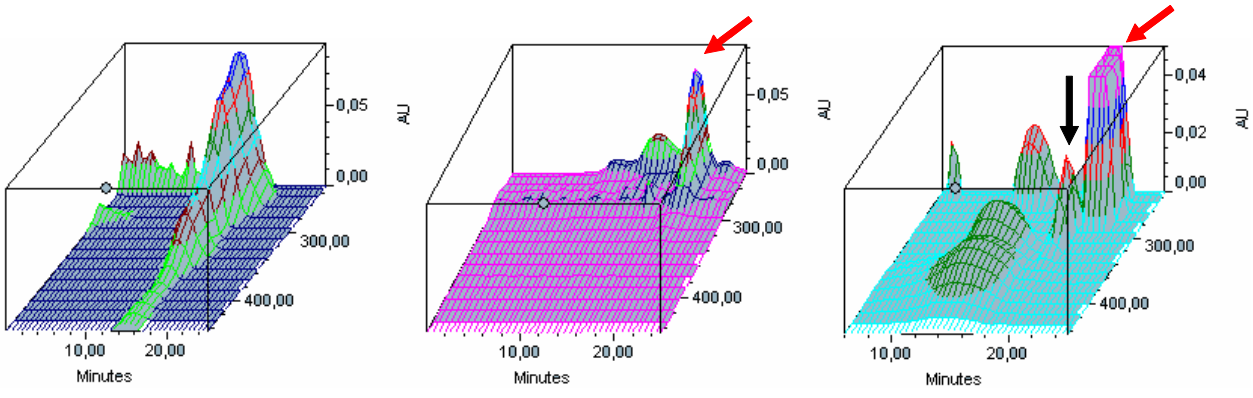


Figure 81 : a) PCL-I de départ ; b) Poly(Acrylate de Butyle) ; c) « Copo 2 » DP 32 95% ABu

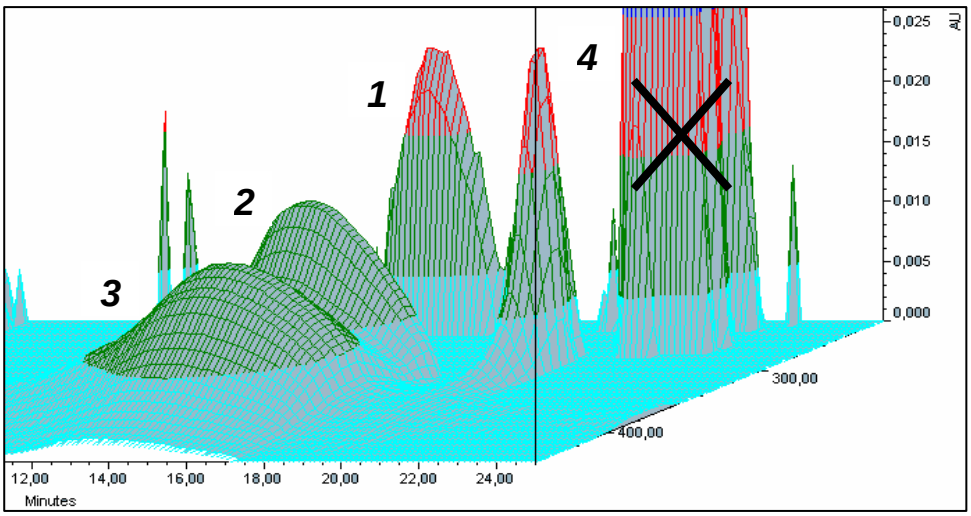


Figure 82 : Agrandissement du chromatogramme c de la figure 81

Les Figures 81 et 82 montrent que nous sommes en présence de copolymères avec vers 14 minutes un maximum d'absorbance à 240 nm correspondant à l'ABu (pic 1) et des absorbances secondaires à 310 et 360nm correspondant à la partie PCL iodée (pic 2 et 3). Le pic signalé par la flèche rouge (Fig.81) est due au toluène résiduel.

On observe un pic un peu avant 20 minutes (flèche noire Fig.81, pic 4 Fig.82). Pour déterminer la nature du produit correspondant à ce pic, un dérivé iodo-alkyle de faible masse molaire a été injecté. La Figure 83 correspond au chromatogramme obtenu pour l'iododécane. Le maximum d'absorbance est obtenu entre 240 et 280 nm avec λ_{max}=260 nm. Le produit correspondant au pic 4 présente un λ_{max} à 280 nm. Il pourrait s'agir d'une chaîne iodée de poly(acrylate de butyle). Cette iodation serait directement due au mécanisme de la polymérisation :

$AM_j \cdot + PCL - I \rightarrow AM_j - I + PCL \cdot$, avec M l'acrylate de butyle et A l'amorceur radicalaire et j petit.

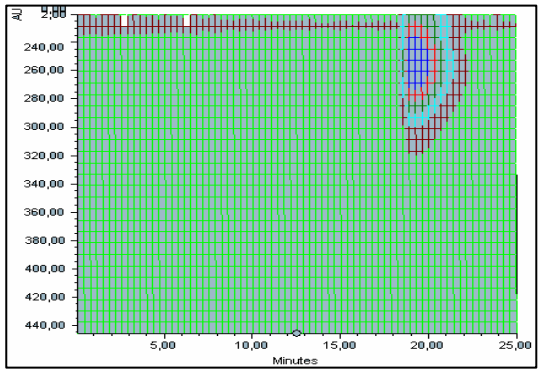


Figure 83 : Iododécane en CES avec détection par le détecteur à barrette de diode

On peut conclure quant aux compositions estimées par RMN. La forte teneur en ABu est due à la présence de deux types de produits détectés à l'aide du détecteur à barrette de diodes. Ces produits

sont du poly(acrylate de butyle) iodé pour l'un, et du copolymère PCL-*g*-PABu pour l'autre. Si l'on considère les chromatogrammes obtenus à l'aide du réfractomètre, on ne voit que le pic correspondant au copolymère, il n'y a pas de pic de PABu. Mais ceci ne signifie pas pour autant que l'homopolymère est très minoritaire. En effet, à concentration égale, la PCL iodée donne une réponse beaucoup plus importante en réfractométrie que le PABu (influence de dn/dC). Par réfractométrie il est donc normal de ne voir que le copolymère à base de PCL iodée.

Les compositions calculées par RMN ne correspondent donc pas obligatoirement aux proportions dans le copolymère puisqu'il n'est pas possible avec cette technique de distinguer entre les motifs ABu contenus dans le copolymère et ceux sous forme d'homopolymère. On peut cependant s'intéresser à l'évolution des masses molaires puisque l'homopolymère PABu n'est présent que sous la forme d'oligomères (Fig.82 pic 4)

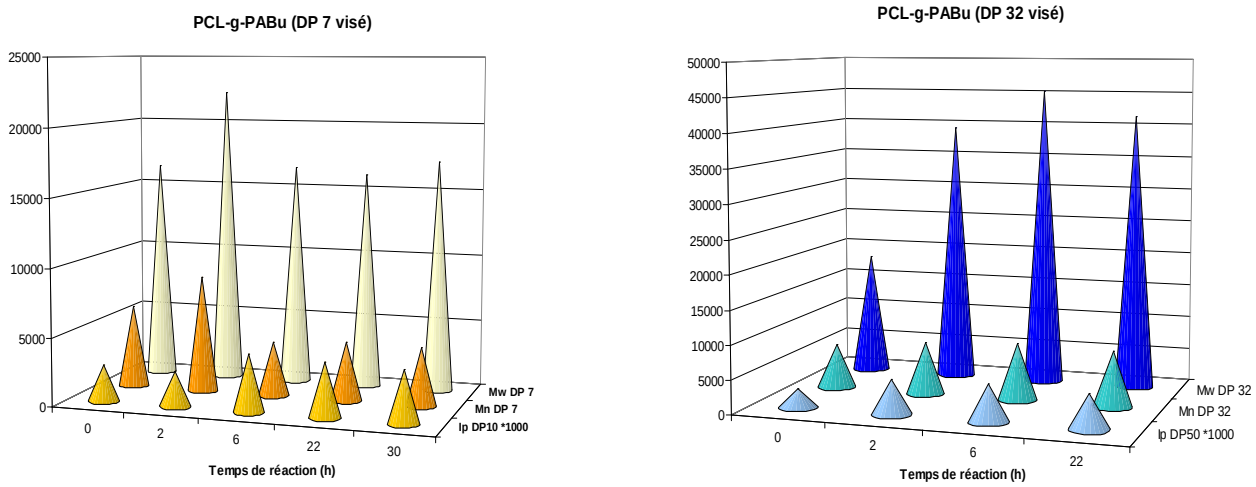


Figure 84 : Masses molaires et polymolécularité en fonction du temps PCL-g-PABu

On remarque la forte polymolécularité qui résulte de la copolymérisation avec des indices allant jusqu'à 5 pour le copolymère (Tab.37, Fig.84). Ceci tend à montrer que le greffage a bien eu lieu et que les produits obtenus sont des copolymères. En fin de polymérisation les masses molaires en nombre sont autour de 4000 g/mol dans le cas du DP 7 et 8000 g/mol pour le DP 32 mais ces valeurs sont atteintes rapidement, entre 2 et 6 heures, ce qui confirme que l'amorçage est beaucoup plus rapide du fait de la quantité d'AIBN utilisée.

Cependant, aucune diminution particulière de la masse molaire au cours du temps n'est observée ici. Ceci s'explique par des temps de réaction plus courts liés à un amorçage et une propagation rapides. Les chaînes croissent donc plus rapidement et cette croissance compense les coupures éventuelles de la chaîne polyester.

c) Conclusion

Les analyses effectuées (CES, RMN) permettent, comme c'était le cas pour le premier essai, de conclure à la formation d'un copolymère PCL-*g*-PABu.

Cependant le problème du contrôle de la polymérisation se pose une nouvelle fois puisque le doublement des quantités initiales d'AIBN a entraîné une polymérisation rapide du comonomère ABu, alors que celle-ci était trop lente au cours du premier essai. Une quantité intermédiaire d'amorceur devrait palier ce problème mais un tel essai n'a pas été réalisé étant donné que l'étude des conditions optimales de polymérisation n'est pas l'objet premier de cette thèse.

L'autre problème qui émerge de cet essai est qu'on ne peut déterminer avec précision la composition du copolymère formé étant donné qu'homo- et copolymère sont présents et ne peuvent être différenciés en RMN.

5) [(Diméthyl)aminoéthyl)]acrylate : ADAM

Suite aux essais utilisant un dérivé non fonctionnel qui ont montré la validité de la méthode de polymérisation par transfert dégénératif utilisant la PCL-I, nous nous sommes intéressés à la polymérisation par ITP d'un monomère acrylique fonctionnalisé, porteur d'une fonction amine tertiaire et donc quaternisable.

Des essais préliminaires, effectués sur l'ADAM Quat [(Acryloyloxyethyl)-triméthylammonium méthyle sulfate], n'ont pas permis de conclure de manière indiscutable quant à la copolymérisation. Du poly (ADAM Quat) a été caractérisé, mais sa présence en tant que chaîne greffée sur la PCL n'a pu être prouvée (Tab.33).

Le N,N-(Diméthylamino)propyl méthacrylamide, dérivé voisin non cationique, a été copolymérisé avec la PCL iodée et étudié. Les RMN, les CES et le comportement dans l'eau -formation d'agrégats micellaires- tendent à prouver qu'un copolymère PCL-*g*-poly(DMAPMA) s'est formé (Tab.33) .

Afin de confirmer ces premiers essais, une étude plus systématique de l'évolution des masses molaires combinée à la méthode d'analyse CES à double détection (RI et UV), a été appliquée à la polymérisation par ITP de l'ADAM non quaternisé.

a) Réaction

La quantité d'amorceur a été ajustée de telle sorte qu'elle soit intermédiaire par rapport aux essais effectués avec l'Abu, afin d'avoir des vitesses d'amorçage et de polymérisation adéquates.

Le $\overline{DPn}$ visé est de 25, le solvant est le toluène, la température du bain est comprise entre 75 et 80°C.

Tableau 38 : Conditions de polymérisation du diméthylaminoéthylacrylate

Concentrations (mol/L)	**DP 22**
$[C\text{-}I]_0$	0,12
$[AIBN]_0^*$	0,03
$[ABu]_0$	3,3

b) Résultats

Des prélèvements ont été effectués à 1h30, 5h00 et 17h00 de réaction. Le milieu réactionnel était visqueux à 5h00 (agitation magnétique difficile), et pris en masse à 17h00. Sur chaque échantillon des analyses par CES et par RMN du proton (solvant $DMSOd_6$) ont été effectuées. Les résultats sont donnés dans le Tableau 39, et illustrés sur les Figures 85 et 86.

Tableau 39 : Copolymères PCL-g-PADAM obtenus

DP 22	**Réaction** (h)	**% PADAM**	**Mn**	**Mw**	**Ip**
PCL-I	0	0	5400	14800	2,74
Copo 1	1,5	55	6400	11200	1,75
Copo 2	5	67	9400	21450	2,28
Copo 3	17	70	14200	20600	1,45

En ce qui concerne la composition des copolymères, on remarque encore une fois que la polymérisation se fait très rapidement, la plus grande partie du monomère étant consommée après 5 heures de réaction (Tab.39 et Fig.86). La composition finale du copolymère est de 70% de PADAM pour 30% de PCL. Là encore l'utilisation des informations spectrales nous permettra de caractériser la répartition des motifs PADAM (chaînes greffées ou libres).

Il faut remarquer ici que le copolymère formé est difficilement soluble dans le THF. Il en résulte que les analyses de masses molaires, effectuées par CES dans le THF à l'aide des chromatogrammes obtenus par réfractométrie, ne sont pas totalement fiables :

- il se peut qu'on ait un fractionnement des macromolécules dans ce solvant en fonction de leur composition et de leur masse molaire
- le PADAM, et donc également les segments PADAM éventuellement greffés sur la PCL, a tendance à "traîner" sur la colonne. Ce phénomène est dû à la présence de fonctions amine sur le polymère et a été mis en évidence pour d'autres polybases.

Les interprétations qui suivent sont donc à considérer de manière critique, en gardant à l'esprit ces remarques.

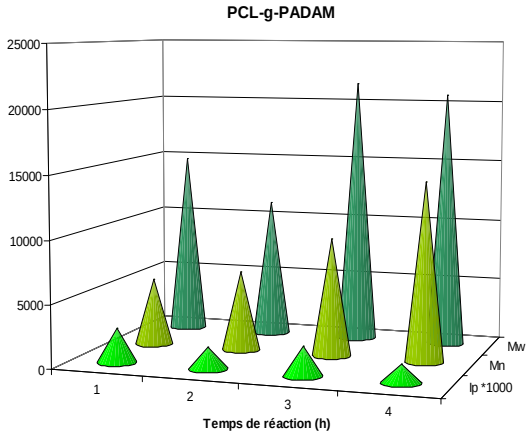


Figure 85 : Evolution des masses molaires avec le temps de réaction

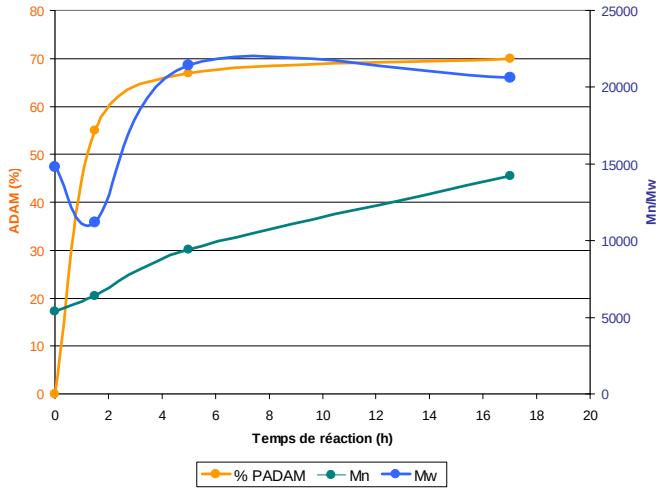


Figure 86 : PCL-g-PADAM, Composition et masse molaire en fonction du temps de réaction

Les masses molaires en nombre augmentent de manière continue avec la composition. On peut toutefois remarquer qu'entre 5 et 17h de réaction $\overline{Mn}$ augmente de 50% alors que dans le même temps la composition globale du milieu n'évolue pas ou très peu (on passe de 67 à 70% de PADAM). Une hypothèse permettant d'expliquer ce résultat est de considérer qu'il y a des transferts de chaînes dans le milieu (cf. équation). Le milieu contient en effet des chaînes d'homopolymère PADAM iodé qui peuvent venir se greffer sur le copolymère existant (d'où l'augmentation de viscosité du milieu) :

$$AM_j \cdot + PCL - I \rightarrow AM_j - I + PCL \cdot$$

$$AM_j - I + PCL - M_i \cdot \rightarrow I \cdot + PCL - M_{i+j} - A$$

$$PCL - M_i - I + PCL - M_j \cdot \rightarrow PCL - M_i \cdot + PCL - M_j - I$$

Avec M = ADAM

Les indices de polymolécularité sont relativement faibles en comparaison de ceux obtenus pour les copolymères de PCL-*g*-PABu. Les valeurs sont comprises entre 1,5 et 2,3. Mais ces valeurs faibles ne signifient pas forcément que le greffage des chaînes de PADAM n'a pas eu lieu. Là encore du fait que les chaînes polymérisées sont aminées, on peut envisager que ces dernières entraînent pour le copolymère un comportement particulier en CES.

L'utilisation du détecteur à barrette de diodes permet normalement de caractériser la nature des macromolécules obtenues, et renseigne plus particulièrement sur l'existence et/ou la coexistence d'homo et de copolymères. Chaque échantillon a été étudié par cette méthode, mais on ne présentera

que l'homopolymère PADAM (Fig.87) ainsi que le produit final obtenu après 17 heures de réaction (Fig. 88).

L'homopolymère PADAM a été synthétisé dans les mêmes conditions que le copolymère. Malgré une viscosité très importante du polymère, le pic correspondant ne sort qu'à 18 minutes ce qui correspond à une masse molaire inférieure à 1000 g/mol et montre que cet homopolymère a tendance à interagir avec la colonne. L'important est de noter que pour le PADAM λ_{max} = 240 nm (Fig.87). La tâche à 21 minutes avec un maximum à 260 nm correspond au toluène.

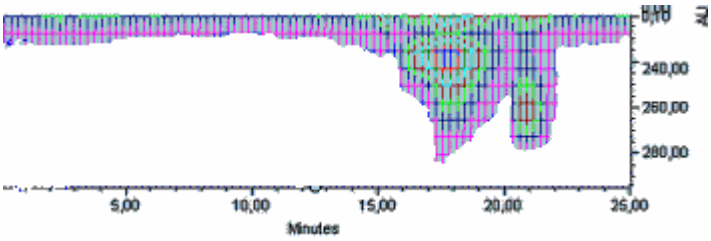


Figure 87 :Chromatogramme obtenu pour l'homopolymère PADAM

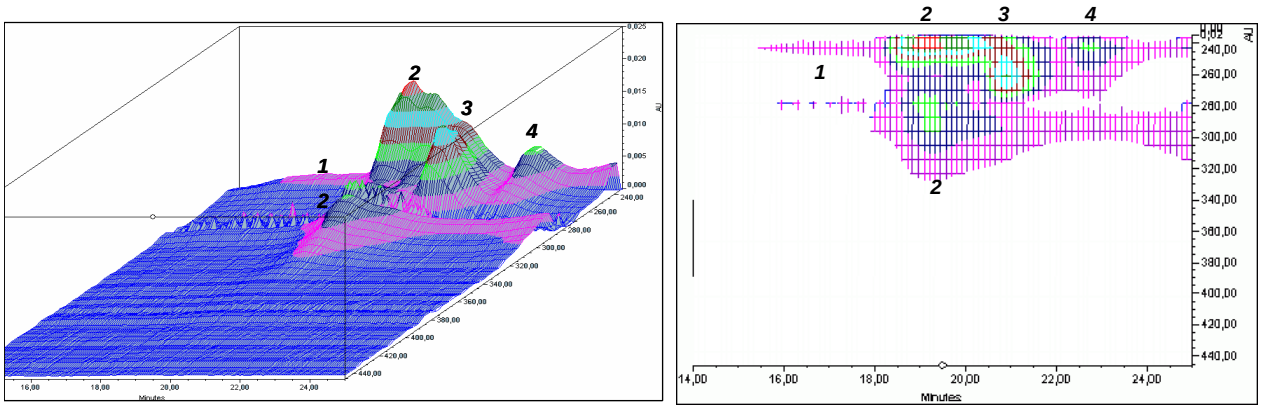


Figure 88 : Chromatogramme 3D (UV et RI) obtenu pour le copolymère PCL-g-PADAM

En ce qui concerne le copolymère (Fig.88), les interprétations sont semblables à celles proposées pour PCL-*g*-PABu avec là encore la coexistence de trois populations principales, ce qui reflète le mécanisme par ITP suivi:

- pic 1 : PCL non iodée (issue de la PCL-I) absorbant à λ_{max} = 235-240 nm. Malgré ce λ_{max} qui est le même que le PADAM, on peut penser qu'il s'agit de PCL puisque le produit ne traîne pas sur la colonne
- pic 2 : copolymère PCL-*g*-PADAM absorbant à λ_{max} = 240 nm pour le PADAM qui est majoritaire et λ = 300 nm pour la partie PCL qui contient toujours de l'iode fixée.
- pic 3 : homopolymère de PADAM iodé absorbant à 260 nm (traîne sur la colonne)
- pic 4 : oligomères de PADAM λ_{max} = 240 nm.

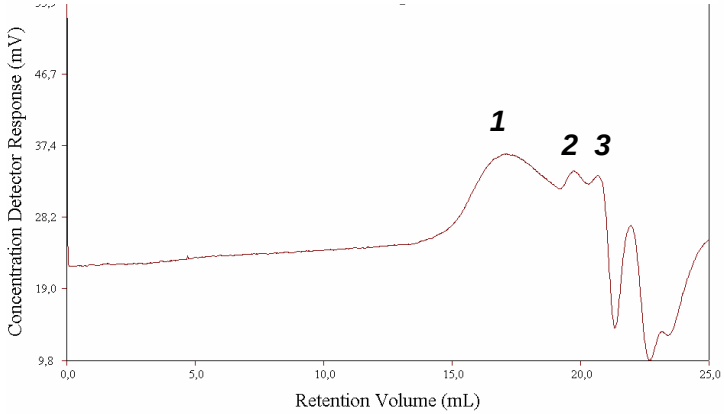


Figure 89 : Chromatogramme du copolymère PCL-g-PADAM, détecteur RI

Il est difficile de préciser quel produit est majoritaire. Comme on le voit sur la Figure 89, représentant le chromatogramme obtenu par réfractométrie, le pic 1 est le plus intense alors qu'en UV l'inverse est observé. Mais si l'on injecte un mélange 50/50 de PCL-I et de copolymère on constate que les deux ont une réponse en UV quasi égale, alors que le copolymère n'apparaît quasiment pas en réfractométrie. De même pour un mélange PCL et copolymère pour lequel seul le copolymère est visible en UV alors que le pic de PCL est largement majoritaire en RI.
On peut donc conclure de ces observations que le composé majoritaire dans notre mélange est vraisemblablement le copolymère (pic 2).

c) Conclusion

Nous avons pu obtenir un copolymère greffé PCL-*g*-PADAM. Les masses molaires et la composition de ce produit ne sont pas totalement définies étant donné que le copolymère traîne sur la colonne et que de l'homopolymère est présent dans le produit final. La croissance de chaînes PADAM sur la PCL iodée de départ est cependant certaine ce qui prouve que ce composé peut être utilisé en tant qu'agent de transfert dans des mécanismes de polymérisation par transfert dégénératif d'iode utilisant des monomères acryliques fonctionnels (amine, alcool…).

III. Conclusion

Les essais décrits dans cette partie avaient pour but de mettre en évidence la possibilité d'obtenir de nouveaux copolymères greffés à base de PCL en utilisant l'intermédiaire PCL iodée et un mécanisme de polymérisation par transfert dégénératif d'iode. Les exemples étudiés, et plus particulièrement les cas des monomères ABu et ADAM, ont montré que ce type de polymérisation est possible, que ce soit avec des monomères fonctionnalisés ou non. Ce mécanisme se traduit, comme on l'a vu, par la coexistence inévitable de trois populations en fin de réaction : le copolymère PLC iodée de départ, l'homopolymère non greffé, et le copolymère greffé. Une étude plus fine des conditions de polymérisation visant à diminuer la part relative des produits secondaires dans le mélange pourrait être l'objet d'un prochain travail mais dépasse l'objectif de cette thèse. En particulier, les conditions de température, de concentration en amorceur et le mode d'introduction des divers réactifs sont à étudier.
Un autre problème rencontré est la difficulté de la caractérisation précise des produits obtenus en termes de masses molaires, compositions, distributions…. Ce problème reste posé étant donné la nature même des structures étudiées qui présentent à la fois des architectures assez complexes (copolymères greffés) et des fonctionnalités qui ne sont pas neutres en terme d'analyse (CES sur polybases). Des techniques d'analyses plus précises, mais difficiles à mettre en place dans le cadre de ce travail, pourraient être envisagées (RMN DOSY, LC PIT…)

Malgré ces inconvénients, et au vu des résultats obtenus, cette nouvelle voie d'accès à des copolymères greffés à base polyester reste très prometteuse et possède un potentiel important qui reste à exploiter.

CHAPITRE V

POST-MODIFICATION DE NOUVEAUX COPOLYMERES A BASE DE PCL

Les structures synthétisées par substitution nucléophile du macropolycarbanion $PCL^{\ominus}$ sont, comme on l'a vu, insuffisamment substituées pour permettre une hydrosolubilisation de la PCL. Cependant, dans le cas où des fonctions réactives ont été introduites, les 10 à 15% de motifs substitués sont apparus intéressants puisqu'ils permettent d'envisager une modification post-substitution de la PCL. La réaction de modification par voie anionique constitue alors la première étape d'une stratégie de synthèse dans laquelle le squelette polyester modifié peut être considéré comme un intermédiaire réactionnel, voire un macro-synthon lorsqu'il peut réagir sur plusieurs réactifs (Fig.90).

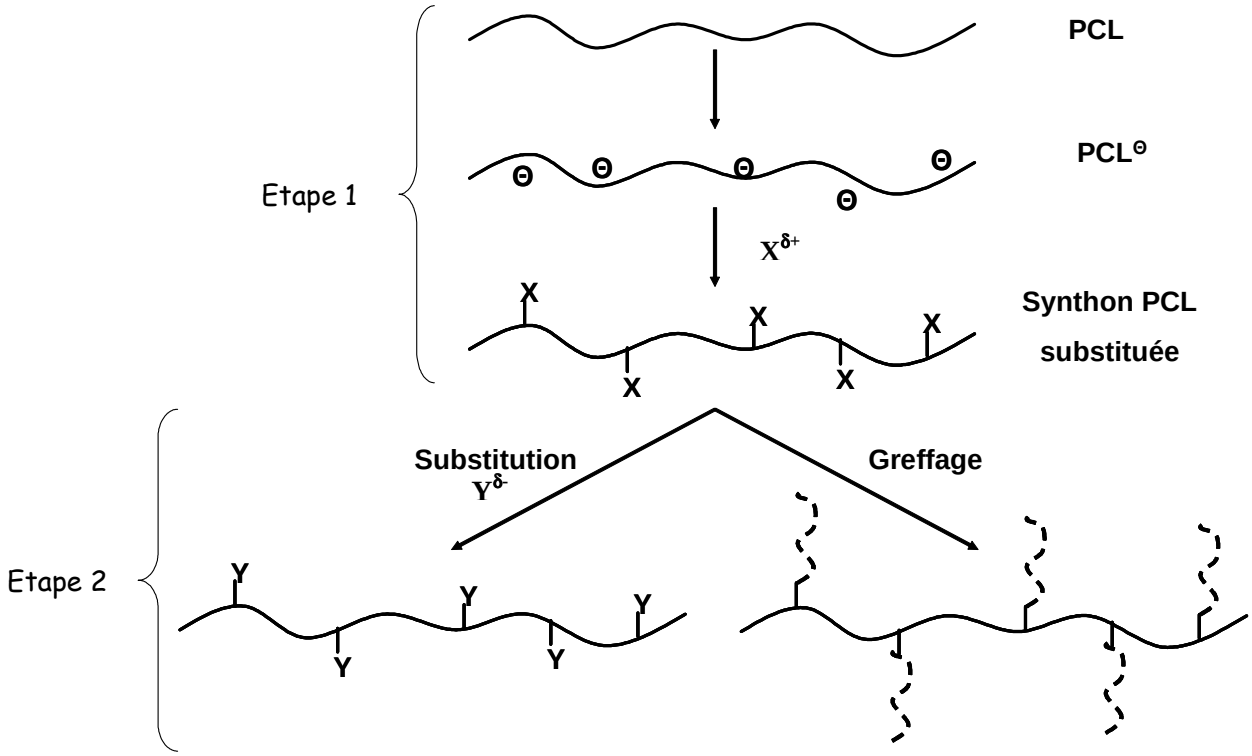


Figure 90 : Stratégie de synthèse de nouveaux copolymères à base de PCL

L'intérêt de cette stratégie est qu'elle permet d'effectuer la post-modification dans des conditions (température, solvant) compatibles avec des réactifs ne pouvant pas être utilisés pour la modification par voie anionique (amines, réactifs cationiques…). En particulier, la polarisation de la liaison C-X dans laquelle le carbone porte une charge δ+ ouvre la voie à des réactions mettant en jeu des réactifs nucléophiles et non plus électrophiles, comme c'était le cas pour les réactions sur le carbanion.

I. Synthon PCL bromoacétylée :

La réaction de modification chimique par voie anionique fondée sur l'emploi de chlorure de bromoacétyle a permis l'obtention d'une PCL porteuse de groupes bromoacétyle à hauteur de 4 %, le reste des groupements étant déjà substitués par la diisopropylamine (Chap.II-5-a). Des réactions de substitutions de l'atome de brome par la triéthylamine ont été réalisées sur ce squelette en s'appuyant

sur les conditions classiques décrites dans la littérature et plus particulièrement sur celles données par Kenawy *et al.*[261].

La réaction a été réalisée à reflux dans le THF et le nombre d'équivalents de triéthylamine était 5, 10 et 20 avec des durées de réaction allant de 5 à 3 jours respectivement. Les deux premiers essais n'ont pas permis de mettre en évidence la substitution attendue, comme l'a montré l'absence du signal caractéristique des protons méthylène de l'ammonium à 3,3 ppm en RMN. Seules les conditions utilisées pour le dernier essai ont abouti à une susbtitution visible par RMN ^{1}H. Le rendement de la réaction est de 50%, puisqu'en partant d'un copolymère porteur de 4% de motifs bromoacétylés, on n'a obtenu que 2% de motifs porteurs de triéthylammonium caractérisés par deux singulets à 4,4 ppm correspondant au méthylène de l'acétyle et à 3,3 ppm correspondant aux méthylènes de l'ammonium. Ce faible rendement s'explique par le fait que l'amine tertiaire est relativement encombrée et que la poly(α-bromoacétyl-ε-caprolactone) de départ est partiellement réticulée (Chap.II-5-a) ce qui ne favorise pas l'accès aux sites réactifs.

Nous nous sommes alors intéressés aux possibilités de réaction sur le squelette PCL iodé.

II. Synthon PCL iodée :

1) Substitution de l'iode par la triéthylamine

La PCL iodée utilisée contient 25% de motifs iodés. Les conditions de réaction de substitution sur les dérivés iodés décrites dans la littérature ont été adaptées aux macromolécules.
Un premier essai a été réalisé dans le DMSO en présence de THF pour faciliter la solubilisation du copolymère dont une partie reste sous forme de gel en suspension dans le milieu. Après addition de 10 équivalents de triéthylamine, la réaction a été effectuée à 65°C pendant 5 jours. Un traitement permettant d'éliminer l'excès d'amine précède la récupération du polymère en solution pour lequel une RMN du proton confirme la présence de 6% de motifs ammonium. Ce taux est faible, mais s'explique par la mauvaise solubilité du copolymère de départ.

Le second essai a été effectué en favorisant la solubilisation et donc le taux de substitution. La solution de copolymère a été soniquée puis chauffée une heure à 150°C afin de solubiliser la PCL iodée. Une fois la solubilisation complète, la température du milieu a été fixée à 65°C et 50 équivalents de triéthylamine ont été ajoutés. Il faut noter que le chauffage de la solution de PCL-iodée peut potentiellement entraîner des dismutations de la liaisons C-I. Après 4 jours de réaction, une analyse par RMN ^{1}H a montré des signaux intenses reflétant la présence de sels de triéthylamine. Le produit de réaction a donc été lavé en milieu aqueux et deux fractions ont été récupérées. La première, soluble en

milieu organique, ne contenait que de la PCL iodée. La seconde était soluble dans les eaux de lavage. Une analyse par RMN ^{1}H dans D_2O a révélé la présence de PCL et de sels d'ammonium. On se trouve donc en présence de PCL susbtituée. Une analyse par CES en milieu aqueux a confirmé la présence d'oligomères de masse molaire 2500 g/mol environ. Le taux de substitution s'est révélé difficile à évaluer car les signaux RMN typiques de PCL dans D_2O étaient très mal définis et peu intenses.

Le même type de traitement sur un composé ayant réagit 5 jours a conduit à un copolymère soluble dans le chloroforme et présentant les signaux caractéristiques de la forme ammonium de la triéthylamine (quadruplet à 3,15 ppm (CH_2) et triplet (CH_3) masqué par les protons méthylène de la PCL vers 1,5 ppm) mais dont la présence est confirmée par couplage 2D. Le taux de substitution de ce copolymère est très faible avec seulement 3% de fonctions ammoniums sur les motifs ε-caprolactone.

Dans tous les cas, la réaction s'est avérée peu efficace en raison de l'encombrement stérique de la triéthylamine d'une part mais aussi de la faible solubilité de la PCL iodée à 25% qui est partiellement réticulée. On s'est donc intéressé à ce type de mécanisme en utilisant une PCL iodée non réticulée.

2) Substitution de l'iode par une triamine

La PCL iodée mise en jeu était substituée à 14% et ne présentait pas de noeuds de réticulation. Après solubilisation dans le chloroforme, 5 équivalents de 3,3'-diamino-N-méthyldipropylamine ont été injectés. Le choix de l'amine était motivé par la présence de fonctions amine primaire très accessibles pouvant réagir par substitution nucléophile sur la liaison C-I. Elle possède en outre une fonction amine tertiaire intéressante dans le cadre d'une quaternisation du squelette substitué. Le nombre de fonctions amine devait augmenter la probabilité de réaction (malgré le risque de réticulation). La réaction a été réalisée à 90°C pendant 4 heures, puis à température ambiante pendant 48 heures.

Après récupération et traitement du solide par dialyse en milieu aqueux, la fraction non soluble dans l'eau a été analysée. Le taux de substitution a été calculé par comparaison des intégrations des signaux présents sur le spectre RMN ^{1}H. Dans le composé obtenu, 4,2 % des motifs sont substitués ce qui équivaut à un rendement de réaction de substitution de 30%. Le produit semblait partiellement réticulé et/ou chargé puisque sa dissolution dans le THF est apparue difficile. Une partie du polymère était par contre soluble dans l'éluant de CES eau/méthanol (90 :10 ; v :v). L'analyse par CES indique que les chaînes sont des oligomères ayant une masse molaire $\overline{M_n}$ = 1500 g/mol et un indice de polymolécularité faible (Ip = 1,05). Il est difficile de comparer les masses molaires des produits avant et après réaction étant donné que les solvants de CES diffèrent, mais on peut penser que des coupures de chaîne par aminolyse ont eu lieu en cours de réaction.

La multifonctionnalité de l'amine utilisée conduit donc à une réticulation partielle des chaînes et à un rendement de substitution de 30%. Etant donné la faible teneur en amine du copolymère obtenu, l'étude de ce type de réaction n'a pas été approfondie dans le cadre de cette thèse.

3) Substitution de l'iode par la triphénylphosphine

Les groupements phosphine, par la présence de leur doublet libre, sont de bons groupements nucléophiles pouvant conduire à une PCL cationique par attaque de la liaison C-I. Nous nous sommes donc intéressés aux réactions mettant en jeu les dérivés iodés et les phosphines. Ce type de réaction étant très connu, nous n'avons sélectionné que les publications dont les produits se rapprochent le plus des nôtres[302,303] et nous nous sommes notamment inspiré des travaux de Meyer *et al.*[304] pour les conditions expérimentales.

2,5 équivalents de $P(Ph)_3$ ont été ajoutés à une solution de PCL iodée à 13,5% dans le chloroforme, le tout étant laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Le produit récupéré et lavé a été analysé par les techniques classiques de chromatographie et de spectrométrie. Les bandes à 1474 et 1432 cm^{-1} du spectre IR indiquent la présence de phosphonium, présence confirmée par analyse RMN ^1H avec des signaux à 7,6 et 7,8 ppm correspondant aux groupements phényle et un doublet à 3,2 ppm ayant une forte constante de couplage caractéristique du couplage ^1H-^{31}P ($^2J_{HP}$ = 30Hz). Les propriétés thermiques de ce copolymère ont été évaluées par DSC. Les résultats sont donnés dans le Tableau 40.
Le taux de substitution est élevé de 12,2%, ce qui donne un rendement de substitution de l'iode de 88,5%. Le rendement massique est de 60%.

Tableau 40 : Propriétés thermiques du copolymère PCL-co-poly(α-tripéhnylphosphonium-ε-CL)

Echantillon	**Substitution** (%)	**Tf** (°C)	**Tc** (°C)	**ΔHf** (J/g)
PCL-I	13,5	51	16	30
PCL-[$P^+(Ph)_3$]	12,2	49	-22	25

L'introduction de groupements de fort encombrement stérique entraîne une diminution importante de la température de cristallisation due à la difficulté pour les domaines cristallins de s'organiser.

Ce dernier exemple de substitution directe de l'atome d'iode par un nucléophile est encourageant puisqu'une PCL cationique contenant 12% de motifs substitués par des groupes phosphonium a été obtenue. Même si ce taux reste trop faible pour hydrosolubiliser la chaîne PCL, il est toutefois suffisant pour entraîner des modifications de propriétés du squelette. Cet essai confirme qu'il est possible de modifier la PCL par une stratégie de post-modification.

III. Synthon PCL carboxylée

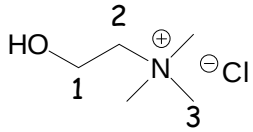
L'introduction de fonctions acide carboxylique sur le squelette polyester présente de nombreux avantages. Le premier est, comme on l'a vu (Chap.II-2), d'entraîner une hydrosolubilisation de la PCL à partir de taux de substitution voisins de 20%. Un autre intérêt réside dans la réactivité de ces fonctions qui sont susceptibles de se combiner avec de nombreux composés, permettant d'obtenir des copolymères de PCL cationique. Nous nous sommes intéressés ici à des réactions d'estérification et d'amidification sur la PCL carboxylée.

1) Estérification

La méthode directe de modification chimique de la PCL par voie anionique n'est pas compatible avec l'emploi de réactifs insolubles dans le solvant de réaction (Chap.II-3). L'estérification a donc été tentée en milieu DMSO.

Une PCL carboxylée à 12% a été mise en réaction avec une solution de chlorure de choline dans du DMSO en présence de dicyclocarbodiimide (DCC) pendant 16 heures. Le chlorure de choline a été choisi en raison de sa structure qui possède à la fois une fonction alcool permettant l'estérification et un ammonium quaternaire qui donne accès à un copolymère de PCL cationique. Un autre avantage de ce substituant est qu'une PCL porteuse de groupes chlorure de choline serait une structure proche du concept de biopolymères artificiels.
La réaction dure 24 heures à température ambiante. L'estérification a été confirmée par RMN ^{1}H (Tab.41) après dialyse dans un tube dont le seuil de coupure est 3500 g/mole. Les signaux caractéristiques du groupe choline ont été détectés sur le spectre, et leurs intégrations relatives comparées à celles de PCL indiquent que 10% de motifs PCL ont été fonctionnalisés par la choline. En considérant que l'on avait 12% de motifs carboxylés en début de réaction, le rendement d'estérification est élevé (83%).

Tableau 41 : Déplacements chimiques du chlorure de choline en RMN^{1}H (DMSO)

Chlorure de choline	**Signaux visibles en RMN ^{1}H**	**δ** (ppm)
	(1) CH_2 en α de l'ester formé	4,50 ppm
	(2) CH_2 en α de l'ammonium	3,50 ppm
	(3) CH_3 de l'ammonium	3,30 ppm

Ce degré de modification, même s'il est insuffisant pour hydrosolubiliser la PCL, montre qu'il est possible de réaliser une post-modification du squelette avec des réactifs cationiques. On a donc à disposition une nouvelle méthode de modification du squelette PCL donnant accès à un large éventail de structures.

2) Amidification

L'étude bibliographique sur la transfection fait apparaître que les copolymères à blocs à base PCL et PEI présentent un intérêt dans le domaine de la transfection de gènes. On se propose donc de synthétiser un copolymère greffé à chaînes latérales polyamine et squelette PCL afin de proposer une architecture alternative possédant des propriétés propres en terme d'auto-association en milieu aqueux. De plus, une telle structure dériverait de deux polymères commerciaux et relativement bon marché. Ce dernier point reste vrai à condition d'utiliser une poly(éthylène imine) commerciale branchée, d'où notre choix pour ce type de polymère, alors qu'une PEI linéaire vendue en tant qu'agent de transfection aurait été l'idéal puisqu'elle permet de s'affranchir des réactions secondaires de réticulation. Enfin, notre choix s'est porté sur une PEI branchée de faible masse molaire (600 g/mol). En effet, la littérature traitant des agents de transfection à base de polycations fait mention de leur toxicité qui est d'autant plus importante que les masses molaires sont élevées.

Deux stratégies de greffages ont été envisagées (Fig.91):
- l'activation des fonctions amine primaire de PEI par le chlorure de bromoacétyle suivi de l'exploitation du macro-réactif dans la seconde étape de modification chimique de la PCL (a)
- l'amidification entre les fonctions acide carboxylique de la PCL carboxylée et les fonctions amine de PEI en présence d'un agent de couplage (b)

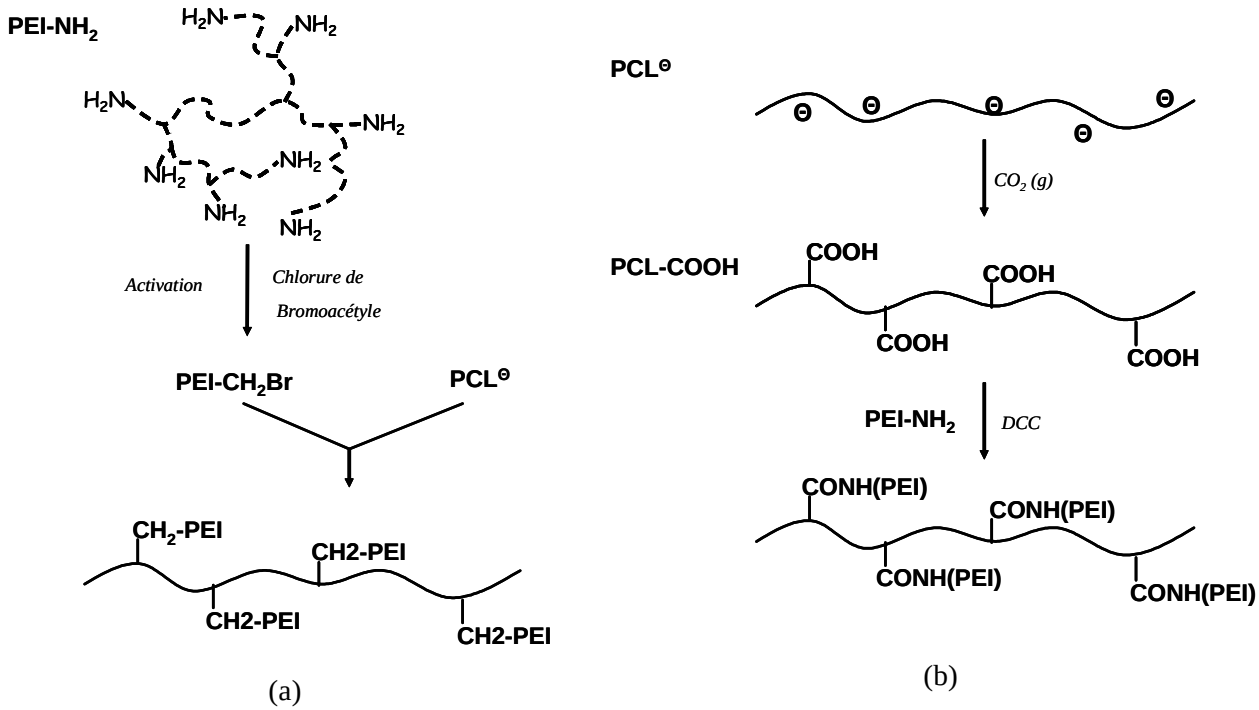


Figure 91 : Voies de synthèse de PCL-g-PEI a) activation de PEI b) amidification

a) Activation de PEI

Les amines primaires, qui représentent 25% des motifs de la PEI branchée, ont été activées par le chlorure de bromoacétyle. L'activation a été confirmée par analyse RMN ^{1}H dans le DMSO par l'apparition d'un signal à 4 ppm correspondant aux protons méthylène du bromoacétyle. La bande caractéristique de l'amide n'est pas visible par spectrométrie infra-rouge étant donné qu'elle se trouve sous une bande large vers 1630 cm^{-1} correspondant aux vibrations de valence des fonctions amine de PEI. D'après la RMN, entre 7 et 10% de groupes bromoacétyle auraient été fixés soit un rendement d'activation des fonctions amine primaire de 30-40%.

Cette PEI activée a ensuite été mise à réagir avec le macropolycarbanion $PCL^{\ominus}$ dans un mélange de solvant THF/DMSO (2 :1 ; v :v) permettant de solubiliser la PEI.

Trois fractions ont été récupérées et analysées par RMN ^{1}H. La fraction majoritaire ne contient que de la PEI n'ayant pas réagi. Le spectre de la seconde fraction, organosoluble, présente les signaux des deux polymères avec en particulier le massif à 2,5 ppm correspondant aux protons méthylène de la chaîne principale de PEI. La composition molaire de ce copolymère est 95% de motifs ε-caprolactone et 5% de motifs éthylène imine. La troisième fraction, minoritaire, est hydrosoluble et un spectre IR a confirmé la présence de PEI (2490 et 1645 cm^{-1}) et de PCL (1730 cm^{-1}). La PCL se trouvant en milieu aqueux, elle a effectivement été greffée. Une analyse par CES dans le THF a également montré qu'il s'agit de chaînes polymères et non d'oligomères. L'analyse de la composition par RMN s'est avérée difficile. En effet, le spectre réalisé dans le chloroforme avant dialyse donnait une composition de 10% et 90% molaire respectivement pour PCL et PEI. Après dialyse contre de l'eau, la RMN en milieu D_2O a confirmé la présence de PEI greffée et de PCL, mais les quantités de chaque polymère n'ont pas pu être déterminées car dans D_2O les signaux de PCL sont très mal définis et inexploitables en terme de quantification.

Le fait que les produits substitués soient minoritaires et faiblement substitués peut s'expliquer par l'incertitude qui existe quant à l'efficacité de l'activation des fonctions amine primaires de PEI et par le fait qu'un mélange de solvant soit nécessaire pour effectuer la réaction en milieu homogène. La mauvaise solubilité de la PEI dans le mélange THF/DMSO est ici un facteur discriminatoire qui a motivé l'abandon de cette voie.

b) Amidification de la PCL-COOH :

Trois réactions ont été réalisées en utilisant la DCC comme agent de couplage, une PCL carboxylée à 8% et une PEI commerciale branchée de masse molaire ≈ 600g/mol.

La différence entre ces essais concerne la durée de réaction, l'emploi ou non d'un agent d'activation des fonctions acide carboxylique, le N-hydroxysuccinimide, et le nombre d'équivalents de fonctions amine par rapport aux fonctions acide carboxylique. En effet, afin d'éviter les réticulations partielles dues à la multifonctionnalité des polymères mis en présence, une quantité moindre de PEI a été ajoutée dans le dernier essai, cette diminution étant compensée par l'activation préalable de la fonction acide carboxylique. Les conditions de réactions sont résumées dans le Tableau 42.

Tableau 42 : Réaction d'amidification de la PCL-COOH par PEI

Conditions	**Essai 1**	**Essai 2**	**Essai 3**
Solvant	$CHCl_3$		CH_2Cl_2
Température	reflux		Tamb
Durée	4h30	24h	24h
Nb éq. PEI	2 fonctions amines I^{aire} / fonction acide		1 chaîne PEI / chaîne PCL soit 1 amine I^{aire}/ acide
Nb éq. DCC	2 équivalents / fonction acide		5 équivalents / fonction acide
Nb éq. NHS	aucun		5 équivalents / fonction acide

Les produits issus des différents essais ont tous été caractérisés par spectrométrie Infra-rouge et présentent les bandes caractéristiques de PCL et PEI définies au paragraphe précédent. Les masses molaires ont été évaluées par CES dans le THF, mais la faible solubilité des produits dans ce solvant, voire leur insolubilité dans le cas de l'essai 3, ne permet pas de mesurer précisément les masses. Les copolymères 1 et 2 présentent des valeurs $\overline{M_n}$ et Ip de l'ordre de (18500 ; 2,6) et (12000 ; 2,9) respectivement.

Les compositions ont été évaluées par analyse par RMN ^{1}H. Une fois encore, la mauvaise solubilité des produits a imposé l'utilisation de TFA deutérié. Les signaux caractéristiques de PCL ainsi que le massif à 3,5 ppm de PEI sont visibles sur les spectres obtenus. Les intégrations indiquent des pourcentages molaires en PEI de 37% pour l'essai 1 et 32% pour l'essai 2. Ce résultat montre que l'augmentation de la durée de réaction de 4h30 à 24 heures n'influe pas sur le taux de greffage des chaînes PEI sur la PCL carboxylée. Une quaternisation partielle des fonctions amine du second polymère par l'iodure de méthyle a permis d'isoler un copolymère contenant 40% de PEI dont 20% des motifs sont quaternisés. Malgré ce fort taux de groupes aminés cationiques et/ou cationisables, l'hydrosolubilité n'est pas atteinte ce qui laisse penser que le copolymère est partiellement réticulé.

Dans le cadre du troisième essai, l'utilisation de conditions plus douces et d'un nombre d'équivalent de PEI moindre a conduit à l'obtention d'un copolymère de composition équimolaire en PCL et PEI . Malgré les conditions opératoires, ce copolymère est apparu lui aussi réticulé. Il est donc insoluble dans tous les solvants et en particulier en milieu aqueux, en présence d'acide ou d'urée concentrée.

Ces différents essais ont permis de synthétiser des copolymères amphiphiles greffés ayant un squelette hydrophobe PCL et des chaînes latérales PEI. Cette méthode semble plus simple que la précédente et donne de meilleurs résultats au niveau des taux de substitution. Les deux voies de synthèse, avec et sans NHS, peuvent être utilisées et conduisent à des teneurs relativement élevées en motifs aminés. En revanche, l'utilisation d'une PEI linéaire semble être une condition nécessaire à l'obtention de produits parfaitement solubles, en milieu organique ou aqueux.

IV. Conclusion

Les réactions de post-modification réalisées sur les PCL bromoacétylée, iodée et carboxylée sont intéressantes puisqu'elles permettent de fonctionnaliser le squelette polyester avec des groupes non compatibles avec la réaction de modification chimique par voie anionique. Elles nécessitent cependant une mise au point plus poussée des conditions de réaction afin d'élargir l'éventail de réactifs utilisables et d'améliorer les rendements de substitution tout en évitant les réactions secondaires (réticulations…).

Malgré ces difficultés, il faut noter que les macro-synthons PCL iodée et carboxylée peuvent servir de base à de nombreuses réactions et que des copolymères contenant 10-12% de motifs ioniques phosphoniums ou choline ont été obtenus avec de bons rendements. De même, si on s'affranchit des problèmes de réticulation liés à l'emploi de PEI branchée, la réaction de greffage de type « onto » d'une polyamine sur le squelette polyester carboxylé semble être une méthode intéressante pour l'obtention de copolymères amphiphiles cationiques. La dégradabilité des PCL-*g*-PEI n'a pas été étudiée mais ne peut être que partielle et limitée aux segments PCL alors que dans le cas des PCL substituées par de petits groupes ioniques il est possible d'obtenir des structures proches du concept de biopolymères artificiels.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail de thèse, proposé par RHODIA, était de synthétiser de nouveaux polymères dégradables amphiphiles à fonctions cationiques ou amphotères. Si le nombre de copolymères amphiphiles décrits est impressionnant, très peu répondent aux objectifs proposés. En effet, la plupart d'entre eux ne mettent pas en jeu des structures dégradables. D'autre part, la grande majorité des composés décrits fait appel à des copolymères à blocs avec des segments hydrophobes et des segments hydrophiles. On ne trouve pratiquement pas de copolymères greffés.

Nous nous sommes alors orientés vers l'étude de structures dégradables de type polyester et nous avons choisi un squelette à base de poly(ε-caprolactone) qui est un polyester aliphatique commercial bien connu pour sa biocompatibilité et sa dégradabilité. Ce polyester fait partie des composés à valoriser chez RHODIA et nous devions tenter de lui appliquer la méthode de modification chimique par voie anionique des polyesters aliphatiques récemment décrite au laboratoire. Ce type de modification passe par l'emploi d'une base forte dont la réaction avec le squelette PCL conduit à un macropolycarbanion : certains motifs du squelette polyester portent une charge anionique en α de la fonction ester des unités de répétition, ce qui permet d'envisager deux voies principales pour la synthèse de copolymères amphiphiles ou hydrosolubles greffés à base de PCL.

La première voie prospectée exploite le caractère nucléophile du macropolycarbanion $PCL^{\ominus}$ qui réagit avec des substituants électrophiles. Le taux de substitution obtenu est de l'ordre de 10% mais varie en fonction du réactif utilisé. Ce taux de substitution ne permet cependant pas d'obtenir une hydrophilisation suffisante de la PCL et s'accompagne de coupures de chaînes d'autant plus importantes que l'on cherche à augmenter la substitution. Les conditions de réaction et de traitement sont en outre spécifiques à chaque réactif, ce qui est peu propice à la diversification. Cette voie « nucléophile » est cependant intéressante puisqu'elle a permis de synthétiser des PCL fonctionnalisées par des fonctions acide carboxylique (8%), des fonctions amine primaire aliphatique (7% de groupes 3-aminopropyl) et aromatique (11% de *p*-aminobenzyl) ainsi qu'un dérivé de PCL iodé présentant une radio-opacité intrinsèque susceptible d'être utilisée lors d'applications en tant qu'implant dégradable. L'intérêt principal de la voie nucléophile réside dans la possibilité de synthétiser des PCL fonctionnalisées tout le long du squelette et de fournir ainsi un nombre important de sites réactifs pouvant être mis à profit pour des réactions de post-modification. L'utilisation de ces PCL substituées en tant que « macrosynthons » a permis d'obtenir une PCL porteuse de groupes phosphoniums (12%) et un copolymère greffé amphiphile PCL-*g*-PEI (50 :50) par réaction nucléophile sur la liaison C-I. Ces réactions de post-modification permettent l'utilisation de réactifs nucléophiles alors que les réactions directes sur le macropolycarbanion font intervenir des réactifs électrophiles. En combinant ces deux méthodes une très grande variété de réactifs sont apparus exploitables pour obtenir des structures très diversifiées. L'approche peut être étendue à un grand

nombre de réactions classiques de chimie organique par introduction des groupes adéquats. Elle s'apparente aux réactions de « click chemistry » actuellement en développement.

La seconde voie étudiée est fondée sur l'utilisation du macropolycarbanion $PCL^{\ominus}$ en tant que macroamorceur de polymérisation anionique. Cette méthode donne accès à des copolymères greffés à chaîne principale PCL et permet la synthèse de structures très peu décrites dans la littérature, difficilement obtenues par les techniques classiques de greffage. L'autre intérêt de ce macroamorçage est qu'il est réalisable avec des monomères variés, fonctionnalisés ou non, et tous polymérisés dans les mêmes conditions à partir du moment où leur nature est compatible avec le mécanisme de polymérisation anionique. Ce type de polymérisation s'apparente aux techniques de greffages « from » et a été appliqué à des monomères commerciaux courants de type vinyliques et acryliques (par polymérisation par ouverture de double liaison) et à des monomères de synthèse de type NCA d'acides aminés (par polymérisation par ouverture de cycle). Le cas des structures PCL-*g*-poly(MAPEG) a démontré qu'il est possible d'effectuer la polymérisation de macromonomères ce qui donne des polymères à architectures originales très fortement greffées.

En accord avec nos objectifs, le macroamorçage à partir de $PCL^{\ominus}$ a permis l'obtention de copolymères greffés à squelette PCL amphiphiles voire hydrosolubles (PCL-*g*-PDMAEM quaternisé, PCL-*g*-PVP^{+}, PCL-*g*-PLL…). Ces copolymères sont potentiellement dégradables et pourrait présenter une dégradabilité partielle ou totale en fonction de la nature et de la longueur des chaînes latérales. Ils forment en solution des objets micellaires de dimensions nanométriques (diamètres de 10 à 100 nm environ) pouvant solubiliser des molécules hydrophobes, comme le Yellow OB, insolubles en milieu aqueux. Il est possible de réactiver la chaîne principale PCL afin de réamorcer une deuxième polymérisation anionique ou de surfonctionnaliser le squelette polyester. Cette réactivation donne accès à des terpolymères, comme la PCL-*g*-(PVP/PEG), ce qui élargi encore le champ des structures potentiellement accessibles. Les propriétés physico-chimiques (viscosité, CMC…) ainsi que la dégradabilité des copolymères synthétisés restent à étudier. Il a cependant été mis en évidence certaines caractéristiques intéressantes de ces amphiphiles comme l'existence d'un point trouble pour les PCL-*g*-Poly(MAPEG) ou la possibilité d'utiliser les PCL-*g*-PLL dans des applications biologiques de type transfection. Cette dernière application, tout juste abordée dans le cadre ce travail, nécessiterait des études plus poussées afin d'étudier la potentialité des copolymères cationiques à base de PCL pour la transfection de gènes.

Enfin, cette thèse a permis de faire émerger une méthode innovante de synthèse de copolymères greffés à base de PCL. La PCL iodée synthétisée par la voie « nucléophile » peut en effet être utilisée comme macro-agent de transfert dans des polymérisations radicalaires contrôlées par transfert dégénératif d'iode. Cette technique permet de polymériser un grand nombre de monomères, en

particulier ceux qui ne sont pas compatibles avec les conditions de la polymérisation anionique, et de travailler dans des conditions plus classiques en terme de température et milieu réactionnel. Pour l'instant, seuls des essais visant à valider l'emploi de la PCL iodée dans ce type de réaction ont été réalisés. Les analyses des copolymères synthétisés ont confirmé la présence de chaînes latérales sur la PCL et le rôle joué par le macro-agent de transfert iodé. Cette technique doit maintenant être développée selon deux axes principaux de recherche :

- une étude plus systématique du système visant à établir le caractère vivant et contrôlé de la polymérisation
- un élargissement de la gamme des monomères utilisés afin d'utiliser cette méthode pour la réalisation de copolymères hydrosolubles partiellement dégradables.

En résumé, ce travail de thèse a permis la synthèse de nouvelles structures copolymères greffées à base de PCL présentant un caractère cationique ou amphotère et potentiellement dégradables au moins en partie. Une très grande diversité de structures a été obtenue à partir de deux stratégies principales et les produits ont été caractérisés du point de vue de leur hydrosolubilité, de leur organisation en milieu aqueux et de leur principales propriétés physico-chimiques. Les synthèses ont été réalisées en faisant appel à une grande variété de réactions et de nouvelles voies de synthèse sont apparues comme, par exemple, l'exploitation de la PCL iodée en polymérisation radicalaire contrôlée. Enfin, ces méthodes sont potentiellement applicables à d'autres polyesters aliphatiques ce qui devrait permettre par la suite de générer une très grande diversité moléculaire à condition de respecter le caractère « fragile » des squelettes dégradables utilisés.

PARTIE EXPERIMENTALE

A- Modification chimique de polymères par voie anionique

I. Synthèse générale

Nous décrivons ici le mode opératoire général de la réaction de modification chimique de polyesters par voie anionique. Les différentes conditions spécifiques à chaque expérience ont déjà été précisées dans la discussion (quantités de polymère, de LDA, durée et température de réaction).

Remarque: Lorsque le nombre de mole de polymère est indiqué, il s'agit du nombre de mole de motifs.

1) Montage et traitements:

La réaction est réalisée dans un réacteur conique de 500 ml préalablement séché dans une étuve à 100°C puis au pistolet chauffant avant d'être laissé à refroidir sous balayage d'argon (Fig.92). Le flux d'argon est séché par passage sur chlorure de calcium, soude, tamis moléculaire et silicagel (pour le contrôle visuel). La solution est agitée mécaniquement par une pale en Téflon®. La solution est refroidie à -70°C dans un Dewar rempli d'un mélange acétone/carboglace ou éthanol/N_2 liquide.

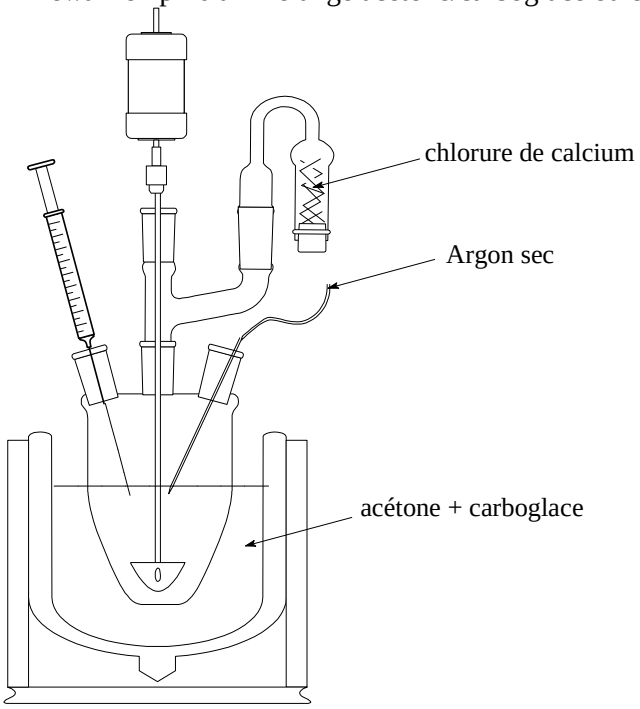


Figure 92 : Montage de la réaction de modification chimique par voie anionique

a) Etape de formation du macropolycarbanion $PCL^{\ominus}$

Typiquement, le polymère est introduit dans le réacteur (0,035 mole soit 4 g de PCL) puis dissout dans 100 ml de THF anhydre. Le THF est préalablement distillé sur sodium / benzophénone, il est recueilli lorsque la solution atteint une couleur violet-pourpre qui témoigne de l'absence de trace d'eau. Une solution de LDA commerciale (2M dans un mélange hexane/THF) est ajoutée à la seringue à travers

un septum à raison de 0,33 à 1 équivalent de LDA par motif monomère en fonction du type de réaction (substitution ou polymérisation). La réaction est maintenue pendant 30 minutes à -70°C sous agitation.

b) Étape de réaction nucléophile du carbanion ou de polymérisation :

Le réactif substituant, lorsqu'il est liquide, est ajouté à la seringue à travers le septum. Lorsqu'il s'agit d'un solide, il est préalablement solubilisé dans du THF avant d'être introduit de la même manière. La quantité ajoutée est fonction du type de réaction avec un excès de réactif, environ 2 équivalents par unité monomère, dans le cas de la polymérisation, et 1 à 2 équivalents pour les substitutions. L'ensemble est laissé sous agitation à -70°C pendant 1h30-2 h dans le premier cas, et 30 minutes dans le second.

c) Hydrolyse acide :

Le mélange réactionnel est hydrolysé par addition d'une solution aqueuse de chlorure d'ammonium (20 g dans 200 ml d'eau). Le pH est contrôlé à l'aide de papier pH et en fin d'hydrolyse, si nécessaire, sa valeur est ajustée à 7 par ajout d'une solution d'HCl 37 %.

d) Hydrolyse « inverse» :

Le mélange réactionnel est coulé lentement dans une solution aqueuse de chlorure d'ammonium (20 g dans 200 ml d'eau). Le pH est suivi et ajusté à une valeur de 7 par ajout d'une solution d'HCl 37 % au cours de la coulée.

e) Récupération du copolymère :

i. Extraction classique

Le copolymère obtenu est extrait par du dichlorométhane (2 x 100 ml). Les fractions organiques sont réunies et rincées à l'eau distillée (2 x 100 ml). La phase organique est décantée et séchée par addition de sulfate de magnésium. La solution est filtrée sur papier filtre et concentrée par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le copolymère contenu dans l'huile obtenue est alors précipité sous agitation magnétique par addition de méthanol afin d'éliminer les éventuels sous-produits de la réaction. Le copolymère est récupéré par filtration sur fritté et rincé au méthanol. Il est ensuite séché sous vide (10^{-1} à 10^{-3} bar) pendant plusieurs heures.
Les rendements de réaction sont calculés par rapport entre la masse de copolymère récupéré sur la masse de copolymère attendue si l'on avait un rendement de 100 %. Les masses calculées tiennent compte du taux de substitution déterminé par RMN ^{1}H.

ii. Extraction organique

Dans le cas où des émulsions apparaissent, l'étape de rinçage à l'eau distillée est éliminée. Si malgré cela les émulsions formées entre le milieu d'hydrolyse et le dichlorométhane d'extraction sont stables, une quantité variable d'éthanol est ajoutée jusqu'à l'obtention de deux phases séparées.

2) Exemples de substitutions

a) Carboxylation de la PCL :

Une solution de PCL (0,03 mole, soit 3,42 g) dans 100 ml de THF anhydre est introduite dans le réacteur conique maintenu à -70°C. Le LDA est ajouté à raison de un équivalent par motif monomère. L'étape de formation du carbanion dure 30 minutes sous agitation mécanique. CO_2 est formé par évaporation de carboglace, puis séché sur chlorure de calcium, tamis moléculaire et silicagel. L'étape de barbotage du CO_2 gazeux dure 1 heure. La réaction est arrêtée par addition, à température ambiante, d'une solution aqueuse de chlorure d'ammonium. Le pH est contrôlé, et s'il excède 4, la solution est acidifiée par ajout d'une solution d'HCl 37 %, afin d'obtenir la forme acide du copolymère carboxylé. En général le copolymère précipite dans cette solution acide. Plusieurs méthodes de récupération et de purification sont alors utilisables.

- Le copolymère précipité est récupéré par filtration et purifié par dialyse à température ambiante dans des membranes Spectra/Por (seuil de coupure 3500). La solution dialysée est congelée dans l'azote liquide puis lyophilisée.

- Le copolymère est extrait dans le dichlorométhane (2 x 100 ml) et rincé à l'eau (2 x 100 ml). Lorsque la séparation des phases est rendue difficile par le caractère amphiphile du copolymère synthétisé, un faible volume de méthanol est ajouté dans l'ampoule à décanter afin de faciliter la séparation des phases. La phase organique récupérée est concentrée dans un évaporateur rotatif. Le copolymère est précipité dans le méthanol, filtré, rincé au méthanol et séché sous vide pendant plusieurs heures.

b) Méthylation de la PCL

Une solution de 0,035 mole de PCL (4 g) dans 100 ml de THF anhydre est introduite dans le réacteur conique. Une quantité de LDA en solution dans le THF (2M) correspondant à 1 équivalent de LDA par motif monomère est ajoutée. La réaction de formation du carbanion dure 30 minutes à –70°C. L'iodométhane est ajouté (1 équivalent) et la réaction de substitution dure 30 minutes à -70°C. L'hydrolyse et la récupération du copolymère sont effectuées selon le mode opératoire décrit dans le cadre de la synthèse générale.

3) Exemples de greffages

a) Copolymère PCL-g-PGMA :

La formation du macroamorceur est réalisée selon le mode opératoire de la synthèse générale, avec 0,035 mole de polymère (4 g de PCL), et 0,3 équivalent de LDA commercial par unité monomère. La première étape dure 30 minutes puis le méthacrylate de glycidyle est ajouté à raison de 2 équivalents par motif monomère. La réaction de polymérisation dure 2 heures. L'arrêt de la réaction et la récupération des copolymères sont réalisés selon le mode opératoire décrit pour la synthèse générale.

b) Terpolymère PCL-g-(PVP/PEG) :

i. Fonctionnalisation du PEG :

Le PEG choisi est un MeO-PEG de masse molaire moyenne2000. Le MeO-PEG (1,83 g, soit 0,04 mole) est dissous dans 50 ml de THF anhydre sous agitation magnétique dans un ballon de 100 ml. Le chlorure de bromoacétyle est ajouté en excès (0,5 ml) goutte à goutte par une ampoule à brome. La réaction est laissée sous agitation pendant 2 heures à température ambiante et la formation de la liaison ester est suivie par infra-rouge (bande à 1745 cm^{-1}). La récupération du polymère fonctionnalisé est effectuée en concentrant la solution par évaporation du THF et précipitation dans l'éther. Le rendement est quantitatif.

ii. Greffage du MeO-PEG fonctionnalisé sur la PCL :

La réaction est effectuée selon le mode opératoire décrit pour la synthèse générale par substitution. Le squelette PCL-*g*-PVP est réactivé par réaction avec 1 équivalent de LDA par motif ε-CL et ≈ 1 équivalent de chaînes de MeO-PEG.

II. Caractérisation des copolymères

1) Résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C ont été enregistrés sur les spectromètres Bruker 250 et 400 MHz du Laboratoire de Mesures Physiques de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc - Université Montpellier II et sur le spectromètre Bruker 300 MHz de la Faculté de Pharmacie de l' Université Montpellier I.

2) Spectrométrie infra-rouge

Les spectres infra-rouge ont été enregistrés avec un spectrophotomètre à transformée de Fourier Perkin-Elmer 1760, à partir de pastilles KBr ou de films. Ces films sont obtenus par évaporation d'une solution de produit dans un solvant organique ou aqueux adapté ($CHCl_3$, MeOH, H_2O, mélanges de solvants…). Pour les solutions organiques une fenêtre en NaCl est utilisée alors qu'elle est en ZnS pour les solution aqueuses.

3) Diffraction des Rayons X

Ces spectres ont été réalisés sur un appareil Philips avec une source CuKα (0,154 nm) au laboratoire de Chimie-Physique de la Faculté de Pharmacie à l'Université de Montpellier I.

4) Chromatographie d'exclusion stérique

Les CES en milieu organique ont été effectuées dans le THF ou le $CHCl_3$ avec un débit de 1 cm^{-3}/min. Le système Waters utilisé est doté d'une colonne PLgel 5 µm Mixed C de 60 cm de long, d'une pompe d'injection Waters 510 HPLC et d'une vanne d'injection Rhéodyne de 20 µl. La détection se fait à l'aide d'un réfractomètre différentiel Waters 410. Les masses molaires sont mesurées par rapport à des standards polystyrène.
Un détecteur fluorimétrique Waters 470 est utilisé en série avec le réfractomètre pour les copolymères porteurs de groupements fluorescents. Un détecteur de variation de pression Viscotek T60 Dual Detector a été utilisé en série avec le réfractomètre pour certains copolymères. Un détecteur à barrette de diodes Waters 2996 a été utilisé en série avec le réfractomètre pour toutes les études de copolymères synthétisés par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert dégénératif d'iode.

Les CES en milieu aqueux ont été effectuées avec un système Waters doté de deux colonnes de 30 cm en série de type PlaquagelOH 40 8µm. Trois types d'éluants ont été utilisés : de l'eau distillée et filtrée contenant 0,02% d'azoture de sodium, du tampon phosphate, un mélange eau/méthanol (90 :10 ; v : v). Le débit est de 1 cm^{-3}/min. La pompe d'injection est de type Waters 510 HPLC et elle est couplée à une vanne d'injection Rhéodyne de 20 µl. La détection se fait à l'aide d'un réfractomètre différentiel Waters 410. Les masses molaires sont mesurées par rapport à des standards polystyrène.

5) Radiographie Rayons X

Les plaques de PCL formées par évaporation de solvant ont été radiographées à l'aide d'un appareillage PROSTYLE INTRA / PLANMECA avec les paramètres d'irradation suivants : 63kV / 8mA / 0,02s.

6) Analyse de particules submicroniques par diffusion dynamique de la lumière

Dans tous les cas, les solutions aqueuses de polymère sont filtrées sur filtre 0,45µm sauf pour les copolymères de PCL-*g*-poly(MAPEG) dont les solutions ont été centrifugée à 8000 tr/min pendant 30 minutes.
Les analyses se font par diffusion dynamique de la lumière à 90° à l'aide d'un laser de marque Spectra-Physics Stabilite 2017 (514nm, 200mW, 30A). Le collimateur est un Brookhaven modèle 9863. Les échantillons sont placés dans un bain de décaline thermostaté à 25°C et les données sont analysées à partir d'un logiciel Brookhaven en se basant sur la méthode d'approximation CONTIN.

7) Analyse thermique différentielle

La détermination des températures de fusion, de transition vitreuse et des enthalpies associées est réalisée sur un appareillage DSC6, Perkin Elmer. Deux cycles sont effectués entre 20 et 150°C pour la PCL sous débit d'azote à la vitesse de chauffage de 10°C par minute. Dans le cas de la détermination de la température de transition vitreuse de la PCL, deux cycles sont réalisés dans les mêmes conditions entre –80 et 0°C.

8) Viscoélasticimétrie

Le viscoélasticimètre Metravib permet de déterminer le module actif E' ($N.m^{-2}$) et l'angle de perte δ (°). Des plaques de copolymères sont réalisées par moulage à l'aide d'une presse à plateaux chauffants (100°C, 2.10^7 Pa, 3 minutes). Des éprouvettes calibrées sont découpées et fixées par collage à la colle cyanoacrylate aux plateaux du viscoélasticimètre. Les échantillons sont soumis dans le sens de la hauteur à une déformation sinusoïdale de fréquence déterminée.

9) Microscopie électronique à balayage environnemental

Les photos de microscopie sont réalisées au laboratoire sur un ESEM Philips XL30 sous 6 torr de pression à 7°C.

10) Dosage des fonctions acides du copolymère PCLCOOH par potentiométrie

Le dosage des fonctions carboxylique portées par la chaîne de PCL est réalisé par addition d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 0,01 N sur une solution de 114 mg (0,001 mole) de copolymère dans 60 ml de THF additionnée de quelques gouttes d'eau. Le dosage potentiométrique est réalisé à l'aide d'un pH-mètre Radiometer PHM64.

11) Dégradation des copolymères

a) Dégradation des PCL-g-PVP et PCL-g-PDMAEM

Typiquement, dans un ballon de 100 ml bouché avec un septum, 2 ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (20% en poids) sont additionnés à la seringue à une solution de 0,01 mole de copolymère dans 50 ml de THF. Des prélèvements de 0,25 ml sont effectués au cours du temps et analysés par CES. En fin de dégradation le produit restant est récupéré par précipitation dans le méthanol et analysé en RMN ^{1}H.

b) Dégradation dans le tampon phosphate de la PCL iodée

i. Préparation du tampon

Le tampon phosphate (0,13 M ; pH = 7,4) est préparé par un mélange d'une solution acide de NaH_2PO_4 et d'une solution basique de Na_2HPO_4. La solution basique est réalisée par dissolution de 46,56g de $Na_2HPO_4.12H_2O$ et 0,2g de NaN_3 dans 1L d'eau distillée. La solution acide est réalisée par dissolution de 20,28g de $NaH_2PO_4.2H_2O$ et 0,2g de NaN_3 dans 1L d'eau distillée.
La solution acide est ajoutée à la première jusqu'à pH 7,4.

ii. Dégradation

Des pastilles d'environ 6cm de diamètre sont préparées par pressage à chaud de PCL iodée (100°C, 2.10^7 Pa). Ces pastilles sont coupées en plaques de 100mg environ (1mm d'épaisseur, 1 à 1,5 cm de côté). Ces morceaux sont placés dans des piluliers contenant 10 ml de tampon phosphate (0,13 M, pH = 7,4, NaN_3 0,02 %). Les piluliers sont placés dans une étuve à 37°C et des analyses sont effectuées périodiquement.

B- Transfection

I. Cellules et plasmides

1) Culture cellulaire

Les cellules sont de type MCF7, cellules mammaires adhérentes cancéreuses. Elles sont décongelées lentement sur une période de 10-15 jours avant d'être cultivées à 37°c un quinzaine de jours sous courant d'azote en milieu DMEM (pH = 8,15).
Afin de décoller les cellules pour les répartir dans les puits de transfection, une trypsination est effectuée. Les cellules sont lavées 2 fois au PBS, récupérées dans un batch commun et placées en milieu de culture DMEM (3ml par puits à ensemencer). En tout, les cellules utilisées sont $P5^*$ avant

décongélation, puis P8 lors de la transfection. Un jour avant transfection des plaques 6 puits sont ensemencées par 360000 cellules. Les boîtes sont de type T150.

** P5 signifie que les cellules ont subies 5 trypsination au cours de leur vie.*

2) Plasmides

2 types de plasmides sont utilisés : le PRL-TK, permettant d'exprimer la *Luciférase Rénilla* et le PGL-Base servant de témoin et n'exprimant pas le gène *Luciférase Rénilla*.

II. Préparation des solutions de copolymères

1) Tampon HBS

Préparation de 100mL de tampon à pH 7,3 concentré à 20mM en HEPES et 145mM en NaCl :
- 2ml d'HEPES 1M
- 0,847 mg de NaCl
- addition de 70 mL d'eau déionisée
- ajustement du pH à 7,2-7,3 (pH final = 7,2)

2) Solution 10mM en PEI 25K

PEI 25K commandé chez Aldrich. Polymère branché contenant environ 25/50/25 % de fonctions amine primaire, amine secondaire et amine tertiaire respectivement :
- 4,3 mg de PEI
- 6 mL d'HBS
- ajustement du pH à 7,30 par addition d'HCl 0,1 N puis 0,01N
- complément d'HBS à 10mL

3) Solutions de copolymères PCL-*g*-PLL

Les solutions sont préparées 24 heures avant transfection et conservées à 4°C pour éviter toute hydrolyse des segments PCL.
Les copolymères utilisés sont les deux PCL-*g*-PLL décrites au chapitre III de composition identiques : 40% de motifs PCL et 60% de motifs PLL.
On notera PCL-*g*-PLL A le copolymère issu de la polymérisation par ouverture de cycle de NCA de N-Z-Lysine amorcée par le macro-polycarbanion de PCL, et PCL-*g*-PLL B celui obtenu par greffage de chaînes Poly(N-Z-Lysine) sur le squelette macro-polycarbanionique de PCL. Chaque copolymère a été déprotégé et lyophilisé.
Les solutions sont préparées dans 10mL d'HBS comme décrit dans le Tableau 43.

Tableau 43 : Solutions de copolymères dans le tampon HBS

Conditions	Vecteur	N/P	Qté vecteur ds 10mL d'HBS
1	PCL-*g*-PLL A	5	1,7mg
2	PCL-*g*-PLL A	10	3,42mg
3	PCL-*g*-PLL B	5	1,7mg
4	PCL-*g*-PLL B	10	3,42mg

N/P représente le ratio entre les fonctions amine présentent sur les chaînons Poly(Lysine) (N) et les fonctions phosphate présentent sur les plasmides (P).

Remarque : *Nombre de fonctions phosphate par µg de plasmide = 3.10^{-9} mol*
Nombre de fonctions amine par µg de copolymères = $3,51.10^{-9}$ mol
Nombre de fonctions amine I, II et III par µg de PEI = $2,3.10^{-8}$ mol
Mn des copolymères = 171g/mol dans leur forme bromhydrate (cf. type de déprotection des fonctions amine)
Mn des motifs PEI = 43 g/mol

Les valeurs de pH des solutions sont comprises entre 7,2 et 7,3.

III. Préparation des solutions de plasmide

Pour les essais avec les polymères cationiques, les solutions suivantes sont utilisées :
- PRL-TK : 0,45 µg/µL
- PGL-Base : 1,22 µg/µL

Solution 1 : 70 µL de solution de PRL-TK sont placés dans 860 µL d'HBS, soit un volume total de 930µL pour 31,5 µg de plasmide. Préparée 48 heures avant l'étape de transfection.

Solution 2 : 9,8 µL de solution de PGL-Base sont placés dans 290,2 µL d'HBS, soit un volume total de 300 µL pour 12µg de plasmide. Préparée 2 heures avant l'étape de transfection.

Pour les essais avec la lipofectamine, les solutions suivantes sont utilisées :
- PRL-TK à 1µg/µL
- PGL-Base : 1,22 µg/µL

Solution 1 : 4µL de solution PRL-TK + 4µL de lipofectamine + 192 µL de DMEM (sans sérum ni antibiotiques)

Solution 2 : 3,33 µL de solution PGL-Base + 4µL de lipofectamine + 192µL de DMEM + 0,33 µL d'eau

IV. Transfection

Le milieu de culture est changé une heure avant la transfection (1mL de DMEM sans antibiotique et sans sérum par puits). Les complexes sont formés juste avant utilisation, chaque solution est agitée doucement, mécaniquement pour les solutions de polymère, manuellement pour celles contenant les plasmides. Les différents mélanges sont effectués comme décrit dans le Tableau 44.

Tableau 44 : Préparations des complexes de vectorisation

Ependorf	Vecteur	Plasmide	Complément HBS	Puits
1	Lipofectamine	PRL-TK	Conditions standard (DMEM)	1 et 2
2	Lipofectamine	PGL-B		3 et 4
3	PEI 25K 6µL	PRL-TK 100µL	94 µL	5 et 6
4	PEI 25K 12µL	PRL-TK 100µL	88 µL	7 et 8
5	PEI 25K 12µL	PGL-B 100µL	88µL	9 et 10
6	PCL-g-PLL(A)-5 100µL	PRL-TK 100µL	0µL	11 et 12
7	PCL-g-PLL(A)-10 100µL	PRL-TK 100µL	0µL	13 et 14
8	PCL-g-PLL(A)-10 100µL	PGL-B 100µL	0µL	15 et 16
9	PCL-g-PLL(B)-5 100µL	PRL-TK 100µL	0µL	17 et 18
10	PCL-g-PLL(B)-10 100µL	PRL-TK 100µL	0µL	19 et 20
11	PCL-g-PLL(B)-10 100µL	PGL-B 100µL	0µL	21 et 22*

**Remarque : erreur au niveau des puits 21 et 22, le 21 a reçu 80 µL de solution, et le 22 120 µL soit 1,6 et 2,4 µg de plasmide respectivement.*

Chaque mélange est agité manuellement afin de favoriser la formation des complexes puis les solutions sont incubées 15-20 minutes à température ambiante. Les puits sont ensuite transfectés par addition de 100µL de solution d'après le plan d'expérience ci-dessous (Tab.45). Afin d'avoir une répartition homogène des vecteurs, les solutions sont déposées goutte à goutte sur toute la surface du puits à transfecter.

Tableau 45 : Plan d'expériences des essais de transfection

Vecteur	Plasmide	Qté Plasmide (µg)	Conditions	Nbre puits	Rôle
Lipofectamine	PRL-TK	2	Voir protocole *	2	témoin +
Lipofectamine	PGL-B	2		2	témoin -
PEI 25K	PRL-TK	2	N/P = 5	2	témoin +
PEI 25K	PRL-TK	2	N/P =10	2	témoin +
PEI 25K	PGL-B	2	N/P =10	2	témoin -
PCL-g-PLL(A)	PRL-TK	2	N/P = 5	2	
PCL-g-PLL(A)	PRL-TK	2	N/P = 10	2	
PCL-g-PLL(A)	PGL-B	2	N/P = 10	2	témoin -
PCL-g-PLL(B)	PRL-TK	2	N/P = 5	2	
PCL-g-PLL(B)	PRL-TK	2	N/P = 10	2	
PCL-g-PLL(B)	PGL-B	2	N/P = 10	2	témoin -

Les cellules sont transfectées 4h30, lavées 2 fois au PBS (2 x 2mL) puis replacées dans 3 mL de DMEM (milieu complet). L'expression est assurée par une incubation supplémentaire de 24h00.
Le milieu de culture est ensuite éliminé et les cellules rincées deux fois au PBS (2 x 3mL) afin d'éliminer les cellules mortes et le milieu de culture résiduel. Les cellules sont ensuite lysées à l'aide d'une solution 1X de PLB (Passive Lysis Buffer). On utilise 83,3 µL par puits. Les boîtes de culture contenant la solution de lyse sont placées 15 minutes sous agitation mécanique. La totalité du contenu de chaque puits est ensuite placée dans un ependorf et conservée au congélateur jusqu'à analyse au luminomètre.

[*]Cas de la lipofectamine : Protocole fourni par la société INVITROGEN Life Technologies
Cas de la lyse : Protocole fourni par la société PROMEGA

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Bader, H., Ringsdorf, H. et Schmidt, B.** Water soluble polymers in medecine *Angewandte Makromolecular Chemie* 123/124, 457-485 (1984).
2. **Vert, M.** Polyvalent polymeric drug carriers *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2, 291-327 (1986).
3. **Vert, M.** Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything *Biomacromolecules* 6, 538-546 (2005).
4. **Adams, M. L., Lavasanifar, A. et Kwon, G. S.** Amphiphilic Block Copolymers for Drug Delivery *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92, 1344-1355 (2003).
5. **Rösler, A., Vandermeulen, G. W. M. et Klok, H.-A.** Advanced drug delivery devicies via self-assembly of amphiphilic block copolymers *Advanced Drug Delivery Reviews* 53, 95-108 (2001).
6. **Cölfen, H.** Double-Hydrophilic Block Copolymers: Synthesis and Application as Novel Surfactants and Crystal Growth Modifiers *Macromolecular Rapid Communications* 22, 219-252 (2001).
7. **Velichkova, R. S. et Christova, D. C.** Amphiphilic polymers from macromonomers and telechelics *Progress in Polymer Science* 20, 819-887 (1995).
8. **Lundsted, L. G.** Polyalkylene Compounds US2674619 (1954).
9. **Schmolka, I. R.** A review of block polymer surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 54, 110-116 (1977).
10. **Baines, F. L., Billingham, N. C. et Armes, S. P.** Synthesis of and Solution Properties of Water-Soluble Hydrophilic-Hydrophobic Block Copolymers. *Macromolecules* 29, 3416-3420 (1996).
11. **Courtney, J. M. et al.** The design of a polymer coating for activated carbon. *Artif. Organs, Proc. Semin.*, 133-138 (1977).
12. **Hong, N. I. P., Zu, Z. M., Jian, Z. L. et Kuan, F. U. S.** Amphiphilic ABA triblock copolymer as surfactant in syntheses of microlatexes bearing cationic groups *Journal of polymer science Part A Polymer chemistry* 40, 3734-3742 (2002).
13. **Ganguli, M., N, J. K. et Souvik, M.** Nanoparticles from cationic copolymer and DNA that are soluble and stable in common organic solvents *Journal of the American Chemical Society* 126, 26-27 (2004).
14. **Jae Min, O. H., Hyung Jong, L. E. E., Hong Ku, S. et Sam Kwon, C.** Synthesis and surface activity of novel ABA type triblock cationic amphiphiles *Polymer bulletin Berlin* 32, 149-154 (1994).
15. **Kopeikin, V. V. et Kipper, A. I.** Polyelectrolyte complexes of sodium dodecyl sulfate and cationic copolymer of vinylpyrrolidone in aqueous solutions *Polymer science Series B* 43, 185-189 (2001).
16. **Funhoff, A. M. et al.** Cationic polymethacrylates with covalently linked membrane destabilizing peptides as gene delivery vectors *Journal Of Controlled Release* 101, 233-246 (2005).
17. **Johnson, K. M., J, F. M., Y, L. R. et L, M. C.** Hydrophobically modified acrylamide-based polybetaines: II. Interaction with surfactants in aqueous solutiont *Journal of applied polymer science* 92, 658-671 (2004).
18. **Kathmann, E. E. L., White, L. A. et McCormick, C. L.** Water-soluble polymers. 73. Electrolyte- and pH-responsive zwitterionic copolymers of 4-[(2-acrylamido-2-methylpropyl)-dimethylammonio]butanoate with 3-[(2-acrylamido-2-methylpropyl)dimethylammonio]propanesulfonate *Macromolecules* 30, 5297-5304 (1997).
19. **Mizusaki, M., Morishima, Y. et Winnik, F. M.** Hydrophobically modified poly(sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate)s bearing octadecyl groups: A fluorescence study of their solution properties in water *Macromolecules* 32, 4317-4326 (1999).
20. **Lysenko, E. A. et al.** Block ionomer complexes with polystyrene core-forming block in selective solvents of various polarities. 1. Solution behavior and self-assembly in aqueous media *Macromolecules* 35, 6351-6361 (2002).
21. **Fischer, A., Brembilla, A. et Lochon, P.** Synthesis of new amphiphilic cationic block copolymers and study of their behavior in aqueous medium as regards hydrophobic microdomain formation. *Polymer* 42, 1441-1448 (2000).
22. **Creutz, S., Teyssie, P. et Jerome, R.** Living Anionic Homopolymerization and Block Copolymerization of 4-Vinylpyridine at "Elevated" Temperature and Its Characterization by Size Exclusion Chromatography *Macromolecules* 30, 1-5 (1997).
23. **Jaeger, W. et al.** Novel modified polymers with permanent cationic groups. Papers from the Second International Symposium on Polyelectrolytes *Langmuir* 15, 4026-4032 (1999).
24. **Wendter, U., Bohrisch, J., Jaeger, W., Rother, G. et Dautzenberg, H.** Amphiphilic cationic block copolymers via controlled free radical polymerization *Macromolecular rapid communications* 19, 185-190 (1998).

25. **Dziadosz, L. et Lochon, P.** Synthese de nouveaux copolymeres amphiphiles cationiques a blocs, par voie radicalaire a l' aide d' iniferters. Etude de leurs proprietes physico-chimiques en milieu aqueux *Institut national polytechnique de Lorraine* (1997)
26. **Kanaoka, S., Minoda, M., Sawamoto, M. et Higashimura, T.** Amphiphilic block copolymers of vinyl ethers by living cationic polymerization. II, Synthesis and surface activity of macromolecular amphiphiles with pendant amino groups *Journal of polymer science Part A Polymer chemistry* 28, 1127-1136 (1990).
27. **Hua, J. I. N. R.** Functional polymeric micelles formed from a novel cationic star block copolymer *ChemPhysChem Print* 4, 1118-1121 (2003).
28. **Kaku, M., Grimminger, L. C., Sogah, D. Y. et Haynie, S. L.** New fluorinated oxazoline block copolymer lowers the adhesion of platelets on polyurethane surfaces *Journal of polymer science Part A Polymer chemistry* 32, 2187-2192 (1994).
29. **Volet, G., Catherine, A. et Loic, A.** Interfacial properties of a diblock amphiphilic copolymer: Poly(isobutylvinyl ether-b-2-methyl-2-oxazoline) *Macromolecules* 36, 3327-3336 (2003).
30. **Aoi, K. et al.** Synthesis and assembly of amphiphilic tadpole-shaped block copolymers based on poly(amido amine) dendrimer. A Collection of Papers on New Polymers and Their Nano-Organized Systems *Polymer journal* 31, 1071-1078 (1999).
31. **Aoi, K., Motoda, A., Okada, M. et Imae, T.** Novel amphiphilic linear polymer/dendrimer block copolymer: Synthesis of poly(2-methyl-2-oxazoline)-block-poly(amido amine) dendrimer *Macromolecular rapid communications* 18, 945-952 (1997).
32. **Kaneko, H. et al.** Graft polymers bearing apolar polyolefin side chains with wide molecular weight distribution. JP2004300412 (2004).
33. **Pantchev, I., Velichkova, R., Lakov, L., Peshev, O. et Goethals, E.** Amphiphilic polyelectrolyte networks derived from 2-oxazolines *Polymer Guildford* 39, 7089-7097 (1998).
34. **Goethals, E. J. et al.** Poly(vinyl ethers) as building blocks for new materials. International symposium on ionic polymerization: Paris, 7-11 July 1997 *Makromolekulare Chemie Die Macromolecular symposia* 132, 57-64 (1998).
35. **Muehlebach, A. et Rime, F.** Synthesis of well-defined macromonomers and comb copolymers from polymers made by atom transfer radical polymerization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 41, 3425-3439 (2003).
36. **Miyama, H. et al.** ANTI-THROMBOGENIC POLYMER COMPOSITIONS WITH INTERNALLY BOUND HEPARIN US3844989 (1974).
37. **Jianfu, D., Chuy, C. et Holdcroft, S.** Enhanced conductivity in morphologically controlled proton exchange membranes: Synthesis of macromonomers by SFRP and their incorporation into graft polymers *Macromolecules* 35, 1348-1355 (2002).
38. **Reghunadhan-Nair, C.-P., Chaumont, P. et Charmot, D.** Copolymerization behaviour of pentadiene-functional macromonomers obtained by free radical addition-fragmentation *Polymer Guildford* 40, 2111-2119 (1999).
39. **Ishizu, K., SOGABE, A. et MIYAZAWA, K.** BRUSH-LIKE ALTERNATING COPOLYMER AND ITS PRODUCTION METHOD JP2004346211 (2004).
40. **Riza, M., Tokura, S., Kishida, A. et Akashi, M.** Graft copolymers having a hydrophobic backbone and hydrophilic branches. IX: Preparation of water-dispersible microspheres having polycationic branches on their surfaces *New polymeric materials* 4, 189-198 (1994).
41. **Berlinova, I. V., Dimitrov, I. V. et Vladimirov, N. G.** Preparation and solution behaviour of graft copolymers with cationic groups in polyoxyethylene side chains *Polymer Guildford* 41, 6431-6438 (2000).
42. **Ishikawa, S., Ishizu, K. et Fukutomi, T.** Synthesis and morphology of poly(styrene-g-[propylene oxide-b-2-methyl-2-oxazoline]) *Polymer Bulletin* 16, 223-228 (1986).
43. **Ishizu, K. et Fukutomi, T.** Synthesis of poly(styrene-tetrahydrofuran-2-methyl-2-oxazoline) triblock and graft copolymers *Journal of polymer science Part A Polymer chemistry* 25, 23-30 (1987).
44. **Kobayashi, S. et Uyama, H.** Polymerization of Cyclic Imino Ethers: From Its Discovery to the Present State of the Art *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 40, 192-209 (pages 197 et 198) (2002).
45. **Schulz, R. et Schwarzenbach, E.** Some new polyelectrolytes *Makromolekular Chemie Macromoleluclar Symposia* 26, 221-31 (1989).
46. **Miyama, H., Harumiya, N., Mori, Y. et Tanzawa, H.** A new antithrombogenic heparinized polymer *J Biomed Mater Res* 11, 251-65 (1977).

47. **Gu, L., Zhu, S. et Hrymak, A. N.** Synthesis and flocculation performance of graft copolymer of N-vinylformamide and poly(dimethylaminoethyl methacrylate) methyl chloride macromonomer *Colloid and polymer science Print* 280, 167-175 (2002).
48. **Glasmuller, M., Rueda Sanchez, J. C., Voit, B. I., Nuyken, O. et Kleintjens La, e.** Polyfunctional polyisobutenes as building blocks for amphiphilic graft polymers. Rolduc polymer meeting 10 "Petro" polymers vs. "Green" polymers: Kerkrade, May 5-7, 1997 *Makromolekulare Chemie Die Macromolecular symposia* 127, 109-114 (1998).
49. **Nuyken, O., Sanchez, J. R. et Voit, B.** Synthesis of amphiphilic graft copolymers by ring-opening polymerization of 2-methyl-2-oxazoline initiated by poly[isobutene-co-(p,m-chloromethylstyrene)] macroinitiators *Macromolecular rapid communications* 18, 125-131 (1997).
50. **Rueda Sanchez, J. et Ceroni, G. M.** Synthesis of amphiphilic graft copolymers with poly(2-methyl-2-oxazoline) side chains and a backbone containing chloromethylstyrene and methyl methacrylate *Macromolecular rapid communications* 22, 859-863 (2001).
51. **Grassl, B., Rempp, S. et Galin, J. C.** New super-hairy semi-rigid polymers *Macromolecular chemistry and physics* 199, 239-246 (1998).
52. **Domb, A. J. et al.** dans Polymeric Biomaterials, Second Edition, Revised and Expanded (ed. Dumitriu, S.) 91-121 (Marcel Dekker, INC, New York).
53. **Lendlein, A.** Biomaterial Science II *http://www.itemp.rwth-aachen.de/Biomaterial_Science_II_SS_2005.pdf* (2005).
54. **Zhao, Z., Wang, J., Mao, H.-Q. et Leong, K. W.** Polyphosphoesters in drug and gene delivery *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 483-499 (2003).
55. **Lakshmi, S., Katti, D. S. et Laurencin, C. T.** Biodegradable polyphosphazenes for drug delivery applications *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 467-482 (2003).
56. **Heller, J., Barr, J., Ng, S. Y., Schwach Abdellauoi, K. et Gurny, R.** Poly(ortho esters): synthesis, characterization, properties and uses *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 1015–1039 (2002).
57. **Ponsart, S.** Modification chimique de polyesters aliphatiques biorésorbables par voie anionique: une nouvelle voie d'accès à des copolyesters fonctionnalisés *Université de Montpellier I Sciences chimiques et biologiques pour la santé* (2001)
58. **Edlund, U. et Albertsson, A. C.** Polyesters based on diacid monomers *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 585-609 (2003).
59. **Ueda, H. et Tabata, Y.** Polyhydroxyalkanonate derivatives in current clinical applications and trials *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 501-518 (2003).
60. **Vert, M.** Bioresorbable polymers for temporary therapeutic applications *Angewandte Makromolecular Chemie* 166, 155-168 (1989).
61. **Li, S.** Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids *Journal of Biomedical Materials Research, Applied Biomaterials* 48, 342-353 (1999).
62. **Li, S., Garreau, H. et Vert, M.** Structure-property relationships in the case of the degradation of solid aliphatic poly(α-hydroxy acids) in aqueous media:1. Poly(DL-lactic acid) or PLA50 *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1, 123- (1990).
63. **Li, S., Garreau, H. et Vert, M.** Structure-property relationships in the case of the degradation of solid aliphatic poly(α-hydroxy acids) in aqueous media: 3. Amorphous and semi-crystalline PLA 100 *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1, 198-206 (1990).
64. **Vert, M., Li, S. et Garreau, H.** More about the degradation of LA/GA-derivated matrices in aqueous media *Journal of Controlled Release* 16, 15-26 (1991).
65. **Fischer, E. W., Sterzel, H. J. et Weger, G.** Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions *Kolloid-Zeitschrift et Zeitschrift für Polymere* 251, 980-990 (1973).
66. **Li, S., Tenon, M., Garreau, H., Braud, C. et Vert, M.** Enzymatic degradation of stereocopolymers derived from L-, DL- and meso-lactides *Polymer Degradation and Stability* 67, 85-90 (2000).
67. **Huang, M.-H.** Polymères Biorésorbables Dérivés de Poly(ε-caprolactone) en Ingénierie Tissulaire *Université Montpellier I Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé* (2004)
68. **Pitt, C. G.** "Poly-ε-caprolactone and its copolymers" in: Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (M. Chasin, R. Langer, Eds., Marcel Dekker, New York, 1990).
69. **Libiszowski, J., Kowalski, A., Duda, A. et Penczek, S.** Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with covalent metal carboxylate, 5. End-group studies in the model ε-caprolactone and L,L-dilatide/tin(II) and zinc octoate/butyl alcohol systems *Macromolecular Chemistry and Physics* 203, 1694-1701 (2002).

70. **Storey, R. F. et Tayor, A. E.** Effect of stannous octoate on the composition, molecular weight, and molecular weight distribution of ethylene glycol-initiated poly(ε-caprolactone) *Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry A* 35, 723-750 (1998).
71. **Liu, Y. C., Ko, B. T. et Lin, C. C.** A highly efficient catalyst for the "living" and "lmmortal" polymerization of ε-caprolactone and L-lactide *Macromolecules* 34, 6196-6201 (2001).
72. **Ropson, N., Dubois, P., Jerome, R. et Teyssie, P.** Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. 17. Cryometric and visosimetric analysis of the species active in the ring-opening polymerization of lactones, lactides, and cyclic anhydrides as initiated by aluminum triisopropoxide *Macromolecules* 27, 5950-5956. (1994).
73. **Kricheldorf, H. R. et Eggerstedt, S.** Macrocycles, 1. Living macrocyclic polymerizations of ε-caprolactone with 2,2-dibutyl-2-stanna-1,3-dioxepane as initiator *Macromolecular Chemistry and Physics* 199, 283-290 (1998).
74. **Deng, X., Yuan, M., Xiong, C. et Li, X.** Polymerization of lactides and lactones. IV. ring-opening polymerization of ε-caprolactone by rare earth phenyl compounds *Journal of Applied Polymer Science* 73, 1401-1408 (1999).
75. **Bailey, W. J., Ni, Z. et Wu, S. R.** Synthesis of poly(ε-caprolactone) via free radical mechanism. Free radical opening polymerization of 2-methylene-1,3-oxepane *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 20, 3021-3030 (1982).
76. **Song, Y., Liu, L., Weng, X., Zhuo, R. et Jeong, J. H.** Acid-initiated polymerization of e-caprolactone under microwave irradiation and its application in the preparation of drug controlled release system *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14, 241-253 (2003).
77. **Albertsson, A.-C., Renstad, R., Erlandsson, B., Eldsater, C. et Karlson, S.** Effect of processing additives on (bio)degradability of film-blown poly(e-caprolactone) *Journal of Applied Polymer Science* 70, 61-74 (1998).
78. **Pitt, C. G., Chasalow, F. I., Hibionada, Y. M. et Klimas, D. M.** Aliphatic polyesters I. The degradation of poly(e-caprolactone) in vivo *Journal of Applied Polymer Science* 26, 3779-3787 (1981).
79. **Pitt, C. G., Gratzl, M. M., Kimmel, G. L., Surles, J. et Schindler, A.** Aliphatic polyesters II. The degradation of poly(DL-lactide), poly(e-caprolactone), and their copolymers in vivo *Biomaterials* 2, 215-220 (1981).
80. **Li, S., Espartero, J. L., Foch, P. et Vert, M.** Structural characterization and hydrolytic degradation of a Zn metal initiated copolymer of l-lactide and epsilon-caprolactone *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 8, 165-187 (1996).
81. **Li, S. et Vert, M.** dans Encyclopedia of Controlled Drug Delivery (ed. Mathiowitz, E.) 71-93 (John Wiley et Sons, 1999).
82. **Karlson, S. et Albertsson, A.-C.** Abiotic and biotic degradation of aliphatic polyesterfrom "petro" versus "green" resources *Macromolecular Symposia* 127, 219-225 (1998).
83. **Kasuya, K., Takagi, K., Ishiwatari, S., Yoshida, Y. et Doi, Y.** Biodegradabilities of various polyesters in natural waters *Polymer Degradation and Stability* 59, 327-332 (1998).
84. **Jarrett, P., Benedict, C. V., Bell, J. P., Cameron, J. A. et Huang, S. J.** dans Polymers as biomaterials (eds. Shalaby, S. W., Hoffman, A. S., Ratner, B. D. et Horbett, T. A.) 181-192 (Plenum Publ. Corp., 1985).
85. **Lefebvre, F. et David, C.** Biodegradation of polycaprolactone by micro-organismes from an industrial colpost of household refuse *Polymer Degradation and Stability* 45, 347-353 (1994).
86. **Darwis, D., Mitomo, H., Enjoji, T., Yoshi, F. et Makuuchi, K.** Enzymatic degradation of radiation crosslinked poly(epsilon-caprolactone) *Polymer Degradation and Stability* 62, 259-265 (1998).
87. **Labow, R. S., Erfle, D. J. et Santerre, J. P.** Elastase-induced hydrolysis of synthetic solid substrates: poly(ester-urea-urethane) and poly(ether-urea-urethane) *Biomaterials* 17, 2381-2388 (1996).
88. **Wu, C. et Gan, Z. H.** A novel method of studying polymer biodegradation *Polymer* 39, 4429-4431 (1998).
89. **Li, S. et Vert, M.** dans Biodegradable Polymers, Principles et Applications (ed. Scott, G.) 71-132 (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002).
90. **Goldberg, D.** A review of the biodegradability and utility of PCL *Journal of Environmental Polymer Degradation* 3, 61-67 (1995).
91. **Ponsart, S., Coudane, J., Morgat, J. L. et Vert, M.** Synthesis of [<superscript>3H]-labelled poly(<epsilon>-caprolactone) *Journal of labelled compounds and radiopharmaceuticals* 43, 271-281 (2000).
92. **Gimenez, S., Ponsart, S., Coudane, J. et Vert, M.** Synthesis, properties and in vitro degradation of carboxyl-bearing PCL *Journal Of Bioactive And Compatible Polymers* 16, 32-46 (2001).

93. **La, S. B., Okano, T. et Kataoka, K.** Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(β-benzyl L-aspartate) block copolymer micelles *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85, 85-90 (1996).
94. **Kugo, K., Ohji, A., Uno, T. et Nishino, J.** *Polymer Journal* 19, 375-381 (1987).
95. **Kros, A.** Synthesis and self-assembly of polybutadiene-B-peptides. *Polymer Preprints* 45, 752-753 (2004).
96. **Brzezinska, K. R. et Deming, T. J.** Synthesis of AB Diblock Copolymers by Atom-Transfer Radical Polymerization (ATRP) and Living Polymerization of -Amino Acid-N-Carboxyanhydrides *Macromolecular Bioscience* 4, 566 - 569 (2004).
97. **Nowak, A. P., Breedveld, V., Pine, D. J. et Deming, T. J.** Unusual Salt Stability in Highly Charged Diblock Co-polypeptide Hydrogels. *Journal of the American Chemical Society* 25, 15666-15670 (2003).
98. **Pakstis, L. M. et al.** Effect of chemistry and morphology on the biofunctionality of self-assembling diblock copolypeptide hydrogels *Biomacromolecules* 5, 312-318 (2004).
99. **Malavosklish, B. et al.** Biodegradable poly(ethylene glycol)-co-poly(L-lysine)-g-histidine multiblock copolymers for nonviral gene delivery *Macromolecules* 37, 1903-1916 (2004).
100. **Ahn, C. H., Chae, S. Y., Bae, Y. H. et Kim, S. W.** Synthesis of Biodegradable Multi-block Copolymers of Poly(L-lysine) and Poly(ethylene glycol) as a Non-viral Gene Carrier *Journal of Controlled Release* 97, 567-574 (2004).
101. **Chulhee, K. I. M. et al.** Amphiphilic diblock copolymers based on poly(2-ethyl-2-oxazoline) and poly(1,3-trimethylene carbonate): Synthesis and micellar characteristics *Macromolecules* 33, 7448-7452 (2000).
102. **Youngkyu, C. et al.** Synthesis and micellar characterization of an amphiphilic diblock copolyphosphazene *Macromolecules* 34, 269-274 (2001).
103. **Allcock, H. R., S, P. E., Youngkyu, C. et Chulhee, K. I. M.** Synthesis and micellar behavior of amphiphilic polystyrene-poly[bis(methoxyethoxyethoxy)phosphazene] block copolymers *Macromolecules* 37, 7163-7167 (2004).
104. **Abo Shosha, M. H. et Ibrahim, N. A.** Synthesis and characterization of cellulose/N-methylolacrylamide/glycidyl methacrylate/methacrylic acid cation exchange resins *Die Angewandte makromolekulare Chemie* 226, 23-37 (1995).
105. **Hebeish, A., Waly, A., Abdel-Mohdy, F. A. et Aly, A. S.** Synthesis and Characterization of Cellulose Ion Exchangers. I. Polymerization of Glycidyl Methacrylate, Dimethylaminoethyl Methacrylate, and Acrylic Acid with Cotton Cellulose Using Thiocarbonate-H2O2 Redox System *Journal of Applied Polymer Science* 66, 1029-1037 (1997).
106. **Tan, Y., Zhang, L. et Li, Z.** Synthesis and characterization of new amphoteric graft copolymer of sodium carboxymethyl cellulose with acrylamide and dimethylaminoethyl methacrylate. *Journal of Applied Polymer Science* 69, 879-885 (1998).
107. **Vicini, S., Elisabetta, P., Enrico, P. et Pandalai, S. G.** Photoinduced grafting of acrylic monomers onto cellulosic materials: A review. Recent research developments in macromolecules *Recent research developments in macromolecules* 6, 59-79 (2002).
108. **Halab-Kessira, L. et Ricard, A.** Adsorption of CaCO3 particles on cationic cellulose graft copolymers. I. Effect of chemical parameters. *Journal of Colloid and Interface Science* 179, 269-275 (1996).
109. **Cheradame, H., Tadjang Ambo, U. P. E. et Gandini, A.** The cationic grafting of cellulose with 2-methyl-2-oxazoline *Makromolekulare Chemie Macromolecular symposia* 6, 261-270 (1986).
110. **Ikeda, I., Kurushima, Y., Takashima, H. et Suzuki, K.** Cationic graft polymerization of 2-oxazolines on cellulose derivatives *Polymer Journal* 20, 243-250 (1988).
111. **Carr, M. E., Kim, S., Yoon, K. J. et Stanley, K. D.** Graft polymerization of cationic methacrylate, acrylamide, and acrylonitrile monomers onto starch by reactive extrusion *Cereal chemistry* 69, 70-75 (1992).
112. **Gruber, E. et Bothor, R.** Cationisation of starch granules by graft copolymerisation *Starch* 50, 257-264 (1998).
113. **Shaojie, L. U., Songbai, L. I. N. et Kangde, Y. A. O.** Study on the synthesis and application of starch-graft-poly(AM-co-DADMAC) by using a complex initiation system of CS-KPS *Starch* 56, 138-143 (2004).
114. **Suda, K., Kanlaya, M. et Manit, S.** Synthesis and property characterization of cassava starch grafted poly[acrylamide-co-(maleic acid)] superabsorbent via <gamma>-irradiation *Polymer Guildford* 43, 3915-3924 (2002).

115. **Khalil, M. I. et Aly, A. A.** Use of cationic starch derivatives for the removal of anionic dyes from textile effluents *Journal of applied polymer science* 93, 227-234 (2004).
116. **Ohya, Y. et al.** Graft polymerization of styrene on chitosan and the characteristics of the copolymers. *Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry* 36, 339-353 (1999).
117. **Kurita, K., Hashimoto, S., Ishiii, S., Mori, T. et Nishimura, S. I.** Efficient graft copolymerization of 2-methyl-2-oxazoline onto tosyl- and iodo-chitins in solution *Polymer journal* 28, 686-689 (1996).
118. **Li, P., Zhu, J., Sunintaboon, P. et Harris, F. W.** New Route to Amphiphilic Core-Shell Polymer Nanospheres: Graft Copolymerization of Methyl Methacrylate from Water-Soluble Polymer Chains Containing Amino Groups. *Langmuir* 18, 8641 - 8646 (2002).
119. **Meister, J. J. et Chin Tia, L. I.** Synthesis and properties of several graft copolymers of lignin *Macromolecules* 25, 611-616 (1992).
120. **Iwasaki, Y. et Akiyoshi, K.** Design of Biodegradable Amphiphilic Polymers: Well-Defined Amphiphilic Polyphosphates with Hydrophilic Graft Chains via ATRP *Macromolecules* 37, 7637-7642 (2004).
121. **Chang, J. Y., Park, P. J. et Han, M. J.** Synthesis of poly(4-methylphenoxyphosphazene)-graft-poly(2-methyl-2-oxazoline) copolymers and their micelle formation in water *Macromolecules* 33, 321-325 (2000).
122. **Couffin Hoarau, A. C. et Christophe, L. J.** Report on the use of poly(organophosphazenes) for the design of stimuli-responsive vesicles *Biomacromolecules* 5, 2082-2087 (2004).
123. **Gilding, D. K. et Reed, A. M.** Biodegradable polymers for use in surgery---poly(ethylene oxide) poly(ethylene terephtalate) (PEO/PET) copolymers: 1. *Polymer* 20, 1454-1458 (1979).
124. **Pechar, M., Strohalm, J. et Ulbrich, K.** Synthesis of PEG block copolymers as potential water-soluble drug carriers *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 60, 1765-1780 (1995).
125. **Liu, Y., Ranucci, E., Lindblad, M. S. et Albertsson, A. C.** New biodegradable polymers from renewable sources - Segmented copolyesters of poly(1,3-propanediol succinate) and poly(ethylene glycol) *Journal Of Bioactive And Compatible Polymers* 17, 209-219 (2002).
126. **Cammas Marion, S., Bear, M. M., Harada, A., Guerin, P. et Kataoka, K.** New macromolecular micelles based on degradable amphiphilic block copolymers of malic acid and malic acid ester *Macromolecular Chemistry And Physics* 201, 355-364 (2000).
127. **Li, S. M., Rashkov, I., Espartero, J. L., Manolova, N. et Vert, M.** Synthesis, Characterization and hydrolytic degradation of PLA/PEO/PLA triblock copolymers with long poly(L-lactic acid) blocks *Macromolecules* 29, 57-62 (1996).
128. **Choi, S. W., Choi, S. Y., Jeong, B., Kim, S. W. et Lee, D. S.** Thermoreversible gelation of Poly(ethylene oxide) biodegradable polyester block copolymers. II *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 37, 2207-2218 (1999).
129. **Huh, K. M. et Bae, Y. H.** Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol)/poly(L-lactic acid) alternating multiblock copolymers *Polymer* 40, 6147-6155 (1999).
130. **Jeong, B., Bae, Y. H. et Kim, S. W.** Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer Aqueous solutions *Macromolecules* 32, 7064-7069 (1999).
131. **Lee, D. S. et al.** Novel thermoreversible gelation of biodegradable PLGA-block-PEO-block-PLGA triblock copolymers in aqueous solution *Macromolecular Rapid Communications* 22, 587-592 (2001).
132. **Hui, W. C. et Ho, H. G.** New amphiphilic poly(2-ethyl-2-oxazoline)/poly(L-lactide) triblock copolymers *Biomacromolecules* 4, 1487-1490 (2003).
133. **Sang Cheon, L. E. E. et al.** Synthesis and micellar characterization of amphiphilic diblock copolymers based on poly(2-ethyl-2-oxazoline) and aliphatic polyesters *Macromolecules* 32, 1847-1852 (1999).
134. **Tasaka, F., Miyazaki, H., Oya, Y. et Ouchi, T.** Synthesis of Comb-Type Biodegradable Polylactide through Depsipeptide-Lactide Copolymer Containing Serine Residues *Macromolecules* 32, 6386-6389 (1999).
135. **Benahmed, A., Ranger, M. et Leroux, J. C.** Novel Polymeric Micelles Based on the Amphiphilic Diblock Copolymer Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-block-poly(D,L,-lactide) *Pharmaceutical Research* 18, 323-328 (2001).
136. **Luo, L. et al.** Novel Amphiphilic Diblock Copolymer of Low Molecular Weight Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-Lactide): Synthesis, Characterization, and Micellization *Macromolecules* 37, 4008-4013 (2004).

137. **Liu, S. Q., Yang, Y. Y., Liu, X. M. et Tong, Y. W.** Preparation and characterization of temp.-sensitivity poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(D,L-lactide) microspheres for protein delivery. *Biomacromolecules* 4, 1784-1793 (2003).
138. **Arimura, H., Ohya, Y. et Ouchi, T.** Formation of Core-Shell Type Biodegradable Polymeric Micelles from Amphiphilic Poly(aspartic acid)-block-Polylactide Diblock Copolymer. *Biomacromolecules* 6, 720-725 (2005).
139. **Ouchi, T. et al.** Synthesis of biodegradable amphiphilic AB-type diblock copolymers of lactide and depsipeptide with pendant reactive groups *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 40, 1218-1225 (2002).
140. **Ouchi, T., Sasakawa, M., Arimura, H., Toyohara, M. et Ohya, Y.** Preparation of poly[DL-lactide-co-glycolide]-based microspheres containing protein by use of amphiphilic diblock copolymers of depsipeptide and lactide having ionic pendant groups as biodegradable surfactants by W/O/W emulsion method *Polymer Guildford* 45, 1583-1589 (2004).
141. **Caillol, S.** Synthèse et caractérisation de nouveaux copolymères potentiellement autoassociatifs *L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I Ecole doctorale de sciences chimiques, spécialité polymères* (2002)
142. **Nam, Y. S. et al.** New micelle-like polymer aggregates made from PEI-PLGA diblock copolymers: micellar characteristics and cellular uptake. *Biomaterials* 24, 2053-2059 (2003).
143. **Wang, C. et Hsiue, G.** Polymer-DNA hybrid nanoparticles based on folate-polyethylenimine-block-poly(L-lactide) *Bioconjugate Chemistry* 16, 391-396 (2005).
144. **Gotsche, M., Helmut, K. et Hartwig, H.** Amino-termined poly(L-lactide)s as initiators for the polymerization of N-carboxyanhydrides: synthesis of poly(L-lactide)-block-poly(-amino acid)s *Macromolecular Chemistry and Physics* 196, 3891-3903 (1995).
145. **Cai, Q., Wan, Y., Bei, J. et Wang, S.** Synthesis and characterization of biodegradable polylactide-grafted dextran and its application as compatilizer. *Biomaterials* 24, 3555-3562 (2003).
146. **Nouvel, C., Dubois, P., Dellacherie, E. et Six, J.-L.** Controlled synthesis of amphiphilic biodegradable polylactide-grafted dextran copolymers. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 42, 2577-2588 (2004).
147. **Ouchi, T. et Ohya, Y.** Design of lactide copolymers as biomaterials *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 42, 453-462 (2004).
148. **Wu, Y. et al.** Synthesis and characterization of a novel amphiphilic chitosan-polylactide graft copolymer. *Carbohydrate Polymers* 59, 165-171 (2005).
149. **Junfeng, Z., Jiangning, C. et Ikada, Y.** Adhesion in water between ionic polymer surfaces *Applied surface science* 134, 116-124 (1998).
150. **Weberskirch, R., Hettich, R., Nuyken, O., Schmaljohann, D. et Voit, B.** Synthesis of new amphiphilic star polymers derived from a hyperbranched macroinitiator by the cationic 'grafting from' method *Macromolecular chemistry and physics* 200, 863-873 (1999).
151. **Oster, C. G. et al.** Design of Amine-Modified Graft Polyesters for Effective Gene Delivery Using DNA-Loaded Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 21, 927-931 (2004).
152. **Jeong, J. H. et Park, T. G.** Poly(L-Lysine)-*g*-poly(D,L-lactic-*co*-glycolic acid) Micelles for Low Cytotoxic Biodegradable Gene Delivery Carriers *Journal of Controlled Release* 82, 159-166 (2002).
153. **Jeong, J. H., Byun, Y. et Park, T. G.** Synthesis and characterization of poly(L-lysine)-g-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) biodegradable micelles *J Biomater Sci Polym Ed* 14, 1-11 (2003).
154. **Barrera, D. A., Zylstra, E., Lansbury, P. T. et Langer, R.** Synthesis and RGD Peptide Modification of a New Biodegradable Copolymer: Poly (lactic acid-co-lysine)
J. Am. Chem. Soc. 115, 11010-11011 (1993).
155. **Barrera, D. A., Zylstra, E., Lansbury, P. T. et Langer, R.** Copolymerization and Degradation of Poly(Lactic acid-co-lysine) *Macromolecules* 28, 425-432 (1995).
156. **Hrkach, J. S., Ou, J., Lotan, N. et Langer, R.** Synthesis of Poly(L-lactic acid-co-L-lysine) Graft Copolymers *Macromolecules* 28, 4736-4739 (1995).
157. **Caponetti, G. et al.** Microparticles of Novel Branched Copolymers of Lactic Acid and Amino Acids: Preparation and Characterization *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88, 136-141 (1999).
158. **Choi, Y. K. et Kim, J. S.** Biodegradable mixed polymeric micelles for drug delivery. WO9929303 (1999).
159. **Cerrai, P., Tricoli, M., F., A., Poci, M. et Pasi, M.** Polyether-polyester block copolymers by non-catalysed polymerization of ε-caprolactone with poly(ethylene glycol) *Polymer* 30, 338-343 (1989).
160. **Ahmed, F. et Discher, D. E.** Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles *J Control Release* 96, 37-53 (2004).

161. **Jette, K. K., Law, D., Schmitt, E. A. et Kwon, G. S.** Preparation and drug loading of poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone) micelles through the evaporation of a cosolvent azeotrope *Pharmaceutical Research* 21, 1184-1191 (2004).
162. **Kim, S. Y. et Lee, Y. M.** Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(epsilon-caprolactone) as novel anticancer drug carriers *Biomaterials* 22, 1697-704 (2001).
163. **Park, E. K., Lee, S. B. et Lee, Y. M.** Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs *Biomaterials* 26, 1053-61 (2005).
164. **Rieger, J., Bernaerts, K. V., Du Prez, F. E., Jerome, R. et Jerome, C.** Lactone end-capped poly(ethylene oxide) as a new building block for biomaterials *Macromolecules* 37, 9738-9745 (2004).
165. **Shin, I. G., Kim, S. Y., Lee, Y. M., Cho, C. S. et Sung, Y. K.** Methoxy poly(ethylene glycol)/-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin.: I. Preparation and characterization *Journal of controlled release* 51, 1-11 (1998).
166. **Shuai, X., Ai, H., Nasongkla, N., Kim, S. et Gao, J.** Micellar carriers based on block copolymers of poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery *J Control Release* 98, 415-26 (2004).
167. **Soo, P. L., Luo, L. B., Maysinger, D. et Eisenberg, A.** Incorporation and release of hydrophobic probes in biocompatible polycaprolactone-block-poly(ethylene oxide) micelles: Implications for drug delivery *Langmuir* 18, 9996-10004 (2002).
168. **Yoo, Y., Kim, D. C. et Kim, T. Y.** Preparation and characterization of enalapril maleate-loaded nanoparticles using amphiphilic diblock copolymers *Journal of applied polymer science* 74, 2856-2867 (1999).
169. **Huang, M. H., Li, S., Coudane, J. et Vert, M.** Synthesis and characterization of block copolymers of epsilon-caprolactone and DL-lactide initiated by ethylene glycol or poly(ethylene glycol) *Macromolecular Chemistry and Physics* 204, 1994-2001 (2003).
170. **Ge, H. X. et al.** Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles *Journal Of Pharmaceutical Sciences* 91, 1463-1473 (2002).
171. **Jen, L. I. N. W., Wei, J. L. et Chang, L. I. N. C.** Stability and release performance of a series of pegylated copolymeric micelles *Pharmaceutical research* 20, 668-673 (2003).
172. **Longhai, P., Zhongli, D. A. I., Mingxiao, D., Xuesi, C. et Xiabin, J.** Synthesis and characterization of PCL/PEG/PCL triblock copolymers by using calcium catalyst *Polymer Guildford* 44, 2025-2031 (2003).
173. **Yoo, Y., Shin, H. W. et Nam, B. G.** Effect of hydrophilic-lipophilic balance of drugs on their release behavior from amphiphilic matrix *Macromolecular Research* 11, 283-290 (2003).
174. **Huang, M. H. et al.** Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of epsilon-caprolactone in the presence of poly(ethylene glycol) *J Biomed Mater Res A* 1, 417-27 (2004).
175. **Cheng, D., Ng, S. C. et Chan, H. S. O.** Morphology of polyaniline nanoparticles synthesized in triblock copolymers micelles *Thin Solid Films* 477, 19-23 (2005).
176. **Tan, B. H., Grijpma, D. W., Nabuurs, T. et Feijen, J.** Crosslinkable surfactants based on linoleic acid-functionalized block copolymers of ethylene oxide and epsilon-caprolactone for the preparation of stable PMMA latices *Polymer* 46, 1347-1357 (2005).
177. **Kim, J. H., Park, S. K. et Bae, Y. H.** In situ accelerated degradation of polyoxyethylene/poly(epsilon-caprolactone) multiblock copolymer by moderate thermal treatment *Journal Of Biomaterials Science Polymer Edition* 14, 903-916 (2003).
178. **Li, S. et al.** Hydrolytic Degradation of Poly(oxyethylene) –Poly -(ε-caprolactone) Multiblock Copolymers *Journal of Applied Polymer Science* 68, 989–998 (1998).
179. **You Han, B. A. E. et al.** Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implications for biomedical applications. Proceedings of the Fifth European Symposium on Controlled Drug Delivery *Journal of controlled release* 64, 3-13 (2000).
180. **Bogdanov, B., Vidts, A., Van Den Bulcke, A., Verbeeck, E. et Schacht, E.** Synthesis and thermal properties of poly(ethylene glycol)-poly(-caprolactone) copolymers *Polymer* 39, 1631 (1998).
181. **Mingxiao, D. et al.** Synthesis of four-armed poly(<epsilon>-caprolactone)-block-poly(ethylene oxide) by diethylzinc catalyst *Journal of polymer science Part A Polymer chemistry* 42, 950-959 (2004).

182. **Wang, F., Bronich, T. K., Kabanov, A. V., Rauh, R. D. et Roovers, J.** Synthesis and evaluation of a star amphiphilic block copolymer from poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) as a potential drug delivery carrier *Bioconjugate Chemistry* 16, 397-405 (2005).
183. **Jung Chul, H. A., So Yeon, K. I. M. et Young Moo, L. E. E.** Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (pluronic)/poly(<epsilon>-caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres. I. Preparation and characterization *Journal of controlled release* 62, 381-392 (1999).
184. **Chulhee, K. I. M., Sang Cheon, L. E. E., Ick Chan, K., Hesson, C. et Seo Young, J.** Complexation of poly(2-ethyl-2'-oxazoline)-block-poly(<epsilon>-caprolactone) micelles with multifunctional carboxylic acids *Macromolecules* 35, 193-200 (2002).
185. **Lee, S. C., Kang, S. W., Kim, C., Kwon, I. C. et Jeong, S. Y.** Synthesis and characterization of amphiphilic poly(2-ethyl-2-oxazoline)/poly(<epsilon>-caprolactone) alternating multiblock copolymers *Polymer Guildford* 41, 7091-7097 (2000).
186. **Barakat, I., Dubois, P., Grandfils, C. et Jerome, R.** Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. XXV. Synthesis and characterization of bioerodible amphiphilic networks and their use as controlled drug delivery systems *Journal of polymer science Part A Polymer chemistry* 37, 2401-2411 (1999).
187. **Lele, B. S. et Leroux, J. C.** Synthesis of Novel Amphiphilic Star-Shaped Poly(ε-caprolactone)-block-Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) by Combination of Ring-Opening and Chain Transfer Polymerization *Polymer* 43, 5595-5606 (2002).
188. **Ravin, N. et P, A. S.** Synthesis and aqueous solution properties of novel sugar methacrylate-based homopolymers and block copolymers *Biomacromolecules* 4, 1746-1758 (2003).
189. **Chen, Y. M. et Wulff, G.** ABA and Star Amphiphilic Block Copolymers Composed of Polymethacrylate Bearing a Galactose Fragment and Poly(ε-cprolactone) *Macromol. Rapid Commun.* 23, 59-63 (2002).
190. **Zhang, Q., Remsen, E. E. et Wooley, K. L.** Shell cross-linked nanoparticles containing hydrolytically degradable, crystalline core domains *Journal Of The American Chemical Society* 122, 3642-3651 (2000).
191. **Chung, T. K. et al.** Novel micelle-forming block copolymer composed of poly (<epsilon>-caprolactone) and poly(vinyl pyrrolidone) *Polymer Guildford* 45, 1591-1597 (2004).
192. **Lele, B. S. et Leroux, J. C.** Synthesis and micellar characterization of novel Amphiphilic A-B-A triblock copolymers of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide or N-vinyl-2-pyrrolidone with poly(ε-caprolactone) *Macromolecules* 35, 6714-6723 (2002).
193. **Jin, Z., Akinori, T., Yoshihito, I. et Tadamichi, H.** Amphiphilic poly(<epsilon>-caprolactone)-poly(vinyl alcohol) block copolymer: Preparation from a bifunctional initiator *Polymer journal* 36, 182-189 (2004).
194. **Sung, G. A. et Chang, G. C.** Synthesis and characterization of amphiphilic poly(caprolactone) star block copolymers *Macromolecular rapid communications* 25, 618-622 (2004).
195. **Kricheldorf, H. R. et Hauser, K.** Polylactones. 55. A-B-A Triblock Copolymers of Various Polypeptides. Synthesis Involving 4-Aminobenzoyl-Terminated Poly(ε-caprolactone) as B-Block *Biomacromolecules* 2, 1110-1115 (2001).
196. **Guan, H. L. et al.** Preparation of block copolymer of ε-caprolactone and 2-methyl-2-carboxyl-propylene carbonate *Polymer* 46, 2817-2824 (2005).
197. **Shi, R. W. et Burt, H. M.** Synthesis and characterization of amphiphilic hydroxypropylcellulose-graft-poly(epsilon-caprolactone) *Journal Of Applied Polymer Science* 89, 718-727 (2003).
198. **Wang, C., Dong, Y. et Tan, H.** Biodegradable Brushlike Graft Polymers. I. Polymerization of ε-caprolactone onto Water-Soluble Hydroxypropyl Cellulose as the Backbone by the Protection of the Trimethylsilyl Group *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 41, 273-280 (2003).
199. **Dubois, P. et Narayan, R.** Biodegradable compositions by reactive processing of aliphatic polyester/polysaccharide blends *Macromolecular Symposia.* 198, 233-243 (2003).
200. **Duquesne, E., Rutot, D., Degee, P. et Dubois, P.** Synthesis and characterization of compatibilized poly(epsilon-caprolactone)/granular starch composites *Macromolecular Symposia* 175, 33-43 (2001).
201. **Gref, R., Rodrigues, J. et Couvreur, P.** Polysaccharides grafted with polyesters: Novel amphiphilic copolymers for biomedical applications *Macromolecules* 35, 9861-9867 (2002).
202. **Lemarchand, C., Couvreur, P., Besnard, M., Costantini, D. et Gref, R.** Novel polyester-polysaccharide nanoparticles *Pharmaceutical Research* 20, 1284-1292 (2003).

203. **Lemarchand, C. et al.** Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. Particulate Systems: Papers from the Fourth European Symposium on Particulate Systems, May 30-June 1, 2002, Copenhagen, Denmark *International journal of pharmaceutics* 254, 77-82 (2003).
204. **Li, L., Yu, L., Hao, L. et Yue'e, F.** Synthesis and characterization of chitosan-graft-polycaprolactone copolymers *European Polymer Journal* 40, 2739-2744 (2004).
205. **Detchprohm, S., Aoi, K. et Okada, M.** Synthesis of a Novel Chitin Derivative Having Oligo(ecaprolactone) Side Chains in Aqueous Reaction Media *Macromolecular Chemistry and Physics* 202, 3560-3570 (2001).
206. **Cretu, A., Gattin, R., Brachais, L. et Barbier, B. D.** Synthesis and degradation of poly (2-hydroxyethyl methacrylate)-graft-poly (<epsilon>-caprolactone) copolymers *Polymer degradation and stability* 83, 399-404 (2004).
207. **Coulembier, O. et al.** Synthesis of Amphiphilic Poly((R,S)-β-malic acid)-*graft*-poly(ε-caprolactone: "Grafting From" and "Grafting Through" Approaches *Macromolecules* 38, 3141-3150 (2005).
208. **Mespouille, L. D., Ph.; Dubois, Ph.** Amphiphilic poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate)-g-poly(e-caprolactone) graft copolymers: synthesis and characterisation. *European Polymer Journal* 41, 1187-1195 (2005).
209. **Xintao, S., Thomas, M., Florian, U., Matthias, W. et Thomas, K.** Novel biodegradable ternary copolymers hy-PEI-g-PCL-b-PEG: Synthesis, characterization, and potential as efficient nonviral gene delivery vectors *Macromolecules* 36, 5751-5759 (2003).
210. **Jeong, J. H., Kang, H. S., Yang, S. R. et Kim, J. D.** Polymer Micelle-like Aggregates of Novel Amphiphilic Biodegradable Poly(asparagine) grafted with Poly(caprolactone) *Polymer* 44, 583-591 (2003).
211. **Xu, P. et al.** Enhanced stability of core-surface cross-linked micelles fabricated from amphiphilic brush copolymers *Biomacromolecules* 5, 1736-1744 (2004).
212. **Parrish, B., Breitenkamp, R. B. et Emrick, T.** PEG- and Peptide-Grafted Aliphatic Polyesters by Click Chemistry. *Journal of the American Chemical Society* 127, 7404-7410 (2005).
213. **Liu, X., Yang, S., Chen, M., Yang, C. et Ni, Z.** Core - shell structure nanospheres in aqueous media made of like - graft random copolymer. *Riyong Huaxue Gongye* 34, 1-4 (2004).
214. **Ponsart, S., Coudane, J., McGrath, J. et Vert, M.** Study of the grafting of bromoacetylated alpha-hydroxy-omega-methoxypoly(ethyleneglycol) onto anionically activated poly(epsilon-caprolactone) *Journal Of Bioactive And Compatible Polymers* 17, 417-432 (2002).
215. **Ferruti, P.** dans Reactions on Polymers (eds. Moore, J. A. et Reidel, D.) 73-101 (ASI, 1973).
216. **Ponsart, S., Coudane, J. et Vert, M.** A Novel Route To Poly(e-caprolactone)-Based Copolymers via Anionic Derivatization. *Biomacromolecules* 1, 275-281 (2000).
217. **Dubois, P., Jerome, R. et Teyssie, P.** Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. 3. Synthesis, characterization, and applications of poly(e-caprolactone) macromonomers. *Macromolecules* 24, 977-981 (1991).
218. **Degirmenci, M., Oner, I. et Yusuf, Y.** Synthesis and characterization of cyclohexene oxide functional poly(<epsilon>-caprolactone) macromonomers and their use in photoinitiated cationic homo- and copolymerization *Journal of polymer science Part A Polymer chemistry* 42, 3365-3372 (2004).
219. **Kricheldorf, H. R. et Hachmann-Thiessen, H.** Telechelic and star-shaped poly(ε-caprolactone) functionalized with triethoxysilyl groups - new biodegradable coatings and adhesives. *Macromolecular Chemistry and Physics* 206, 758-766 (2005).
220. **Pitt, C. G., Gu, Z.-W., Ingram, P. et Hendren, R. W.** The synthesis of biodegradable polymers with functionnal side chains *Journal of Polymer Science Polymer Chemistry Edition* 25, 955-966 (1987).
221. **Trollsas, M., Hedrick, J. L., Dubois, P. et Jerome, R.** Synthesis of acid-functional asymmetric aliphatic polyester *Journal of Polymer Science Polymer Chemistry Edition* 36, 1345-1348 (1998).
222. **Trollsas, M. et al.** Hydrophilic Aliphatic Polyesters: Design, Synthesis, and Ring-Opening Polymerization of Functional Cyclic Esters. *Macromolecules* 33, 4619-4627 (2000).
223. **Chiellini, E., Bizzarri, R. et Chiellini, F.** dans Biopolymers - Polyesters III: Application and Commercial Products (eds. Doi, Y. et Steinbüchel, A.) 329-374 (Wiley - VCH, Weinheim, 2002).
224. **Lecomte, P. et al.** Novel functionalization routes of poly(ε-caprolactone) *Macromolecular Symposia* 157, 47-60 (2000).
225. **Lecomte, P. et al.** Synthesis of new hydrophilic γ-substituted poly-ε-caprolactones *220th ACS National Meeting* (2000).

226. **Stassin, F. et al.** (Triethyl-siloxy)ε-caprolactone and γ-ethylene ketal-ε-caprolactone: a route to hetero-graft copolyesters *Macromolecular Symposia* 153, 27-39 (2000).
227. **Tian, D., Dubois, P., Grandfils, C. et Jerome, R.** Ring opening polymerization of I,4,8-trioxaspiro[4,6]-9-undecanone: a new route to aliphatic polyesters bearing functional pendent groups *Macromolecules* 30, 406-409 (1997).
228. **Tian, D., Dubois, P. et Jerome, R.** Macromolecular Engineering of Polylactones and Polylactides. 23. Synthesis and Characterization of Biodegradable and Biocompatible Homopolymers and Block Copolymers Based on 1,4,8-Trioxa[4.6]spiro-9-undecanone. *Macromolecules* 30, 1947-1954 (1997).
229. **Tian, D., Dubois, P. et Jerome, R.** Macromolecular Engineering of Polylactones and Polylactides. 22. Copolymerization of ε-caprolactone and 1,4,8-Trioxa[4.6]spiro-9-undecanone initiated by aluminium isopropoxide *Macromolecules* 30, 2575-2581 (1997).
230. **Gautier, S. et al.** Amphiphilic copolymers of e-caprolactone and g-substituted e-caprolactone. Synthesis and functionalization of poly(D,L-lactide) nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14, 63-85 (2003).
231. **Detrembleur, C. et al.** New Functional Aliphatic Polyesters by Chemical Modification of Copolymers of e-Caprolactone with g-(2-Bromo-2-methylpropionate)-e-caprolactone, g-Bromo-e-caprolactone, and a Mixture of b- and g-Ene-e-caprolactone. *Macromolecules* 33, 7751-7760 (2000).
232. **Mecerreyes, D., Miller, R. D., Hedrick, J. L. et Detrembleur, C.** Ring-Opening Polymerization of 6-Hydroxynon-8-Enoic Acid Lactone: Novel Biodegradable Copolymers Containing Allyl Pendent Groups *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 38, 870-875 (2000).
233. **Rieger, J. et al.** Versatile functionalization and grafting of poly(e-caprolactone) by Michael-type addition *Chemical Communications* 2, 274-276 (2005).
234. **Lou, X., Detrembleur, C., Lecomte, P. et Jerome, R.** Novel unsaturated e-caprolactone polymerizable by ring-opening and ring-opening metathesis mechanisms. *e-Polymers [online computer file]* Paper No. 34 (2002).
235. **Lenoir, S. et al.** Ring-Opening Polymerization of a-Chloro-e-caprolactone and Chemical Modification of Poly(a-chloro-e-caprolactone) by Atom Transfer Radical Processes. *Macromolecules* 37, 4055-4061 (2004).
236. **Mecerreyes, D., Atthoff, B., Boduch, K. A., Trollsas, M. et Hedrick, J. L.** Unimolecular combination of an atom transfer radical polymerization initiator and a lactone monomer as a route to new graft copolymers *Macromolecules* 32, 5175-5182 (1999).
237. **Vangeyte, P. et Jerome, R.** Amphiphilic block copolymers of high-molecular-weight poly(ethylene oxide) and either e-caprolactone or g-methyl-e-caprolactone: Synthesis and characterization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 42, 1132-1142 (2004).
238. **Saulnier, B. et al.** Lactic acid-based functionalized polymers via copolymerization and chemical modification. Highlights from the First IUPAC International Conference on Bio-based Polymers (ICBP 2003) in Saitama, Japan *Macromolecular bioscience Print* 4, 232-237 (2004).
239. **John, I., Tang, J., Yang, Z. et Bhattacharya, M.** Synthesis and characterisation of anhydride-functional polycaprolactone *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 35, 1139-1148 (1997).
240. **John, J., Tang, J. et Bhattacharya, M.** Grafting of oxazoline functional group to polycaprolactone *Journal of Applied Polymer Science* 67, 1947-1955 (1998).
241. **Mani, R., Bhattacharya, M. et Tang, J.** Functionalization of polyesters with maleic anhydride by reactive extrusion. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 37, 1693-1702 (1999).
242. **Mani, R., Currier, J. et Bhattacharya, M.** Polymerization of e-caprolactone with maleic anhydride: synthesis and characterization. *Journal of Applied Polymer Science* 77, 3189-3194 (2000).
243. **Sodergard, A.** Perspectives on modification of aliphatic polyesters by radiation processing *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 19, 511-525 (2004).
244. **Ponsart, S., Coudane, J., Saulnier, B., Morgat, J. L. et Vert, M.** Biodegradation of [H-3]poly(epsilon-caprolactone) in the presence of active sludge extracts *Biomacromolecules* 2, 373-377 (2001).
245. **Carocci, A. et al.** Stereospecific Synthesis of Mexiletine and Related Compounds: Mitsunobu versus Williamson Reaction *Tetrahedron: Asymmetry* 11, 3619-3634 (2000).
246. **Satoh, T., Mitsuo, N., Nishiki, M., Inoue, Y. et Ooi, Y. A Chercher** *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 29, 1443 (1981).
247. **Chithambara Thanoo, B. et Jayakrishnan, A.** Radiopaque hydrogel microspheres. *Journal of microencapsulation* 6, 233-244 (1989).

248. **Chithambara Thanoo, B. et Jayakrishnan, A.** Barium sulphate-loaded p(HEMA) microspheres as artificial emboli: Preparation and properties *Biomaterials* 11, 477-81 (1990).
249. **Ginebra, M. P. et al.** Mechanical performance of acrylic bone cements containing different radiopacifying agents *Biomaterials* 23, 1873-1882 (2002).
250. **Pariente, J. L. et al.** In vitro cytocompatibility of radio-opacifiers used in ureteral endoprosthesis *Biomaterials* 20, 523-527 (1999).
251. **Kruft, M. A. B., Van Der Veen, F. H. et Koole, L. H.** *In Vivo* Tissue Compatibility of two Radio-Opaque Polymeric Biomaterials *Biomaterials* 18, 31-36 (1997).
252. **Vallo, C. I., Cuadrado, T. R. et Frontini, P. M.** Mechanical and fracture behaviour evaluation of commercial acrylic bone cements *Polymer international* 43, 260-268 (1997).
253. **Davy, K. W. M. et Anseau, M. R.** X-Ray opaque Methacrylate Polymers for Biomedical Applications *Polymer International* 43, 143-154 (1997).
254. **Horak, D., Metalova, M. et Rypacek, F.** New radioopaque polyHEMA-based hydrogel particles *Journal of Biomedical Materials Research* 34, 183-188 (1997).
255. **Kruft, M. A. B., Benzina, A., Blezer, R. et Koole, L. H.** Studies on Radio-Opaque Polymeric Biomaterials with Potential Applications to Endovascular Prostheses *Biomaterials* 17, 1803-1812 (1996).
256. **Lakshmi, S., James, N. R., Nisha, V. S. et Jayakrishnan, A.** Synthesis and Polymerization of a New Iodine-Containing Monomer *Journal of Applied Polymer Science* 88, 2580-2584 (2003).
257. **Yang, Y. C., Lim, J. C., Woo, H. G. et Choi, S. K.** Graft copolymerization of pyrrolidone onto copolymers of N-acryloyl pyrrolidone and vinyl monomers *Journal of Macromolecular Science, Chemistry* 18, 677-687 (1982).
258. **Tomalia, D. A. et Luskin, L. S.** dans Functional Monomers vol.II (eds. Yocum, H. et Nyquist, B.) 39-48; 132-144; 636; 675-688 (Marcel Dekker, INC, 1974).
259. **Gebhart, C. et Kabanov, A. V.** Evaluation of Polyplexes as Gene Transfer Agents *Journal of Controlled Release* 73, 401-416 (2001).
260. **Horak, D. et Shapoval, P.** Reactive Poly(glycidyl methacrylate) Microspheres Prepared by Dispersion Polymerization *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 38, 3855-3863 (2000).
261. **Kenawy, E.-R., Abdel-Hay, F. I., El-Shanshoury, A. E.-R. R. et El-Newehy, M. H.** Biologically Active Polymers. V. Synthesis and Antimicrobial Activity of Modified Poly(glycidyl methacrylate-co-2-hydroxyethyl methacrylate) Derivatives with Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 40, 2384-2393 (2002).
262. **Smigol, V., Svec, F. et Fréchet, J. M. J.** Use of polymeric catalysts in the pore-size-specific functionalization of porous polymers *Macromolecules* 26, 5615-5620 (1993).
263. **Uemura, Y., Moritake, I., Kurihara, S. et Nonaka, T.** Preparation of Resins Having Various Phosphonium Groups and Their Adsorption and Elution Behavior for Anionic Surfactants *Journal of Applied Polymer Science* 72, 371-378 (1999).
264. **MacWilliams.** dans Functional Monomers vol.I (eds. Yocum, H. et Nyquist, B.) 25-42 (Marcel Dekker, INC, 1974).
265. **Tasaka, F., Ohya, Y. et Ouchi, T.** Synthesis of Novel Comb-Type Polylactide and Its Biodegradability *Macromolecules* 34, 5494-5500 (2001).
266. Shirahama, H., Miyazaki, M. et Hukuchi, M. (ed. Goodman Co., L., Japan) 30 (2003).
267. **Imanishi, Y.** dans Ring-Opening Polymerization (eds. Ivin, K. J. et Saegusa, T.) 523-603 (Elsevier, London, New York, 1984).
268. **Kohan, M. I.** Anionic polymerization of lactams with dilactam ethers as cocatalysts US 3141006 (1964).
269. **Pietrusza, E. W., Pinter, R. et Pedersen, J. R.** Polylactams and N-substituted lactams BE 623840 (1963).
270. **Daly, W. H. et Poche, D.** The preparation of N-carboxyanhydrides of <alpha>-amino acids using bis(trichloromethyl)carbonate *Tetrahedron Letters* 29, 5859-5862 (1988).
271. **Poché, D. S., Moore, M. J. et Bowles, J. L.** An unconventional method for purifying the N-carboxyanhydride derivatives of γ-alkyl-L-glutamates *Synthetic Communications* 29, 843-854 (1999).
272. **Tewksbury, D. A. et Stahmann, M. A.** Preparation of multichain poly-α-amino acids and polypeptidyl proteins in dimethyl sulfoxide *Archives of Biochemistry and Biophysics* 105, 527-531 (1964).
273. **Wendelmoed, N. E. et Dijk-Wolthuis, V.** Synthesis and characterization of poly(L-Lysine) with controlled low molecular weight *Macromol. Chem. Phys.* 198, 3893-3906 (1997).

274. **Yaron, A. et Berger, A.** Multichain polyamino acids containing glutamic acid, aspartic acid and proline *Biochimica et Biophysica Acta* 107, 307-332 (1965).
275. **Greene, T. W. et Wats, P. G. M.** Portective Groups in Organic Synthesis, III[rd] Edition (John Wiley and Sons INc., 1999).
276. **Godbey, W. T., Wu, K. K. et Mikos, A. G.** Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability *Biomaterials* 22, 471-480 (2001).
277. **Gregoriadis, G. et McCormack, B.** Targeting of Drugs: Stragtegies for Gene Constructs and Delivery (IOS Press, 1999).
278. **Hee, A. H. N. C., Su Young, C., You Han, B. A. E. et Sung Wan, K. I. M.** Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery *Journal of controlled release* 80, 273-282 (2002).
279. **Lee, H., Jeong, J. H. et Park, T. G.** PEG Grafted Polylysine with Fusogenic Peptide for Gene Delivery: High Transfection Efficiency with Low Cytotoxicity *Journal of Controlled Release* 79, 283-291 (2002).
280. **Linen, J. et al.** Water-soluble biodegradable cationic polyphosphazenes for gene delivery *Journal of controlled release* 89, 483-497 (2003).
281. **Li, Y. et al.** CNS gene transfer mediated by a novel controlled release system based on DNA complexes of degradable polycation PPE-EA: a comparison with polyethylenimine/DNA complexes *Gene Ther* 11, 109-14 (2004).
282. **Briggs.** Gene Delivery: an overview *www.nanchem.bham.ac.uk/research_resources/literature_presentations/briggs/october2001.ppt* (2001)
283. **Brown, M. D. et al.** In vitro and in vivo gene transfer with poly(amino acid) vesicles *Journal of Controlled Release* 93, 193-211 (2003).
284. **Blessing, T., Kursa, M., Holzhauser, R., Kircheis, R. et Wagner, E.** Different Strategies for Formation of PEGylated EGF-Conjugated PEI/DNA Complexes for Targeted Gene Delivery *Bioconjugate Chemistry* 12, 529-537 (2001).
285. **Gaynor, S. G., Wang, J. S. et Matyjaszewski, K.** Controlled Radical Polymerization by Degenerative Transfer: Effect of the Structure of the Transfer Agent *Macromolecules* 28, 8051-8056 (1995).
286. **Goto, A., Ohno, K. et Fukuda, T.** Mechanism and Kinetics of Iodide-Mediated Polymerization of Styrene *Macromolecules* 31, 2809-2814 (1998).
287. **Iovu, M. C. et Matyjaszewski, K.** Controlled/Living Radical Polymerization of Vinyl Acetate by Degenerative Transfer with Alkyl Iodides *Macromolecules* 36, 9346-9354 (2003).
288. **Lansalot, M., Farcet, C., Charleux, B. et Vairon, J. P.** Controlled Free-Radical Miniemulsion Polymerization of Styrene Using Degenerative Transfer *Macromolecules* 32, 7354-7360 (1999).
289. **Lacroix-Desmazes, P., Severac, R. et Boutevin, B.** Reverse Iodine Transfer Polymerization of Methyl Acrylate and n-Butyl Acrylate. *Macromolecules* 38, 6299-6309 (2005).
290. **Farcet, C., Lansalot, M., Pirri, R., Vairon, J.-P. et Charleux, B.** Polystyrene-block-poly(butyl acrylate) and polystyrene-block-poly[(butyl acrylate)-co-styrene] block copolymers prepared via controlled free-radical miniemulsion polymerization using degenerative iodine transfer *Macromolecular rapid communications* 21, 921-926 (2000).
291. **Boutevin, B.** From telomerization to living radical polymerization *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 38, 3235-3243 (2000).
292. **Ko, B.-T., Chen, Y.-C. et Ho, R. M.** Synthesis and microstructure characterizations of biodegradable block copolymers, P4VP-b-PCLs. *Abstracts of Papers, 228th ACS National Meeting* (2004).
293. **LeGault, D. I., Glauser, T. et Hedrick, J. L.** Synthesis of amphiphilic graft/block copolymers. *Abstracts of Papers, 223rd ACS National Meeting* (2002).
294. **Meyer, U., Palmans, A. R. A., Loontjens, T. et Heise, A.** Enzymatic Ring-Opening Polymerization and Atom Transfer Radical Polymerization from a Bifunctional Initiator. *Macromolecules* 35, 2873-2875 (2002).
295. **Muftuoglu, A. E., Cianga, I., Colak, D. et Yagci, Y.** Synthesis of A2B and A2B2 type miktoarm star co-polymers by combination of ATRP or ROP with photoinduced radical polymerization. *Designed Monomers and Polymers* 7, 563-582 (2004).
296. **Sha, K., Qin, L., Li, D., Liu, X. et Wang, J.** Synthesis and characterization of diblock and triblock copolymer by enzymatic ring-opening polymerization of ε-caprolactone and ATRP of styrene. *Polymer Bulletin* 54, 1-9 (2005).
297. **Yurteri, S., Cianga, I. et Yagci, Y.** Synthesis and characterization of poly(ℳ-caprolactone)-b-polystyrene macromonomer by combined ring-opening and atom transfer radical polymerizations and its use for the preparation of grafted polyphenylenes by Suzuki polycondensation. *Designed Monomers and Polymers* 8, 61-74 (2005).

298. **Zhao, Y.-F., Fan, X., Chen, X., Wan, X. et Zhou, Q.-F.** Synthesis and characterization of diblock copolymers based on crystallizable poly(ε-caprolactone) and mesogen-jacketed liquid crystalline polymer block. *Polymer* 46, 5396-5405 (2005).

299. **Korn, M. R. et Gagne, M. R.** Simultaneous and subsequent NMRP and ATRP polymerization of styrene on α,ω-hetero-functionalized PCL for the synthesis of PS-PCL-PS block copolymers. *Polymeric Materials Science and Engineering* 84, 611-612 (2001).

300. **Yoshida, E. et Osagawa, Y.** Synthesis of Poly(ε-caprolactone) with a Stable Nitroxyl Radical as an End-Functional Group and Its Application to a Counter Radical for Living Radical Polymerization. *Macromolecules* 31, 1446-1453 (1998).

301. **De Queiroz, A. A. A., Franca, E. J., Abraham, G. A. et Roman, J. S.** Ring-opening polymerization of ε-caprolactone by iodine charge-transfer complex. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* 40, 714-722 (2002).

302. **Garcia, M. et al.** Total synthesis of 19(RS)-F-LTA4 Méthyl Ester *Tetrahedron Letters* 36, 6437-6438 (1995).

303. **Uziel, J., Riegel, N., Aka, B., Figuière, P. et Jugé, S.** A pratical synthesis of chiral and achiral phosphonium salts from phosphine borane complexes *Tetrahedron Letters* 38, 3405-3408 (1997).

304. **Meyer, F., Uziel, J., Papini, A. et Judge, S.** Triphenylphosphonium salts bearing an L-alanyl substituent: short synthesis and enantiomeric analysis by NMR *Tetrahedron Letters* 42, 3981-3984 (2001).

RESUME en français
Il n'existe à l'heure actuelle pratiquement pas de copolymères greffés à fonctions cationiques et/ou amphotères présentant une dégradabilité intrinsèque. L'objectif de cette thèse est de générer des composés répondant à ces critères à partir d'une méthode de modification chimique par voie anionique de poly(ε-caprolactone) (PCL). A cette fin, deux stratégies principales ont été suivies à partir d'un même intermédiaire réactionnel, un macropolycarbanion dérivé de PCL. La première est fondée sur l'emploi du macropolycabanion en tant qu'agent nucléophile qui réagit avec de petites molécules organiques électrophiles. Ces réactions de substitution ont permis l'obtention de copolymères à base PCL possédant entre 10 et 15% de motifs substitués par des groupes cationiques (ammonium, phosphonium), ou hydrosolubilisants (amine, acide carboxylique). Ces squelettes PCL fonctionnalisés peuvent être utilisés pour effectuer des post-modifications (réactions de couplages, dérivation de fonctions). La seconde stratégie utilise le macropolycarbanion en tant que macroamorceur de polymérisation anionique. Ce type de réaction a été appliqué à des dérivés vinyliques (4-VP, N-VP), des dérivés acryliques (DMAEM, MAPEG), des dérivés acrylamides (DMA, DMAPMA) et des dérivés cycliques (NCA d'acides α-aminés) ce qui a permis d'obtenir des copolymères greffés hydrosolubles à chaîne principale PCL. Ces composés ont des structures partiellement dégradables et forment en solution aqueuse des objets de dimensions nanométriques. Enfin, l'utilisation d'un dérivé polyiodé de PCL en tant que macro-polyagent de transfert est abordée ce qui constitue une nouvelle méthode de polymérisation radicalaire contrôlée par transfert dégénératif d'iode permettant l'obtention de structures greffées.

MOTS-CLES
Polyester, poly(ε-caprolactone), dégradable, amphiphile, cationique, copolymère greffé, polymérisation par transfert d'iode (ITP), transfection, macroamorceur

TITRE en anglais
Synthesis and characterization of new degradable water-soluble polyesters bearing cationic and/or amphoteric groups

RESUME en anglais
A bibliographic review relating to grafted copolymers being both cationic, or amphoteric, and partially degradable allowed to highlight the lack of such compounds in the current literature. The aim of this thesis is to generate such compounds starting with poly((ε-caprolactone) (PCL) as raw material and using an anionic modification method newly described for this polyester. Two main strategies based on a macropolycarbanionic PCL intermediate were followed. The first strategy uses the macropolycarbanion as a nucleophilic agent able to react with small electrophilic organic molecules. These substitution reactions allowed us to synthesise PCL based copolymers containing from 10 to 15% of functionalized units bearing cationic (ammonium, phosphonium), or hydrophilic groups (amine, carboxylic acid). These functionalized PCL can be further used within post-modification reactions. The second strategy uses the macropolycarbanion as a macroinitiator for anionic polymerization. Different families of monomers were tested, vinylic type (4-VP, N-VP), acrylic type (DMAEM, MAPEG), acrylamide type (DMA, DMAPMA) and cyclic ones (α-amino acids). Grafted water-soluble copolymers exhibiting a PCL main chain were thus obtained. These new compounds are potentially partially degradable and form spontaneously nanometric micelle-like objects in water. Finally, we describe the use of an iodo-PCL derivative as a macro transfer agent which is an innovative use of the iodine transfer polymerization technique leading to new grafted copolymers.

KEY WORDS
Polyester, poly(ε-caprolactone), degradable, amphiphilic, cationic, graft copolymers, iodine transfer polymerization (ITP), transfection, macro-initiator.

DISCIPLINE
Chimie des matériaux

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :
Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels (CRBA, UMR-CNRS5473), Faculté de Pharmacie, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5